

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie der  
Universität Würzburg

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

**Die Rolle der Pim-1 Kinase im Zweiten Fenster der  
Anästhetika-induzierten Präkonditionierung**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät

der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität

zu Würzburg

vorgelegt von

Julia Neuser

aus Heckfeld

Würzburg, Juli 2019

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Markus Lange

Koreferent bzw. Koreferentin: Prof. Dr. med. Kai Schuh

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 02.09.2020

Die Promovendin ist Ärztin

Meinen Eltern und Jonas gewidmet

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Klinischer Hintergrund</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Präkonditionierung</b> .....	<b>2</b>
1.2.1 Ischämische Präkonditionierung .....	2
1.2.2 Anästhetika-induzierte Präkonditionierung .....	3
<b>1.3 Mechanismen der Präkonditionierung</b> .....	<b>5</b>
<b>1.4 Die Pim-1 Kinase</b> .....	<b>6</b>
<b>1.5 Das proapoptotische Protein Bad</b> .....	<b>9</b>
<b>1.6 Fragestellung</b> .....	<b>9</b>
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>10</b>
<b>2.1 Versuchsgenehmigung</b> .....	<b>10</b>
<b>2.2 Durchführung der Untersuchung</b> .....	<b>10</b>
2.2.1 Versuchstiere .....	10
2.2.2 Präkonditionierung .....	10
2.2.3 Narkose .....	10
2.2.4 Intubation und Beatmung .....	11
2.2.5 Präparation .....	11
2.2.6 Myokardiale Ischämie und Reperfusion .....	12
2.2.7 Abschluss des Experiments .....	12
2.2.8 Auswertung .....	13
<b>2.3 Experimentelles Protokoll</b> .....	<b>14</b>
2.3.1 Protokoll zur Infarktgrößenbestimmung .....	14
2.3.2 Protokoll zur Organentnahme .....	16
<b>2.4 Western Blotting</b> .....	<b>17</b>
<b>2.5 Auswertung und Statistik</b> .....	<b>21</b>
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>22</b>
<b>3.1 Hämodynamische Parameter und ischämisches Areal</b> .....	<b>22</b>
<b>3.2 Herzinfarktgröße</b> .....	<b>24</b>
<b>3.3 Expression Pim-1</b> .....	<b>26</b>
<b>3.4 Expression Bad/pBad</b> .....	<b>27</b>

<b>4. Diskussion .....</b>	<b>29</b>
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>38</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>39</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Klinischer Hintergrund

Der Myokardinfarkt zählt weltweit zu den Hauptursachen für Tod und Erwerbsunfähigkeit. Schätzungen gehen von weltweit mehr als 7 Millionen Menschen mit Myokardinfarkt pro Jahr aus.<sup>1</sup> Fortschritte in Management und Therapie des akuten Myokardinfarktes, insbesondere durch zeitnahe Reperfusion beziehungsweise Revaskularisierung, konnten Morbidität und Mortalität reduzieren,<sup>2</sup> jedoch sind in Europa Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems wie die koronare Herzkrankheit (KHK) und die Herzinsuffizienz weiterhin führende Todesursachen.<sup>3</sup>

Im Zuge des Fortschritts der Medizin und des demographischen Wandels werden immer umfangreichere chirurgische Eingriffe an zunehmend älteren Patienten mit steigenden perioperativen Risikofaktoren durchgeführt.<sup>4</sup> Neben den medizinischen Herausforderungen kardiovaskulärer Ereignisse, geht mit dieser Entwicklung auch ein ökonomischer Aspekt einher.<sup>5</sup> Nicht zu vernachlässigen ist auch das Risiko von Patienten mit KHK, die sich einem nicht-kardiochirurgischen Eingriff unterziehen, unmittelbar perioperativ einen Myokardinfarkt zu erleiden.<sup>6</sup> Diesbezüglich ist vor allem das gefäßchirurgische Patientenkollektiv hervorzuheben.<sup>7</sup> Der Myokardinfarkt ist definiert als myokardialer Zelltod aufgrund länger andauernder Ischämie.<sup>8</sup> Da perioperative Ischämien bezüglich Dauer und Intensität am gefährlichsten sind,<sup>6</sup> kommt der Untersuchung perioperativer kardioprotektiver Mechanismen und der Etablierung perioperativer kardioprotektiver Strategien große Bedeutung zu. Zu diesen kardioprotektiven Strategien zählt auch die Präkonditionierung.

## 1.2 Präkonditionierung

Die Präkonditionierung beschreibt einen Schutzmechanismus, bei dem bestimmte Reize die Toleranz einer Zelle gegenüber länger anhaltenden Ischämien erhöhen.<sup>9</sup> Diese Reize können kurzzeitige Ischämien, Pharmaka, aber auch endogene Botenstoffe wie Adenosin<sup>10</sup>, Bradykinin<sup>11</sup> oder Katecholamine<sup>12</sup> sein. Außer im Herzen<sup>13</sup> findet sich dieses Phänomen auch in anderen Geweben mit hohem Energieumsatz, wie dem Gehirn<sup>14</sup>, den Nieren<sup>15</sup>, der Lunge<sup>16</sup>, der Leber<sup>17</sup> und dem Skelettmuskel<sup>18</sup>. Der Zeitraum zwischen präkonditionierendem Stimulus und Ischämie wird als Memoryphase bezeichnet.<sup>19</sup>

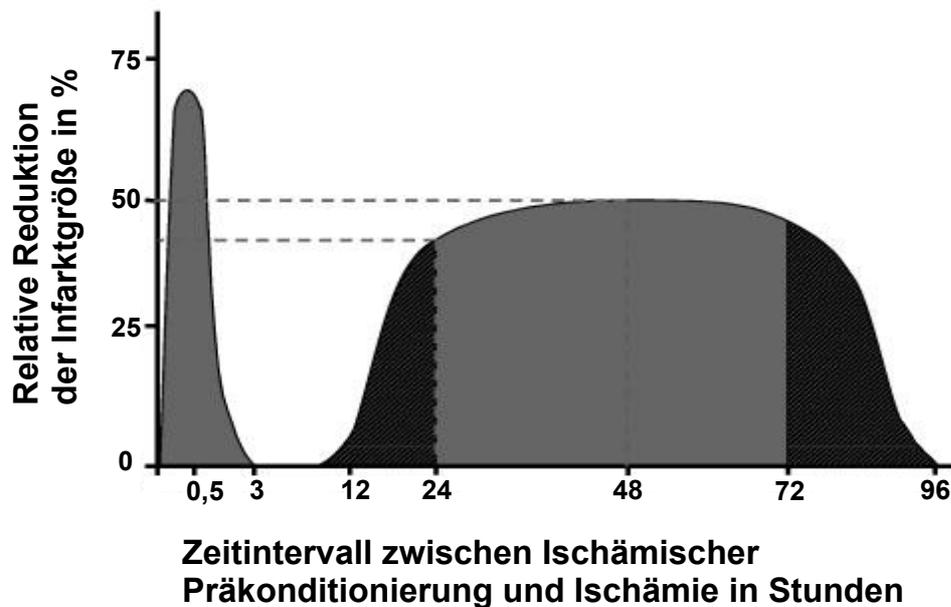
Grundsätzlich lässt sich zwischen der Ischämischen Präkonditionierung (IPC) und der Pharmakologischen Präkonditionierung (PPC) unterscheiden. Neben den volatilen Anästhetika<sup>20</sup> können z.B. auch Opioide<sup>21</sup> präkonditionierend auf die Herzmuskelzellen wirken. Bei Anästhetika spricht man von der Anästhetika-induzierter Präkonditionierung (APC).

### 1.2.1 Ischämische Präkonditionierung

Erstmalig beschrieben wurde die ischämische Präkonditionierung im Jahre 1986 von Murry et al. in Hunden.<sup>13</sup> Damals konnte gezeigt werden, dass sich die Infarktgröße nach 40-minütiger Koronararterienokklusion um 75% verkleinern lässt, wenn man vier Zyklen einer je fünfminütigen Koronararterienokklusion und Reperfusion vorschaltet. Bis heute gilt die aus diesem wegweisenden Experiment heraus definierte IPC als wirksamster kardioprotektiver Mechanismus, der sich auch in allen bisher untersuchten Spezies beobachten lässt.<sup>22</sup>

Die ischämische Präkonditionierung hat einen biphasischen Verlauf und lässt sich in eine frühe und eine späte Phase aufteilen. Die frühe Phase, auch Erstes Fenster der Präkonditionierung genannt, hält je nach Spezies bis zu drei Stunden an.<sup>13</sup> Nach 24 Stunden beginnt die späte Phase bzw. das Zweite Fenster der Präkonditionierung und hält für weitere 48-72 Stunden an.<sup>23-25</sup> Nur in diesen Phasen lässt sich ein kardioprotektiver Effekt nachweisen. Im Ersten

Fenster wird dieser durch Aktivierung bereits vorhandener Proteine verursacht, während im Zweiten Fenster vorwiegend eine Neusynthese kardioprotektiver Proteine zu Grunde liegt.<sup>26,27</sup>



**Abbildung 1: Biphasisches Verlaufsmuster der ischämischen Präkonditionierung. In Abhängigkeit vom Zeitintervall zwischen IPC und Ischämie ist die relative Reduktion der Herzinfarktgröße (in %) gegenüber unbehandelten Tieren dargestellt.<sup>28</sup>**

### 1.2.2 Anästhetika-induzierte Präkonditionierung

Zwei Jahre nach der Erstbeschreibung der Ischämischen Präkonditionierung konnten Wartier et al. zeigen, dass sich die Myokardfunktion nach einer 15minütigen Koronararterienokklusion bessert, wenn zuvor Halothan bzw. Isofluran appliziert wurde. Damit wurde der positive Einfluss von volatilen Anästhetika auf das myokardiale Stunning belegt.<sup>29</sup> In den darauffolgenden Jahren konnte gezeigt werden, dass Halothan<sup>30</sup> und Isofluran<sup>31</sup> den ATP-abhängigen K<sup>+</sup>-Kanal aktivieren können. Dies geht neben einer koronaren

Vasodilatation auch mit einer Infarktgrößenreduktion nach Ischämie einher. Weiterhin ließ sich mit dem nichtselektiven ATP-abhängigen-K<sup>+</sup>-Kanal-Antagonisten Glibenclamid die positive Wirkung von Isofluran auf das myokardiale Stunning aufheben.<sup>32,33</sup>

Im Jahre 1997 konnten Kersten et al. erstmalig zeigen, dass auch Isofluran das Myokard präkonditionieren kann, wobei die erzielte Infarktgrößenreduktion mit derjenigen der Ischämischen Präkonditionierung vergleichbar war.<sup>20</sup> Die Beobachtung, dass der nichtselektive ATP-abhängigen-K<sup>+</sup>-Kanal-Antagonist Glibenclamid die Präkonditionierung durch Isofluran aufheben kann, deutet auf eine fundamentale Rolle der ATP-abhängigen-K<sup>+</sup>-Kanäle auch bei der Anästhetika-induzierten Präkonditionierung (APC) hin.<sup>20</sup>

Bislang konnte für alle volatilen Anästhetika wie Halothan<sup>11,34</sup>, Enfluran<sup>11</sup>, Isofluran<sup>11,34</sup>, Sevofluran<sup>34</sup> und Desfluran<sup>34</sup> eine präkonditionierende Wirkung im Tiermodell nachgewiesen werden. Lange et al. konnten an Kaninchen zeigen, dass für Desfluran eine Schwellendosis besteht, die sich aber durch wiederholte Gabe senken lässt. In ihrem Versuchsprotokoll lag die Schwelle für Desfluran zur Präkonditionierung am Kaninchenherzen zwischen 0,5 und 1,0 minimaler alveolärer Konzentration (MAC). Die Schwellendosis ließ sich durch repetitive Gabe mit dazwischengeschalteten Memoryphasen soweit senken, dass auch subanästhetische Dosen Desfluran eine kardioprotektive Wirkung entfalten konnten. Allerdings ließ sich der protektive Effekt weder durch Dosissteigerung über die Schwelle hinaus noch durch verlängerte Applikationsdauer verbessern.<sup>35</sup> Auch Kehl et al. konnten an Kaninchen nachweisen, dass sich ein kardioprotektiver Effekt bereits ab 0,25 MAC Isofluran beobachten lässt und höhere Dosen zu keiner weiteren Reduktion des Infarktareals führen. Allerdings zeigte sich bei höherer Konzentration des Anästhetikums die Infarktgrößenreduktion unabhängig vom koronaren Kollateralblutfluss.<sup>36</sup>

2004 konnten Tanaka et al. am Kaninchenmodell erstmals zeigen, dass auch die APC mit Isofluran, ähnlich der IPC, einen biphasischen Verlauf aufweist.<sup>37</sup> Durch weitere Experimente mit Kaninchen zum Zweiten Fenster der APC ist

bekannt, dass sich 24, 48 und 72 Stunden nach Applikation von Desfluran eine Infarktgrößen-reduzierende Wirkung erreichen lässt, während sie nach 96 Stunden nicht mehr nachweisbar ist.<sup>9</sup> Redel et al. demonstrieren 2013 im in-vivo Modell, dass sich auch bei Mäusen nach Gabe von Desfluran ein biphasischer Verlauf der APC mit einem Zweiten Fenster nach 48h nachweisen lässt.<sup>38</sup>

### 1.3 Mechanismen der Präkonditionierung

Mechanistisch erklärt man sich die Präkonditionierung auf zellulärer Ebene durch die kaskadenartige Aktivierung verschiedener Signalwege, deren Einzelheiten bis dato nicht vollständig verstanden sind. Diese Signalwege sind bei IPC und APC ähnlich.<sup>39</sup> Inhibitorische G-Proteine<sup>19,40</sup>, die Bildung freier Sauerstoffradikale (ROS)<sup>41</sup> und die Proteinkinase C<sup>42</sup> mit ihrer  $\alpha$ <sup>43</sup>,  $\delta$ <sup>44</sup> und  $\epsilon$ <sup>45</sup> Untereinheit spielen genauso eine Rolle wie sarkolemmale<sup>46</sup> und mitochondriale<sup>47,48</sup> ATP-aktivierte K<sup>+</sup>-Kanäle (K<sub>ATP</sub>) oder Calcium-abhängige Kaliumkanäle mit hoher Leitfähigkeit (BKCa).<sup>49,50</sup> Ein weiterer Faktor, der die Infarktgröße beeinflusst, ist die Calciumhomöostase,<sup>51</sup> eine zentrale Rolle spielt hierbei die Calcium/Calmodulin Kinase.<sup>52</sup>

Nach heutigem Kenntnisstand gilt die mitochondriale Permeabilitätspore (mitochondrial permeability transition pore, mPTP) als wahrscheinlicher gemeinsamer Endeffektor der verschiedenen Signalwege.<sup>53</sup> Sie befindet sich an der Kontaktstelle von innerer und äußerer Mitochondrienmembran.<sup>54</sup> Ihre Öffnung führt zur Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran, sodass Cytochrom C und weitere proapoptotische Moleküle ins Zytosol freigesetzt werden und die Apoptose der Zelle einleiten.<sup>55</sup> Zur Öffnung der mPTP führen u.a. die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) oder auch die Calciumüberladung der Zelle.<sup>56</sup> Eine verzögerte Öffnung der mPTP während der Reperfusion ist nach Präkonditionierung zu beobachten<sup>57</sup> und wird wahrscheinlich über K<sub>ATP</sub>-Kanäle vermittelt.<sup>58</sup> Nach Gabe von Ciclosporin A

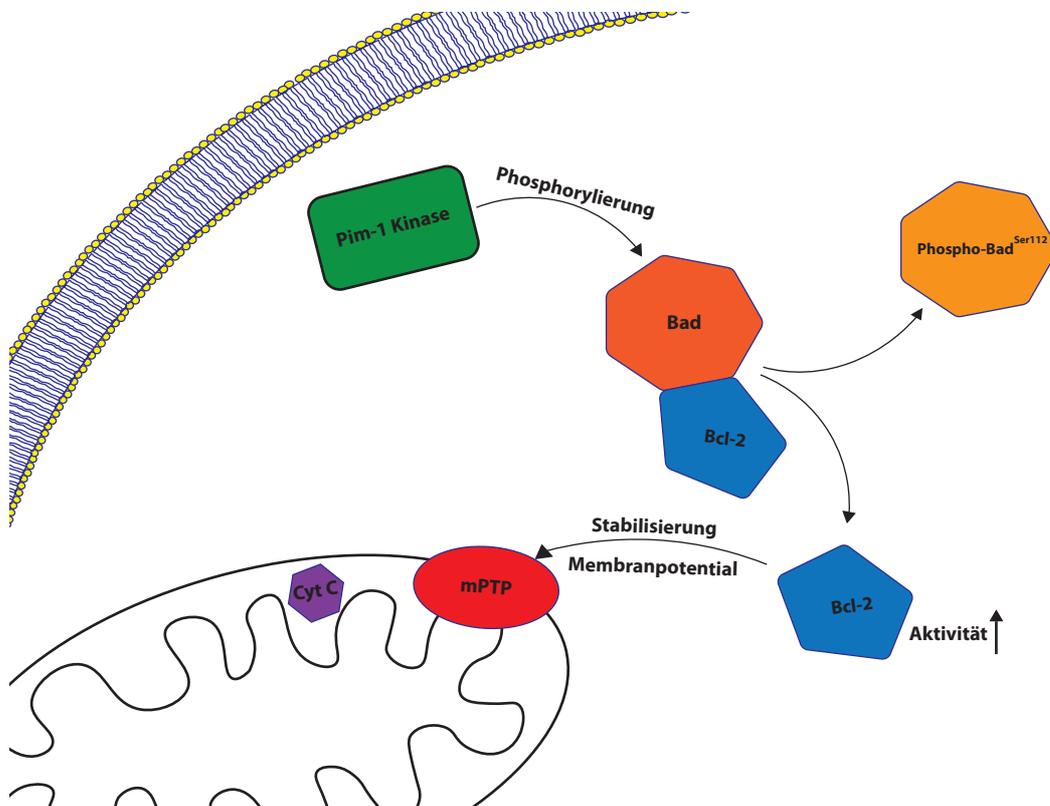
wurde ebenfalls eine verzögerte Öffnung der mPTP beobachtet, was auch in einer Reduktion der Infarktgröße resultierte.<sup>59</sup>

Die Mechanismen, die für die Kardioprotektion im Zweiten Fenster verantwortlich sind, vermitteln diese ebenfalls über die mPTP<sup>60,61</sup> und den K<sub>ATP</sub>-Kanal.<sup>62,63</sup> Es wird von einer Signalkaskade ausgegangen, die durch „early mediators“ wie Akt,<sup>64</sup> Tyrosinkinase<sup>65</sup> oder Proteinkinase C<sup>66</sup> eine Aktivitätssteigerung von Transkriptionsfaktoren wie STAT 1 und 3 (Signal Transducers and Activators of Transcription)<sup>67,68</sup> oder NFκB (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells)<sup>69</sup> erreicht. Dies resultiert in einer Expressionssteigerung der „late mediators“ durch de-novo Proteinsynthese wie z.B. der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS)<sup>65,70</sup> oder der Cyclooxygenase-2 (COX-2),<sup>37,71</sup> welche dann in einer gemeinsamen Endstrecke münden.

#### **1.4 Die Pim-1 Kinase**

Pim-1 ist ein Proto-Onkogen, das für eine gleichnamige Seronin/Threonin-Kinase kodiert, welche eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zellwachstum und Proliferation spielt.<sup>72,73</sup> Das Pim-1 Onkogen wurde ursprünglich im Zusammenhang mit murinen T-Zell-Lymphomen beschrieben, da es die Insertionsstelle für das Moloney Murine Leukämie Virus darstellt.<sup>74</sup> Weiterhin bekannt sind die Pim-2 und die Pim-3 Kinase, die hohe Frequenz- und Strukturähnlichkeiten zu Pim-1 aufweisen.<sup>75</sup> Sie sind der Familie der Calcium/Calmodulin-abhängigen Kinasen zuzuordnen und ihre Expression wird durch verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren getriggert.<sup>76</sup> In hoher Zahl findet sich die Pim-1 Kinase in der Leber und der Milz und während der Fetalzeit<sup>77</sup> in hämatopoetischen Geweben, aber auch im Herzmuskel.<sup>78</sup> Im neonatalen Myokard wird Pim-1 am stärksten exprimiert. Die Expression nimmt im Laufe des Lebens kontinuierlich ab.<sup>79</sup> Im Myozyt der jungen Maus wird die Pim-1 Kinase überwiegend nukleär exprimiert, während sie sich mit zunehmendem Alter vorrangig im Zytosol findet.<sup>79</sup> Allerdings steigt die zelluläre

Pim-1 Konzentration nach Myokardinfarkt und in hypertensiv geschädigtem Myokard sowohl beim Menschen, als auch im Mausmodell wieder an.<sup>79-81</sup>



**Abbildung 2: Pim-1 Kinase Signalweg**

Die Pim-1 Kinase führt durch die Phosphorylierung von Bad am Serinrest 112 (Phospho-Bad<sup>Ser112</sup>) zur Abspaltung von Bcl-2 und dessen Aktivitätssteigerung. Bcl-2 bewirkt nun über die mitochondriale Permeabilitäts-pore (mPTP) eine Stabilisierung des Membranpotentials und verhindert eine Freisetzung von Cytochrom C (Cyt C) aus dem Mitochondrium und damit die Einleitung der Apoptose.

Im Kardiomyozyt ist die Pim-1 Kinase der Proteinkinase B/Akt nachgeschaltet.<sup>79</sup> Diese gehört ebenfalls zu den Serin/Threonin-Kinasen, die nach Aktivierung durch Zytokine oder Wachstumsfaktoren eine Konformationsänderung vollziehen und sich von der Zellmembran lösen.<sup>72</sup> Ein wichtiger Mediator für diesen Signalweg ist STAT3.<sup>82,83</sup> Im Mausmodell führt die Aktivierung von

STAT3 durch IPC zur Translation und Transkription kardioprotektiver Proteine wie Cyclooxygenase 2 (COX-2)<sup>84</sup> und induzierbarer NO-Synthase (iNOS)<sup>85</sup>. Außerdem konnte gezeigt werden, dass STAT3 auch an der Vermittlung der Kardioprotektion im Zweiten Fenster der Anästhetika-induzierten Präkonditionierung beteiligt ist.<sup>86</sup> Es konnte gezeigt werden, dass die Pim-1 Kinase sowohl reduzierend auf die Apoptose der Kardiomyozyten und somit die Größe eines Myokardinfarktes wirkt, als auch anti-hypertrophe Eigenschaften aufweist.<sup>79,80</sup> Die gleichen Attribute wurden zuvor Akt zugeschrieben.<sup>49,72</sup>

Die Pim-1 Kinase phosphoryliert verschiedene nachgeschaltete Proteine, darunter auch das pro-apoptotische Molekül Bad (Bcl-2-Antagonist of Cell Death). Die Phosphorylierung erfolgt spezifisch am Serinrest 112, was eine Inaktivierung von Bad zur Folge hat.<sup>87</sup> Phosphorylierung von Bad durch Akt erfolgt wiederum spezifisch am Serinrest 136, welches ebenfalls zur Inaktivierung von Bad führt.<sup>88</sup> Dies lässt vermuten, dass die Pim-1 Kinase eine zentrale Stellung bei der Verhinderung des Zelltods einnimmt, da die Inaktivierung von Bad zu einer Steigerung der Aktivität des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) führt und somit das Überleben der Zelle sichert.<sup>87,88</sup>

Im Jahr 2009 konnte im Mausmodell zudem gezeigt werden, dass die Desfluran-induzierte Präkonditionierung und die IPC gegen Myokardinfarkt via Pim-1 Kinase vermittelt werden.<sup>89</sup> Die Inaktivierung von Bad durch Phosphorylierung mittels Pim-1 Kinase steigert die Bcl-2 Aktivität.<sup>87</sup> Durch die Aktivierung von Bcl-2 wird die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Intermembranraum der Mitochondrien in das Zytosol verhindert.<sup>90</sup> Diese Freisetzung induziert eine apoptotische Kaskade, welche Caspase-3<sup>91</sup> aktiviert und mit mitochondrialer Depolarisation einhergeht.<sup>37,90,92</sup> Desfluran-induzierte Präkonditionierung und IPC führen zu einer verminderten Freisetzung von Cytochrom C und ermöglichen das Überleben der Zelle.<sup>89</sup>

## 1.5 Das proapoptotische Protein Bad

Bad gehört zur Proteinfamilie Bcl-2, die aus anti-apoptotischen Mitgliedern (Bcl-2, Bcl-X<sub>i</sub>, MCL-1, A1) und pro-apoptotischen Mitgliedern (Bad, BAX, BAK, BCL-X<sub>s</sub>, BID) besteht und deren Aufgabe in der Regulation von Apoptose und Überleben der Zelle liegt.<sup>93</sup>

Bad wird durch reversible Phosphorylierung reguliert.<sup>4,91</sup> Unphosphoryliert liegt es an Bcl-X<sub>i</sub> und Bcl-2 gebunden vor und inhibiert dadurch deren anti-apoptotische Aktivität bzw. fördert die Apoptose der Zelle.<sup>94</sup> Phosphorylierung von Bad an Serin<sup>112</sup>, Serin<sup>136</sup> und/oder Serin<sup>155</sup> durch verschiedene Kinasen wie Akt<sup>95</sup>, Proteinkinase A<sup>96</sup>, Rsk1<sup>67</sup>, Pim-1<sup>87</sup> oder Pim-2<sup>97</sup> löst die Bindung von Bcl-X<sub>i</sub> und Bcl-2 und führt zur Abspaltung von Bad von der Mitochondrienoberfläche und der Diffusion ins Zytosol<sup>68</sup>. Im Zytosol liegt Bad inaktiviert an 14-3-3 gebunden vor,<sup>7</sup> ein hochkonserviertes, ubiquitär in verschiedenen Isoformen bei Säugetieren vorkommendes Protein, das u.a. die Aktivität von Proteinkinasen steigern kann. Diese Kaskade, die zum Überleben der Zelle führt, kann z. B. durch Interleukin-3 angestoßen werden.<sup>98</sup> In Abwesenheit von Überlebenssignalen kann Bad durch das Protein Phosphatase 2 dephosphoryliert bzw. aktiviert werden und die Apoptose der Zelle einleiten.

## 1.6 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der Pim-1 Kinase im Zweiten Fenster der Desfluran-induzierten Präkonditionierung gegen Myokardinfarkt untersucht. Als Endpunkte der Untersuchung wurden das Ausmaß der Myokardinfarkte sowie die Veränderungen in der Expression von Pim-1 Kinase, Bad und phosphoryliertem Bad<sup>Ser112</sup> (phospho-Bad<sup>Ser112</sup>) im Zweiten Fenster der Präkonditionierung mit Desfluran gewählt.

Es wurde die Hypothese getestet, dass das Zweite Fenster der Desfluran-induzierten Präkonditionierung zur Protektion vor Myokardinfarkt über anti-apoptotische und kardioprotektive Effekte der Pim-1 Kinase vermittelt wird.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Versuchsgenehmigung**

Gemäß des Tierschutzgesetzes über Versuche an lebenden Tieren wurde ein Antrag bei der entsprechenden Behörde bei der Regierung von Unterfranken eingereicht und eine Genehmigung lag unter der Nummer 43/09 vor.

### **2.2 Durchführung der Untersuchung**

#### **2.2.1 Versuchstiere**

Alle Untersuchungen wurden an männlichen C57BL/6 Mäusen (Harlan Horst, Niederlande) durchgeführt. Die Tiere waren zwischen 8 und 12 Wochen alt und ihr Gewicht lag zwischen 20 und 25 g. Sie wurden in einer Kleintierhaltung bei zwölfstündigem Tag- und Nachtrhythmus gehalten und hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Nahrung bis zum Vorabend des Experiments.

#### **2.2.2 Präkonditionierung**

Zur Präkonditionierung wurden die Tiere für 15 Minuten in einem Käfig gehalten, der zuvor mit einem Gemisch aus 50% Raumluft, 50% Sauerstoff und 1,0 MAC Desfluran geflutet worden war. Während der Desfluran-Konditionierung wurde zur Überwachung ein 3-Kanal EKG abgeleitet.

#### **2.2.3 Narkose**

Die Narkose der Mäuse wurde durch intraperitoneale Injektion von 60 µg/gKG Natrium-Pentobarbital (Merial, Hallbergmoos, Deutschland) herbeigeführt. Zur Aufrechterhaltung erhielten die Mäuse nach Bedarf weitere intraperitoneale Injektionen von 15 µg/gKG. Zur Überprüfung der Narkosetiefe wurden in regelmäßigen Abständen der Korneal-Reflex sowie der Fußwegzieh-Reflex der

Hinterpfote nach Druckreiz der Zehe getestet. Für die Dauer des Experiments wurden die Mäuse in Rückenlage auf einer temperaturkontrollierten Heizplatte (FMI, Seeheim, Deutschland) platziert, welche die rektale Temperatur konstant bei 37°C hielt.

#### **2.2.4 Intubation und Beatmung**

Um die Intubation zu erleichtern wurde nach Narkoseinduktion der Oberkiefer mithilfe eines Gummibandes auf der Platte fixiert. Die Zunge wurde zurückgezogen um die Trachea mit einer 22-Gauge Venenverweilkanüle (B.Braun, Melsungen, Deutschland) unter Sicht zu intubieren. Die Mäuse wurden mit einem 1:1 Sauerstoff-Luftgemisch mittels eines Kleintier-Beatmungsgeräts (SAR-P 830, CWE Inc., Ardmore, PA) druckkontrolliert beatmet. Es wurden eine Frequenz von 130 Atemzügen pro Minute, ein positiver endexpiratorischer Druck (PEEP) von 1-3 cmH<sub>2</sub>O und ein maximaler Beatmungsdruck von 30 cmH<sub>2</sub>O gewählt.

#### **2.2.5 Präparation**

Zur Überwachung von Herzfrequenz und ST-Strecke wurde ein 3-Kanal-Elektrokardiogramm (EKG) abgeleitet. Des Weiteren wurde ein mit 0,9%iger NaCl-Lösung gefüllter PE-10 Katheter, der mit einem Druck-Messwandler (Combitrans, B. Braun, Melsungen, Deutschland) verbunden wurde, nach medianer Inzision des Halses in der rechten Arteria carotis communis zur arteriellen Blutdruckmessung platziert. Es schloss sich die Kanülierung der rechten Vena jugularis zum Flüssigkeitsmanagement (20µl/g/h) an. Im fünften Interkostalraum linksseitig erfolgte die Thorakotomie. Nach Präparation der Musculi pectorales und der Pleura mithilfe eines Elektrokauters (FST, Heidelberg, Deutschland) wurde ein Rippenspreizer (Noras, Würzburg, Deutschland) eingesetzt um das Herz darzustellen. Der absteigende Ast der linken Koronararterie (left anterior descending coronary artery, LAD) wurde nach

Eröffnung des Perikards aufgesucht und mit einem 6-0 Seidenfaden umlegt. Die beschriebenen Schritte erfolgten unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskops (OPMI-9-FC, Zeiss, Jena, Deutschland).

### **2.2.6 Myokardiale Ischämie und Reperfusion**

Die Enden des Fadens wurden durch ein Silikonröhrchen geführt, mit standardisierten Gewichten versehen und über einer höhenverstellbaren Konstruktion - bestehend aus zwei parallelen Metallstangen - platziert. Zur Induktion der Ischämie wurden die Stangen nach oben gefahren, sodass die Gewichte auf beiden Seiten herunterhingen und sich die 1-2mm unterhalb des linken Herzhohls vorgelegte Schlinge schloss.<sup>95</sup> Die erfolgreiche Okklusion der LAD konnte durch ST-Strecken-Hebung im EKG und Erblässen des betroffenen Myokardareals verifiziert werden. Die Reperfusion wurde durch Entfernung der Gewichte bzw. durch Absenken der Metallstangen erreicht. Die Normalisierung des EKGs und die reflektorische Hyperämie des Myokards zeigten den Erfolg der Reperfusion an.

### **2.2.7 Abschluss des Experiments**

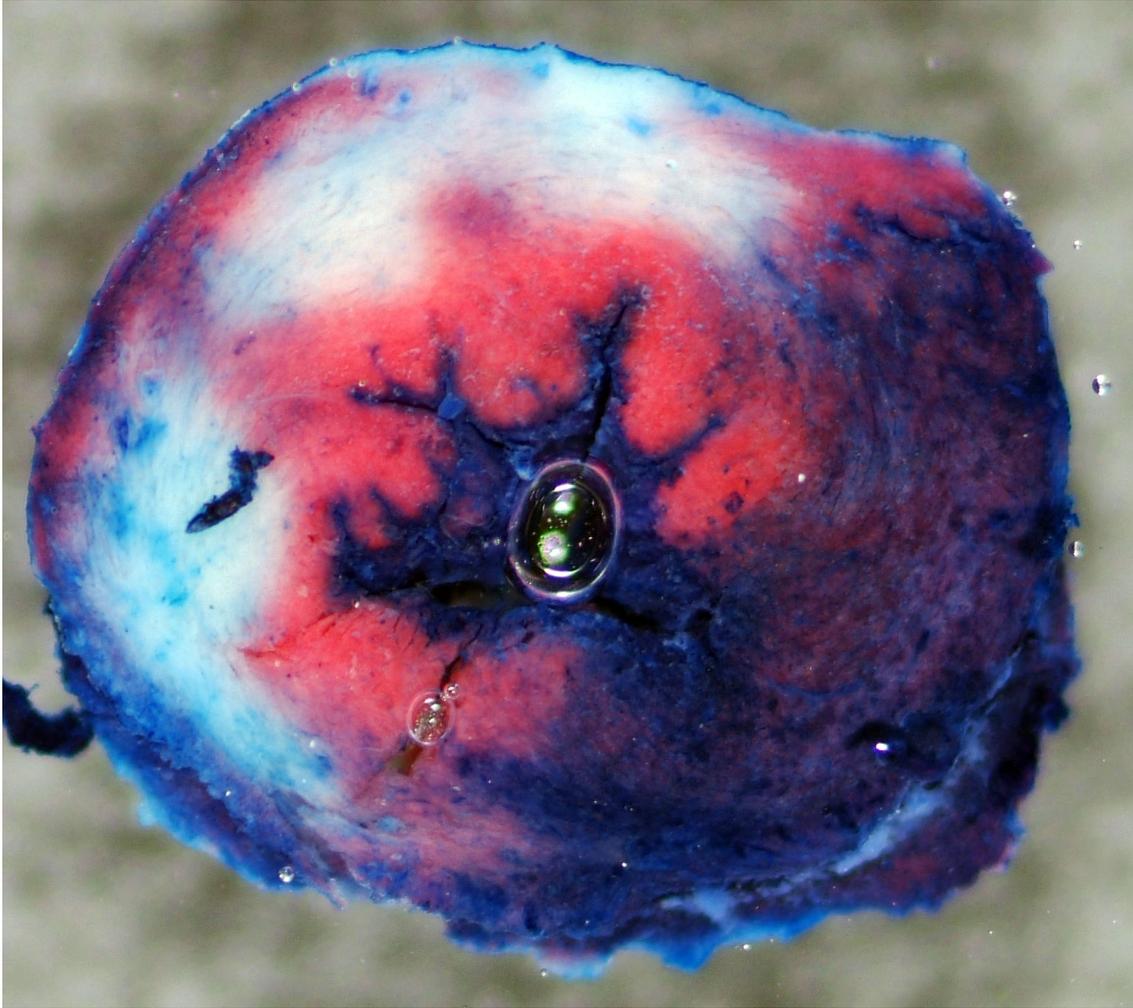
Zur Beendigung des Versuchs wurde die LAD nach dreistündiger Reperusionsphase erneut mithilfe der Schlinge okkludiert. Über den Katheter in der A. carotis wurde langsam 1ml Evans Blau (0,1 g/ml; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) verabreicht, das durch die erneute Okklusion der LAD nur im nicht-ischämischen Gewebe anfluten konnte und so das Risikoareal (area at risk, AAR) demaskierte. Den Mäusen wurde intraperitoneal eine letale Dosis Natrium-Pentobarbital (150µg/g) verabreicht und das Herz wurde rasch entfernt. Nach Abspülen der überschüssigen Farbe wurden die Vorhöfe und der rechte Ventrikel abpräpariert und der linke Ventrikel wurde für 20min bei -20°C gekühlt. Unter Zuhilfenahme einer Acrylmatrix (Aster Industries, McCandles, PA) wurde der linke Ventrikel in 1mm dünne Transversalschnitte zerteilt. Danach wurden

diese bei 37°C mit 2%iger 2,3,5-Triphenyltetrazolium-chlorid-Lösung (TTC, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), die mit NaOH auf einen pH von 7,4 gepuffert wurde, für weitere 30min inkubiert.

Anschließend wurden die Schnitte in 10%iger Formaldehydlösung (Otto Fischer GmbH und Co. KG, Saarbrücken Deutschland) über Nacht fixiert. Die in lebenden Zellen vorhandenen Enzymsysteme reduzieren TTC zu einem roten Farbstoff, welcher die vitalen Gewebeabschnitte rot erscheinen lässt, während sich die ischämischen Gewebeanteile ungefärbt präsentieren.<sup>99</sup>

### **2.2.8 Auswertung**

Die Auswertung der Gewebeschnitte fand am Folgetag des Experiments statt. Die einzelnen Schnitte wurden gewogen und zusammen mit 0,9%iger NaCl-Lösung zwischen zwei Deckgläsern platziert. Alle Schnitte wurden von beiden Seiten mit einer hochauflösenden Digitalkamera (Finepix S3 Pro, Fujifilm, Tokyo, Japan) fotografiert und die digitalen Bilder wurden anschließend mit Hilfe eines Bildbearbeitungsprogramms (Adobe Photoshop CS 8.0.1; Adobe Systems Inc., San Jose, CA) auf einem Personal Computer (Fujitsu Siemens, Augsburg, Deutschland) ausgewertet. Die einzelnen Zonen, ischämisches Areal (rot), infarziertes Areal (ungefärbt) und nicht-ischämisches Areal (blau) wurden entsprechend ihres Farbverlaufs markiert und mittels Bildbearbeitungsprogramm planimetrisch vermessen. Der errechnete Anteil der einzelnen Zonen wurde daraufhin mit dem Gewicht der jeweiligen Schnitte multipliziert und die Infarktgröße als Prozentwert der AAR angegeben. Wiesen die Tiere eine gravitoplanimetrisch bestimmte AAR von weniger als 20% des linken Ventrikels auf, wurden sie aus der Versuchsreihe ausgeschlossen.



**Abbildung 3: Hochauflösende Fotografie eines Gewebeschnitts des linken Ventrikels**

Gemäß des Farbverlaufes wurden ischämisches Areal (rot), infarziertes Areal (ungefärbt) und nicht-ischämisches Areal (blau) unterschieden.

## **2.3 Experimentelles Protokoll**

### **2.3.1 Protokoll zur Infarktgrößenbestimmung**

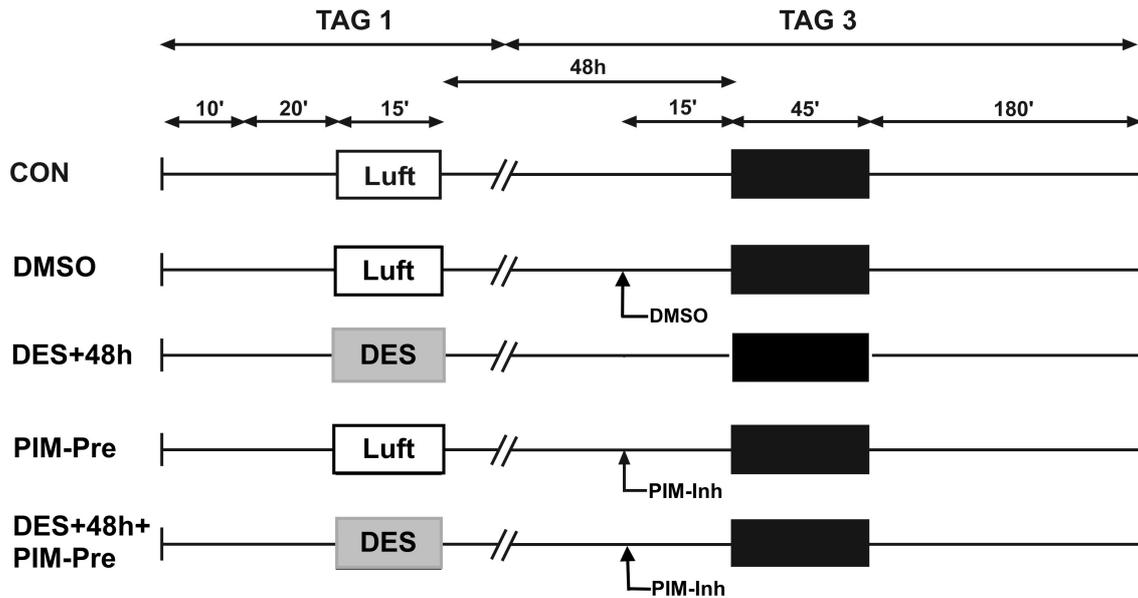
Die Mäuse wurden randomisiert in die Versuchsgruppen 1-5 aufgeteilt. Zwei Gruppen (DES+48h, DES+48h+PIMPre) wurde 48h vor dem Experiment für 15 Minuten 1 MAC (minimale alveoläre Konzentration) Desfluran (7,5Vol%)<sup>100</sup> zur Präkonditionierung verabreicht, die anderen Gruppen atmeten weiter Raumluft.

Bis zum Vorabend des Versuchstages verblieben die Tiere in ihrer gewohnten Umgebung im Tierstall und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser.

Am Versuchstag erhielten alle Tiere eine Narkose mit Natrium-Pentobarbital, die für die gesamte Versuchsdauer aufrechterhalten wurde. Das Versuchsprotokoll begann nach der Präparation und Instrumentierung der Tiere und erstreckte sich über insgesamt 240 Minuten.

In der ersten Phase des Protokolls wurde den Tieren eine 30minütige Äquilibrationsphase gewährt. Die in dieser Phase aufgezeichneten hämodynamischen Parameter dienten als Ausgangswerte (Baseline). Daran schloss sich die 45minütige Interventionsphase in Form der Koronararterienokklusion (coronary artery occlusion, CAO) an.

Alle Gruppen erhielten für die gesamte Dauer des Protokolls eine kontinuierliche NaCl-Infusion (0,9%) über den Katheter in der Vena jugularis. Bei den Tieren der Kontrollgruppe (CON) sowie bei einer der präkonditionierten Gruppen (DES+48h) erfolgte keine weitere Intervention. 15 Minuten vor der Koronararterienokklusion wurde der hochselektive<sup>101</sup> PIM-Inhibitor (2-hydroxy-3-cyano-4-phenyl-6-(3-bromo-6-hydroxyphenyl) Pyridin, Pim-1 Kinase-Inhibitor II, 10µg/g) in der Trägersubstanz DMSO (Dimethylsulfoxid, Merck, Darmstadt, Germany) gelöst und sowohl einer präkonditionierten als auch einer unbehandelten (DES+48h+PIM-Pre bzw. PIM-Pre) Gruppe intraperitoneal verabreicht. Eine weitere Gruppe erhielt zum gleichen Zeitpunkt nur die Trägersubstanz DMSO. Nach Wiedereröffnung des Koronararterienverschlusses begann die 180minütige Reperfusionphase bei der bis zur Terminierung des Experiments keine weiteren Interventionen erfolgten. Das Versuchsprotokoll der Studie ist in Abbildung 4 dargestellt.



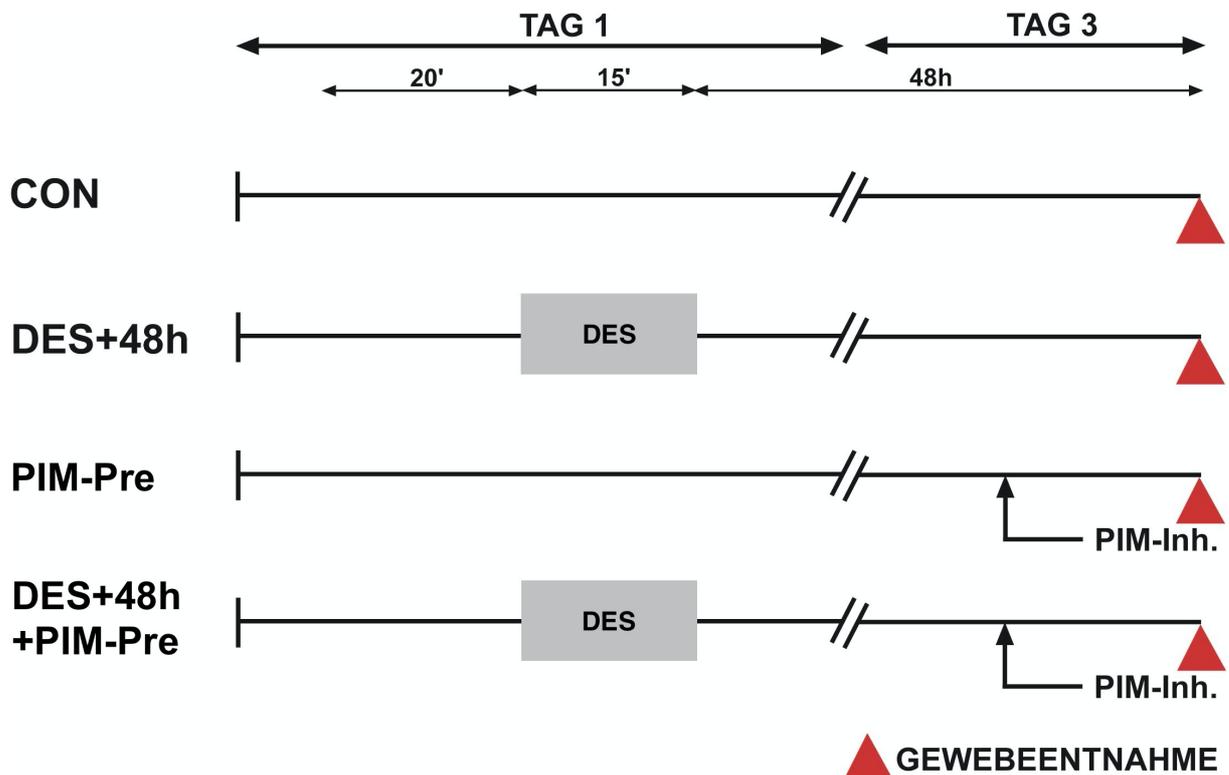
**Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls**

CAO (schwarzer Balken) = Koronararterienokklusion; CON = Kontrollgruppe; DMSO = Gabe von DMSO 15 Minuten vor CAO; DES+48h = 15minütige Gabe von 1 MAC Desfluran 48h vor der CAO; PIM-Pre = Gabe des Pim-1 Kinase Inhibitor II (10µg/g) 15 Minuten vor CAO; DES+48h+PIM-Pre = 15minütige Gabe von 1 MAC Desfluran 48h vor der CAO + Gabe des Pim-1 Kinase Inhibitor II (10µg/g) 15 Minuten vor CAO

### 2.3.2 Protokoll zur Organentnahme

In einer weiteren Versuchsreihe wurden Mäuse mittels Pentobarbital euthanasiert und die Herzen zur anschließenden molekularbiologischen Untersuchung entnommen. Es erfolgte eine Randomisierung in vier Gruppen. Zwei Gruppen (DES+48h, DES+48h+PIM-Pre) erhielten 48h vor der Entnahme 1 MAC Desfluran für 15 Minuten. Am Tag der Entnahme wurde einer präkonditionierten und einer unbehandelten Gruppe der PIM-Inhibitor verabreicht (DES+48h+PIM-Pre bzw. PIM-Pre). Eine Gruppe, bei der keine weitere Intervention erfolgte, diente als Kontrolle (CON). Die Entnahme von Myokardgewebe fand zum Zeitpunkt der fiktiven CAO statt. Ziel der Gewebeuntersuchung war es die Expression von Pim-1 Kinase und Bad sowie die Phosphorylierung von Bad an Serin<sup>112</sup> zum Zeitpunkt des Zweiten Fensters

der Präkonditionierung zu bestimmen. Das experimentelle Protokoll ist in Abbildung 5 dargestellt.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des experimentellen Protokolls**  
 CON = Kontrollgruppe; DES+48h = 15minutige Gabe von 1 MAC Desfluran 48h vor Entnahme des Myokardgewebes; PIM-Pre = Gabe des Pim-1 Kinase Inhibitors II am Tag der Entnahme des Myokardgewebes; DES+48h+PIM-Pre = 15minutige Gabe von 1 MAC Desfluran 48h vor Entnahme des Myokardgewebes + Gabe des Pim-1 Kinase Inhibitors II am Tag der Entnahme des Myokardgewebes.

## 2.4 Western Blotting

Die Herzen wurden zum Zeitpunkt der fiktiven CAO rasch exzidiert, der linke Ventrikel wurde vom Vorhof und dem rechten Herzen getrennt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Ventrikel bei

-80°C aufbewahrt. Zur Testung wurden die Herzen in eiskaltem Radioimmunopräzipitations-Assay-Puffer (RIPA-Puffer) mit einem Homogenisator (IKA®RW14 basic, IKA® Werke, Staufen, Deutschland) auf Eis bei 1500 U/min für 30 Sekunden homogenisiert und bei 4°C mit 12 000 x g zentrifugiert (Sepatech Megafuge 1,0R, Heraeus, Hanau, Deutschland). Zytosolische und korpuskuläre Zellfragmente, die sich im Überstand befanden wurden nicht getrennt und für weitere Testungen aufbewahrt.

Verwendete Lösungen:

PBS (5-fach) pH 7,4:

41,17 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

11,73 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

20 g NaCl (Sigma Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

930 ml H<sub>2</sub>O (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland)

RIPA-Puffer:

97,5 ml PBS

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

0,5% Sodium Desoxycholic Acid (Sigma Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

0,1% Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamid (Sigma Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

Für phospho-Proben zusätzlich:

Proteaseinhibitor (Complete mini, Roche diagnostics, Mannheim, Deutschland)

NaFl 20 mM (Sigma Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

Na-Vanadat 1 mM (Sigma Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

60µg Protein wurden in ein Reaktionsgefäß pipettiert und mit RIPA-Puffer auf 20µl aufgefüllt. Es wurden 20µl Laemmli Puffer (BioRad, Hercules, CA, USA) mit 0,5% β-Mercapto-Ethanol (Sigma Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

hinzugefügt und für 5 Minuten bei 95°C in einem Wärmeblock (Techne, Dri-Block® DB-2A, Cambridge, UK) denaturiert. Es folgte die Zentrifugierung mit 10 000 x g (Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg, Deutschland).

Um Veränderungen im Proteinexpressionsmuster mittels Western Blotting feststellen zu können, wurden die Proteinproben zunächst mithilfe der Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Dafür wurden die Proteine auf ein 15%iges Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel geladen, elektrophoretisch getrennt (Mini-PROTEAN 3, BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland) und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran (Protran, Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) übertragen.

#### Verwendete Lösungen:

##### Zusammensetzung des Trenngels (15%):

2,35 ml H<sub>2</sub>O (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland)

2,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8 (Tris ultrapure AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)

100 µl 10% SDS (Sigma Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

5 ml Acrylamide/ Bis (30:2) (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)

50 µl APS

5 µl TEMED (Sigma Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

##### Zusammensetzung des Sammelgels (5%):

2,85 ml H<sub>2</sub>O (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland)

1,25 ml 0,5 M Tris pH 6,8 (Tris ultrapure AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)

50 µl 10% SDS (Sigma Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

850 µl Acrylamide/ Bis (30:2) (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)

25 µl 10% APS

5 µl TEMED (Sigma Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

#### Elektrophorese-Puffer (5 fach) pH 8,3:

15 g Tris (Tris ultrapure AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)

72 g Glycin (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)

5 g SDS (Sigma Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

900 ml H<sub>2</sub>O (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland)

#### Transfer-Puffer

200 ml Elektrophorese-Puffer (5-fach)

200 ml Methanol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

600 ml H<sub>2</sub>O (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland)

Die Membranen wurden mit 2,5%igem nicht-fetthaltigem Milchpulver (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland) und 2,5%igem Albuminpulver aus Rinderserum (Sigma Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) in PBS-Tween 20 versetzt (1 Stunde bei Raumtemperatur) um den unspezifischen Hintergrund zu blockieren. Die Membranen wurden daraufhin mit folgenden Antikörpern inkubiert:

- anti-Pim-1 Kinase 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)
- anti-Bad 1:50 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)
- anti-phospho-Bad<sup>Ser112</sup> 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)

Zur Kontrolle dienten die Antikörper Maus anti-GAPDH 1:3000 (Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase; Millipore, Billerica, MA) und Maus anti- $\alpha$ B-Crystallin 1:3000 (Assay Designs, Ann Arbor, MI).

Die Zweitantikörper anti-Maus und anti-Kaninchen (beide GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) wurden aufgetragen, sodass die Proteinbanden mittels ECL<sup>®</sup> Detektionsreagenz (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) dargestellt werden konnten. Anschließend wurden sie auf einem Röntgenfilm (Fuji medical X-Ray Film, Düsseldorf, Deutschland) aufgenommen und unter Zuhilfenahme eines Röntgenfilmentwicklers (Kodak X-omat 2000, Kodak, New York, USA) sichtbar gemacht. Nach einscannen der Filme konnte die optische Dichte der Proteinbanden mittels ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda,

Maryland, USA) ermittelt werden und auf die Expression der Ladekontrollen genormt werden. Die Proteinexpression in der Kontrollgruppe wurde mit 100% definiert.

## **2.5 Auswertung und Statistik**

Während des gesamten Versuchsprotokolls wurden das EKG, systemische hämodynamische Parameter (Herzfrequenz und mittlerer arterieller Blutdruck (MAD)) und die Körpertemperatur kontinuierlich mit einer speziellen Software (Notocord® hem 3.5, Croissy sur Seine, Frankreich) protokolliert und analysiert. Aufgrund unserer Daten aus vorhergehenden Studien mit diesem Modell<sup>49,102</sup> erwarteten wir eine Myokardinfarktgröße (infarct size, IS) von 50% im Verhältnis zur AAR. Die Poweranalyse hatte gezeigt, dass eine Gruppengröße von  $n=7$  notwendig ist um eine Reduktion des Infarkts um 20% mit einer Power von 0,8 und einem Fehler 1. Art von 0,05 („p“) zu detektieren.

Alle erhobenen Daten wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung überprüft. Zur statistischen Analyse innerhalb und zwischen den Gruppen wurde eine einseitige bzw. zweiseitige Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Es schloss sich ein Post hoc Duncan Test an. Alle oben genannten statistischen Analysen wurden mittels SPSS 15.0 (The Apache Software Foundation, Forrest Hill, MD) ausgeführt. Als statistisch signifikant erachtet wurden Unterschiede bei den Mittelwerten, wenn  $p < 0,05$  war. In der Tabelle sind die Daten als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben.

### **3. Ergebnisse**

Insgesamt wurden 66 Mäuse untersucht, bei 42 Tieren wurde das Ischämie-Reperfusion-Protokoll durchgeführt. 38 Mäuse konnten ausgewertet werden, da 4 Tiere aus der Studie ausgeschlossen werden mussten. Der Grund des Ausschlusses lag in einer AAR unter 20% (ein Tier in der PIM-Pre Gruppe, eines in der DES+PIM-Pre) oder es kam zu Kammerflimmern während der Reperfusionphase (zwei Tiere in der DES+48h Gruppe). 24 Mäuse wurden zur Messung der Proteinexpression mittels Western Blotting eingesetzt.

#### **3.1 Hämodynamische Parameter und ischämisches Areal**

Es gab keine Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich des Körpergewichts, des linksventrikulären Gewichts und des Gewichts der AAR. Die relative Größe der AAR im Verhältnis zum linken Ventrikel (AAR/LV) zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (siehe Tabelle 1). Die Herzfrequenz sowie der mittlere arterielle Druck (MAD) während des Versuchsprotokolls sind in Tabelle 2 dargestellt und zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

**Tabelle 1: Körpergewicht und Planimetrie**

	n	KG (g)	LV (mg)	LV/KG (%)	AAR (mg)	IS (mg)	IS/LV (%)	AAR/LV (%)
<b>CON</b>	8	26,4±0,6	72,9±2,8	0,28±0,01	27,0±2,9	12,8±1,6	17,4±1,8	36,6±3,0
<b>DMSO</b>	8	26,6±1,0	74,8±3,3	0,28±0,01	29,5±3,1	12,9±2,3	16,8±2,6	39,0±2,8
<b>DES+48h</b>	8	26,3±0,7	76,2±3,7	0,29±0,01	27,9±1,7	6,7±1,4	8,9±1,8	37,2±2,9
<b>PIM-Pre</b>	7	25,3±0,9	70,8±4,0	0,28±0,01	23,8±2,3	9,7±0,9	13,9±1,4	33,7±3,0
<b>DES+48h+PIM-Pre</b>	7	26,0±0,8	72,6±3,9	0,28±0,01	22,7±1,6	7,8±1,1	10,7±1,4	31,4±1,6

Alle Daten sind Mittelwerte ± SEM. KG = Körpergewicht; LV = linker Ventrikel; AAR = area at risk (Risikoareal); IS = infarct size (Myokardinfarktgröße); CON = Kontrollgruppe; DMSO = Dimethylsulfoxid; DES+48h = Desflurangabe 48h vor Koronararterienokklusion; PIM-Pre = Gabe des Pim-1 Kinase Inhibitors vor der Koronararterienokklusion

**Tabelle 2: Hämodynamische Parameter**

	Baseline	PräCAO	CAO	PostCAO	Reperfusion		
<u>HF (min<sup>-1</sup>)</u>					60min	120min	180min
<b>CON</b>	495±16	494±18	477±14	475±9	467±15	444±9*	440±14*
<b>DMSO</b>	498±12	488±13	465±14*	460±15*	462±12*	457±10*	460±8*
<b>DES+48h</b>	477±13	484±17	448±15	448±19	443±9	452±12	468±15
<b>PIM-Pre</b>	518±15	499±16	487±15	487±17	483±12	488±17	469±24
<b>DES+48h +PIM-Pre</b>	493±15	505±15	506±21	496±17	478±8	493±15	499±14 <sup>#</sup>
<b>MAD (mmHg)</b>							
<b>CON</b>	71±3	68±5	64±3	71±3	66±5	66±3	71±5
<b>DMSO</b>	72±3	64±2*	61±4	63±4	61±3*	58±3*	62±4*
<b>DES+48h</b>	71±3	67±3	60±3	68±4	61±3	63±3	62±4
<b>PIM-Pre</b>	73±4	67±2	60±1*	61±2	60±2*	63±3	61±3 <sup>#</sup>
<b>DES+48h +PIM-Pre</b>	76±3	68±1*	60±2*	60±2 <sup>*#</sup>	59±1*	62±5	58±3 <sup>*#</sup>

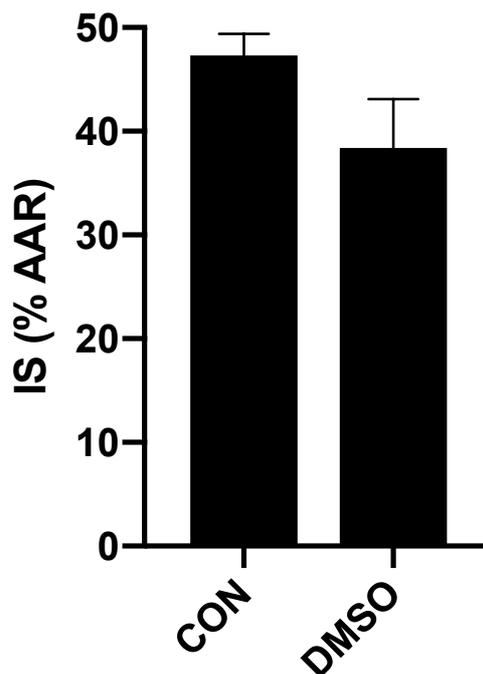
Alle Daten sind Mittelwerte ± SEM, n= 7-8 pro Gruppe.

\* signifikant ( $p < 0.05$ ) verschieden zu Baseline; # signifikant verschieden zur Kontrollgruppe. HF = Herzfrequenz; MAD = mittlerer arterieller Druck; CON = Kontrollgruppe; DMSO = Dimethylsulfoxid; DES = Desfluran; PIM-Pre = Pim-1 Kinase Inhibitor vor Koronararterienokklusion verabreicht; Die Daten wurden am Ende der Äquibrierungsphase (Baseline), vor der Koronararterienokklusion (PräCAO), während der Koronararterienokklusion (CAO), während der frühen Reperfusionsphase (PostCAO) und nach 60, 120 und 180 Minuten Reperfusionszeit (Reperfusion 60min, 120min, 180min) registriert.

### 3.2 Herzinfarktgröße

Die Herzinfarktgröße der Kontrollgruppe betrug 47,3% (CON: 47,3±2,1%, n=8) des Risikoareals. Die Applikation der Trägersubstanz beeinflusste die Infarktgröße nicht signifikant (DMSO: 38,4±4,7% n=8) gegenüber der Kontrollgruppe (s. Abbildung 6). Die Applikation des volatilen Anästhetikums Desfluran 48h vor der Koronararterienokklusion führte zu einer signifikanten Infarktgrößenreduktion (DES+48h: 23,4±3,8%, n=8). Wurde den präkonditionierten Mäusen vor der

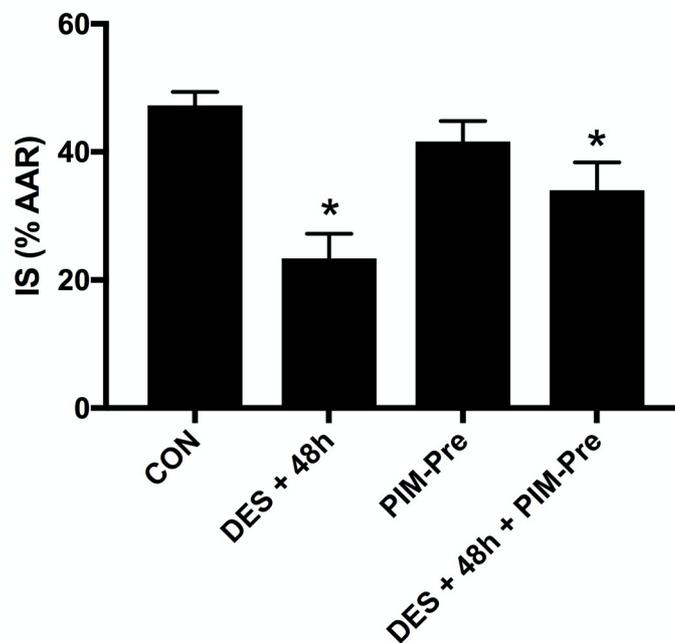
Koronararterienokklusion der PIM-1 Kinase-Inhibitor injiziert, konnte der infarktgrößenreduzierende Effekt von Desfluran tendenziell abgeschwächt werden (DES+48h+PIM-Pre:  $34,0 \pm 4,4\%$  n=7), die Größe des Myokardinfarktes blieb jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verringert. Die alleinige Gabe des PIM-1 Kinase-Inhibitors vor der Koronararterienokklusion (PIM-Pre:  $41,6 \pm 3,2\%$  n=7) hatte keinen signifikanten Effekt auf die Infarktgröße (s. Abbildung 7). Des Weiteren zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Größe der AAR zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen.



**Abbildung 6: Darstellung der Herzinfarktgrößen (IS) in Prozent des linksventrikulären ischämischen Areals (AAR)**

Alle Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Die Tiere erhielten entweder keine Intervention (CON) oder die Trägersubstanz DMSO (Dimethylsulfoxid) 15 Minuten vor der Koronararterienokklusion (DMSO).



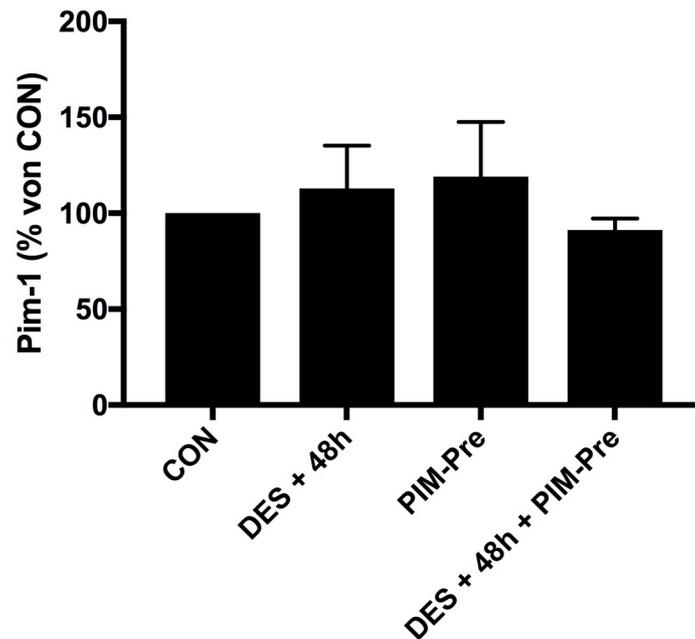
**Abbildung 7: Darstellung der Herzinfarktgrößen (IS) in Prozent des linksventrikulären ischämischen Areals (AAR)**

Alle Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*signifikant ( $p < 0.05$ ) verschieden zur Kontrollgruppe.

Die Tiere erhielten entweder keine Intervention (CON) oder Desfluran 48h vor der Koronararterienokklusion (DES+48h). Die Gabe des Pim-1 Kinase Inhibitors erfolgte vor der Koronararterienokklusion (PIM-Pre) und auch in Kombination mit der Desflurangabe (DES+48h+PIM-Pre).

### 3.3 Expression Pim-1

Die Proteinexpression der Pim-1 Kinase ist in Abbildung 8 dargestellt. Die Werte der Kontrollgruppe wurden als 100% definiert. Die Expression der Pim-1 Kinase war in allen Gruppen ähnlich stark ausgeprägt und ließ sich weder durch Desfluran (DES+48h:  $112,97 \pm 22,31\%$ ) noch durch die Applikation des Pim-1 Kinase-Inhibitors (PIM-Pre:  $119,12 \pm 28,52\%$ ) oder durch die Kombination aus Präkonditionierung und Pim-1 Kinase-Inhibitor (DES+48+PIM-Pre:  $91,25 \pm 6,03\%$ ) signifikant beeinflussen.

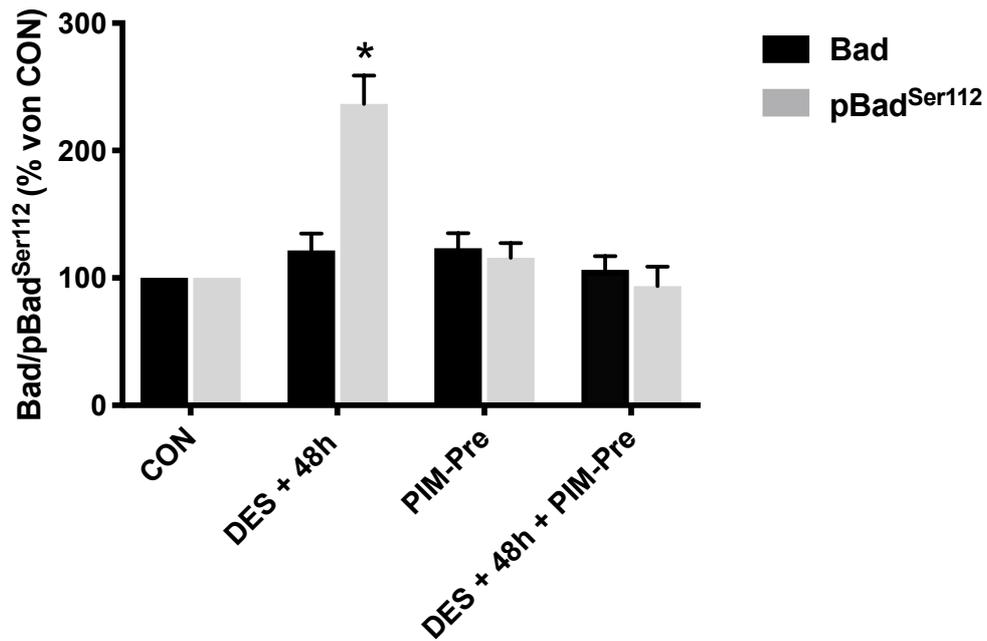


**Abbildung 8: Western Blot Analyse der myokardialen Expression der Pim-1 Kinase**

Es wird das durchschnittliche densitometrische Ergebnis als Prozentwert zur Kontrolle gezeigt (n=6). Alle Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Tiere erhielten entweder keine Intervention (CON) oder Desfluran 48h vor der Entnahme des Myokardgewebes (DES+48h) oder den Pim-1 Kinase-Inhibitor. Die Gabe des Pim-1 Kinase-Inhibitors erfolgte am Tag der Entnahme des Myokardgewebes bei einer unbehandelten (PIM-Pre) und auch bei einer präkonditionierten Gruppe (DES+48h+PIM-Pre).

**3.4 Expression Bad/pBad**

Die Expression von Bad in den einzelnen Gruppen unterschied sich nicht voneinander und ist in Abbildung 9 dargestellt (schwarze Säulen). Die Gabe von Desfluran 48h vor Organentnahme führte zu einer signifikanten Steigerung der Phosphorylierung von Bad an Serin 112 gegenüber der Kontrolle (DES+48h: 236,5 $\pm$ 22,32%, CON: 100%). Die Verabreichung des Pim-1 Kinase-Inhibitors allein führte zu keiner Veränderung der pBad Expression (PIM-Pre: 115,76 $\pm$ 11,63%), konnte aber die Desfluran-induzierte Steigerung der Expression von pBad auf das Niveau der Kontrolle absenken (DES+48h+PIM-Pre: 93,62 $\pm$ 15,18%).



**Abbildung 9: Western Blot Analyse der myokardialen Expression von Bad und an Serin 112 phosphoryliertem Bad**

Es wird das durchschnittliche densitometrische Ergebnis als Prozentwert zur Kontrolle gezeigt (n=6). Alle Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* signifikant ( $p < 0.05$ ) verschieden zu CON.

Die Tiere erhielten entweder keine Intervention (CON) oder Desfluran 48h vor der Entnahme des Myokardgewebes (DES+48h) oder den Pim-1 Kinase-Inhibitor. Die Gabe des Pim-1 Kinase-Inhibitors erfolgte am Tag der Entnahme des Myokardgewebes bei einer unbehandelten (PIM-Pre) und auch bei einer präkonditionierten Gruppe (DES+48h+PIM-Pre).

## 4. Diskussion

Unter Präkonditionierung versteht man die erhöhte Toleranz einer Zelle gegenüber einer länger anhaltenden Ischämie, die durch bestimmte vorangegangene Reize induziert wurde. Als Trigger können kurze ischämische Episoden fungieren, man spricht dann von Ischämischer Präkonditionierung.<sup>13</sup> Auch verschiedene endogene Botenstoffe<sup>10,12</sup>, Pharmaka<sup>21</sup> und auch volatile Anästhetika - dies wird dann als Anästhetika-induzierte Präkonditionierung<sup>29</sup> bezeichnet - können präkonditionierend wirken. Sowohl die IPC, als auch die APC zeigen einen biphasischen Verlauf. Ein protektiver Effekt hält bis zu 3h nach Präkonditionierung an (Erstes Fenster), verschwindet dann und lässt sich erneut erst 24-72h später (Zweites Fenster) nachweisen.<sup>9,23,24,37</sup> Der Zeitraum zwischen Applikation des Triggers und Beginn der Myokardischämie wird als Memoryphase bezeichnet. Das in-vivo Herzinfarktmodell der Maus<sup>103</sup> ist wie das in-vivo Herzinfarktmodell des Kaninchens<sup>104</sup> oder des Hundes<sup>23</sup> ein weit verbreitetes und anerkanntes Modell zur Untersuchung der Mechanismen der Präkonditionierung. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Modell in der Maus zur Untersuchung der Rolle der Pim-1 Kinase im Zweiten Fenster der Desfluran-induzierten Präkonditionierung genutzt.

In den durchgeführten Untersuchungen ließ sich ein kardioprotektiver Effekt nach 15minütiger Applikation von 1 MAC Desfluran 48h vor Myokardischämie zeigen. Es konnte eine signifikante Infarktgrößenreduzierung gegenüber der Kontrollgruppe erzielt werden. Diese Daten stimmen mit den Erkenntnissen von Smul et al. überein, die 2010 im Kaninchenmyokard ein Zweites Fenster durch Desfluran-induzierte Präkonditionierung nachweisen konnten, welches 24-72h nach Präkonditionierung anhält.<sup>9</sup> Auch für die Isofluran-induzierte Präkonditionierung gelang sowohl im Kaninchenmyokard<sup>37</sup> als auch im Mäusemyokard<sup>105</sup> der Nachweis eines protektiven Zweiten Fensters der Präkonditionierung gegen den Ischämie-/Reperfusionsschaden. Die Ergebnisse stimmen mit denen von Baxter et al. überein, die ein Zweites Fenster durch Ischämische Präkonditionierung im Kaninchenmyokard zeigen konnten.<sup>104</sup> Auch für das Myokard der Maus wurde ein Zweites Fenster der Ischämischen Präkonditionierung entdeckt.<sup>106</sup> Zwar konnte im Hundemyokard 24h nach Isofluran-Applikation keine kardioprotektive Wirkung nachgewiesen werden<sup>107</sup>, jedoch scheint dieser Effekt auf Speziesunterschieden zu beruhen. Ein protektives Zweites Fenster im Hundemyokard ließ sich allerdings für die ischämische Präkonditionierung

aufzeigen.<sup>23</sup> Redel et al. demonstrierten im Mausmodell eine signifikante Infarktgrößenreduktion 48h nach Präkonditionierung mit Desfluran.<sup>38</sup> In der gleichen Studie konnte gezeigt werden, dass die Infarktgrößenreduktion 48h nach APC der nach 24h oder 96h überlegen war.<sup>38</sup> Die vorliegenden Resultate entsprechen den Beobachtungen von Redel et. al und legen dar, dass im in-vivo Herzinfarktmodell der Maus 48h nach Desfluran-Gabe eine Infarktgrößen-reduzierende Wirkung zu beobachten ist.

Nach Untersuchungen an Ratten- und Kaninchenherzen stellt die Größe des myokardialen ischämischen Areals (AAR) einen wesentlichen Prädiktor der resultierenden Infarktgröße dar.<sup>108</sup> Je größer die AAR, desto größer ist auch die Infarktgröße. Demzufolge bewirkt eine kleine AAR eine kleinere Infarktgröße. In unseren Untersuchungen war eine AAR von mindestens 20% des linksventrikulären Gewichts gefordert, sodass es wenig wahrscheinlich ist, dass die Ergebnisse allein durch die Größe der AAR beeinflusst wurden, zumal es keine signifikanten Unterschiede in der Größe der AAR zwischen den Versuchsgruppen gab.

Durch die Gabe des selektiven<sup>101</sup> Pim-1 Kinase-Inhibitors 15min vor der Koronararterienokklusion, ließ sich die Infarktgrößen-reduzierende Wirkung von Desfluran zum Teil aufheben, jedoch blieben die Infarktgrößen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verringert. In vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Pim-1 Kinase eine wichtige Bedeutung in den Signaltransduktionskaskaden sowohl des Ersten Fensters der Anästhetika-induzierten Präkonditionierung<sup>89</sup> als auch in der Anästhetika-induzierten Postkonditionierung hat<sup>98</sup>. Die Pim-1 Kinase ist eine Seronin/Threonin-Kinase, die im Kardiomyozyt Akt nachgeschaltet ist und zur Reduktion von Apoptose beiträgt.<sup>79</sup> Durch Phosphorylierung des Proteins Bad am Serinrest 112 durch die Pim-1 Kinase wird Bad inaktiviert und somit die anti-apoptotische Wirkung von Bcl-2 verstärkt.<sup>87</sup> In Experimenten, in denen murine Kardiomyozyten die Pim-1 Kinase überexprimierten, fanden sich erhöhte Konzentrationen der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> zusammen mit gesteigerter Phosphorylierung und Inaktivierung des pro-apoptotischen Bad.<sup>79</sup>

Der Ischämie-/Reperfusionsschaden führt zu zytosolischer Kalziumüberladung und gesteigertem oxidativem Stress in den Kardiomyozyten.<sup>96</sup> Dies triggert die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätspore (mPTP), was zur Depolarisierung der inneren Mitochondrienmembran, der mitochondrialen Schwellung und letztendlich zur Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran und Freisetzung von Cytochrom c führt.<sup>3,109-113</sup> Bcl-X<sub>L</sub> und Bcl-2 verhindern die Cytochrom C-Freisetzung durch Regulation des Membranpotentials der inneren Mitochondrienmembran.<sup>114</sup> Die Überexpression von Pim-1 im Kardiomyozyten während oxidativem Stress trägt zur Stabilisierung des Membranpotentials der inneren Mitochondrienmembran bei und mildert so die Schwellung der Mitochondrien.<sup>90</sup>

Eine Hemmung der Pim-1 Kinase kann die Apoptose der Kardiomyozyten steigern. In-vitro Untersuchungen an hämatopoetischen Zellen der Maus zeigten, dass eine Ausschaltung der Pim-1 Kinase auf Genom-Ebene mittels Retroviren, kombiniert mit einem Mangel an Interleukin 3, zu einer vermehrten ROS-Entstehung führt, die in Folge die mitochondriale Permeabilität erhöht und damit die Apoptose induziert.<sup>88</sup> Darüber hinaus konnte in Experimenten mit Pim-1 Knock-out Mäusen (Pim-KO) eine erniedrigte Konzentration protektiver Proteine, wie Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, pBad, Akt und STAT3 in deren Kardiomyozyten nach Infarkt nachgewiesen werden. Des Weiteren ließen sich in Pim-KO-Mäusen nach Myokardinfarkt signifikant größere Infarktareale beobachten als beim Wildtyp.<sup>79</sup>

Die Feststellung, dass die Infarktgrößen der Gruppen, die mit Desfluran 48h zuvor präkonditioniert wurden und den Pim-Inhibitor erhalten haben, nicht auf Kontrollgruppen Niveau gestiegen sind, lässt sich damit erklären, dass es im Zweiten Fenster der APC noch weitere kardioprotektive Mechanismen gibt, die nicht durch die Pim-1 Kinase vermittelt werden. Neben dem PI3K (Phosphoinositid-3-Kinasen)-Akt-Signalweg<sup>64</sup>, dem die Pim-1 Kinase nachgeschaltet ist<sup>79</sup>, gibt es weitere „early mediators“ des Zweiten Fensters der Präkonditionierung. Hierzu zählen Tyrosinkinasen<sup>65</sup> sowie die Proteinkinase C<sup>66</sup>. Diese können via Steigerung der DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors NFκB die Expression von iNOS erhöhen.<sup>69,115</sup> Zusätzliches NO wird synthetisiert und das Zweite Fenster der Anästhetika-induzierten Präkonditionierung vermittelt.<sup>92,116</sup> Es wird angenommen, dass dieser Signalweg in der Öffnung des mitochondrialen K<sub>ATP</sub>-Kanals seinen

Endpunkt hat.<sup>116</sup> Zahlreiche weitere „early mediators“ wie die MAP-Kinase (mitogen-activated protein)<sup>117</sup> oder die COX-2<sup>37</sup> sind bekannt und tragen ebenfalls zum protektiven Effekt des Zweiten Fensters bei.

Über die erforderliche Dosierung des Pim-Kinase Inhibitors (2-hydroxy-3-cyano-4-phenyl-6-(3-bromo-6-hydroxyphenyl) Pyridin) zur effektiven Suppression der Pim-1 Kinase Aktivität in vivo im Mausmodell liegen derzeit keine Daten vor. Zur Halbwertszeit sowie zur Dauer des Effekts der Inhibition wurden ebenfalls keine Studien durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die Infarktgrößen der Gruppen, die den Pim-1 Kinase Inhibitor nach Desfluran-Präkonditionierung erhalten haben, nur deshalb nicht auf Kontrollgruppen Niveau gestiegen sind, weil die Dosis (10µg/g) nicht ausreichend oder der Zeitpunkt nicht adäquat gewählt wurde. Die hier verwendete Dosis wurde gewählt, da in einer vorangegangenen Studie mit der gleichen Dosis im gleichen Modell in vivo eine Reduktion der Pim-1 Aktivität gezeigt werden konnte.<sup>89</sup> Die vorliegenden Ergebnisse passen jedoch zu Beobachtungen aus anderen Untersuchungen<sup>79,80,94</sup> und deuten daraufhin, dass der kardioprotektive Effekt des Zweiten Fensters der Desfluran-induzierten Präkonditionierung durch die Pim-1 Kinase vermittelt wird, andere Signalwege jedoch ebenso eine Rolle spielen.

Die intraperitoneale Gabe des Pim-Inhibitors II allein hatte keinen Effekt auf die Infarktgröße. Bei Verabreichung vor der Koronararterienokklusion zeigte sich keine signifikante Veränderung der Herzinfarktgröße gegenüber Kontrolluntersuchungen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Pim-1 Kinase beim Ischämie-/Reperfusionsschaden erst dann eine Rolle spielt wenn zuvor präkonditioniert wurde. Aus Ergebnissen anderer Arbeiten im Mausmodell ergibt sich ebenfalls kein Hinweis auf Veränderungen der Infarktgröße nach isolierter Pim-Inhibitor II Applikation.<sup>89</sup> Dies lässt sich auch in Einklang bringen mit Beobachtungen bezüglich der Calcium/Calmodulin-abhängigen Kinase II im Kaninchenmodell. Die gehört wie die Pim-1 Kinase zur Familie der Seronin/Threonin-Kinase<sup>76</sup> und nimmt ebenfalls erst nach Präkonditionierung einen Einfluss auf den Ischämie/Reperfusionsschaden.<sup>118</sup>

Die intraperitoneale Verabreichung des Lösungsmittels Dimethylsulfoxid (DMSO) vor der Koronararterienokklusion hatte keinen Einfluss auf die Infarktgröße bei nicht-

präkonditionierten Gruppen. Dimethylsulfoxid ist ein amphipathisches Molekül mit einem polaren Ende und zwei apolaren Methylgruppen, welche die Löslichkeit in wässrigen und organischen Medien ermöglichen.<sup>119</sup> DMSO dient als Trägersubstanz für den Pim-Inhibitor II und ist als Lösungsmittel verschiedener Substanzen weit verbreitet und anerkannt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können eine Beteiligung von DMSO an der Infarktgrößenreduktion mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschließen.

In der mittels Western Blotting-Analyse untersuchten Expression der Pim-1 Kinase zeigten sich zwischen den einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Weder die Präkonditionierung mit Desfluran, noch die intraperitoneale Injektion des Pim-Inhibitors II führten zu einer Expressionsänderung gegenüber der Kontrollgruppe. Die Entnahme von Myokardgewebe zur Proteinanalyse erfolgte 48h nach der 15-minütigen Desfluran Applikation beziehungsweise zum korrespondierenden Zeitpunkt der anderen Versuchsgruppen. Bereits in früheren Arbeiten wurde im Kaninchenmodell zum Ischämie/Reperfusionsschaden zu diesem Zeitpunkt eine Infarktgrößenreduktion nach Desfluran-Applikation gezeigt.<sup>9</sup> Auch Arbeiten im Mausmodell konnten 48h nach Präkonditionierung mit Desfluran dieses Zweite Fenster der Kardioprotektion nachweisen.<sup>38</sup> Es wird angenommen, dass der kardioprotektive Effekt des Zweiten Fensters der Präkonditionierung durch Neusynthese von protektiven Proteinen ermöglicht wird und nicht nur über gesteigerte Aktivierung bereits synthetisierter Proteine, also posttranslationale Modifikationen wie z.B. Phosphorylierungen, stattfinden.<sup>26,120</sup> Jedoch spielen auch „early mediators“ die über eine Aktivitätssteigerung von Transkriptionsfaktoren erst eine Steigerung der Proteinexpression ermöglichen eine Rolle im Zweiten Fenster der Präkonditionierung.<sup>67-69</sup>

In der hier durchgeführten Untersuchung fand sich keine Expressionssteigerung der Pim-1 Kinase während des Zweiten Fensters. Muraski et al. postulierten 2007, dass kardioprotektive Agenzien die Expression der Pim-1 Kinase signifikant steigern können. In diesen in-vitro Untersuchungen, die an neonatalen Rattenkardiomyozyten stattfanden, wurden Leukämie-inhibierender Faktor (LIF), Insulin-like growth-factor 1 (IGF-1), Dexamethason und Phorbol-12-Myristate-13-Acetat (PMA) als Stimuli eingesetzt.<sup>81</sup> Die Expression dieser Liganden bzw. ihre zugehörigen Rezeptoren sind

im sich entwickelnden und im insuffizienten Herzen gesteigert<sup>121</sup> und beeinflussen die Pim-1 Kinase via Akt, da diese für Zellproliferation und Überleben der Zelle verantwortlich ist.<sup>79</sup> Jedoch konnte bei Stimulationsversuchen mit Phenylephrin, Endothelin-1, Forskolin oder Östradiol keine Expressionssteigerung der Pim-1 Kinase beobachtet werden.<sup>79</sup> Da es sich in der hier vorliegenden Arbeit um Experimente an adulten Mäuse ohne chronische kardiale Beeinträchtigungen handelt, die mit Desfluran präkonditioniert wurden, könnte hierin ein möglicher Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Ergebnisse liegen.

Stimulation mit IGF-1 führt dazu, dass Akt im Zellkern akkumuliert und dadurch kardioprotektiv wirkt.<sup>72</sup> Im Zellkern befindliche Proteinkinase B/Akt steigert die Expression der Pim-1 Kinase im neonatalen Rattenkardiomyozyten. In der gleichen Versuchsreihe konnte Proteinkinase B/Akt, die sich im Zytosol befindet lediglich die Expression der mRNA der Pim-1 Kinase steigern.<sup>79</sup> Im Setting der klassischen Ischämischen Präkonditionierung ist Akt als Teil der Signaltransduktionskette, die den Konditionierungsstimulus von der Zelloberfläche zu den Mitochondrien leitet, fest etabliert.<sup>78</sup> Auch für das Zweite Fenster der Ischämischen Präkonditionierung wurde Akt eine Rolle als Mediator zugesprochen.<sup>64</sup> Auch wenn die Bedeutung von Akt für das Zweite Fenster der Desfluran-induzierten Präkonditionierung noch nicht vollständig geklärt ist, finden sich Hinweise, dass Akt vornehmlich eine Rolle im Zytosol bzw. an den Mitochondrien spielt.<sup>64,122</sup> Da in der vorliegenden Arbeit nur das Pim-1 Protein bestimmt wurde, wäre es denkbar, dass nach Präkonditionierung mit Desfluran ebenfalls erhöhte mRNA Spiegel in den Kardiomyozyten vorliegen, die durch Akt aus dem Zytosol getriggert wurden. Um diese Fragestellung zu beantworten, bedarf es weiterführender Untersuchungen.

Weitere Arbeiten, die sich mit der Expressionssteigerung der Pim-1 Kinase befassten, führten ihre Analysen an pathologisch veränderten Herzen durch. So fand sich nach Myokardinfarkt<sup>79</sup>, nach transverser aortaler Konstriktion (TAC)<sup>79</sup> und in hypertensiven Herzen<sup>80,81</sup> eine gesteigerte Pim-1 Kinase-Expression in Kardiomyozyten. Auch in Pankreaszellen ließ sich die Expression der Pim-1 Kinase durch Hypoxie steigern.<sup>123</sup> Dies legt die Vermutung nahe, dass sich eine Steigerung der Expression des Proteins erst nach Schädigung des Myokards beobachten lässt. Da in der vorliegenden Arbeit die Expression der Pim-1 Kinase im Ventrikelmyokard kardial gesunder Tiere

analysiert wurde, die lediglich mit Desfluran 48h zuvor präkonditioniert wurden, zeigten sich folglich keine erhöhten Protein-Spiegel.

Für die myokardiale Expression von Bad ergaben sich zwischen den einzelnen Gruppen in der Western Blot-Analyse keine signifikanten Unterschiede. Im Vergleich zur Kontrollgruppe veränderte sich die Expression 48h nach Präkonditionierung mit Desfluran, nach Verabreichung des Pim-1 Kinase Inhibitors alleine oder nach Präkonditionierung, nicht. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeiten, die im Kaninchen keine Expressionsänderung von Bad durch Anästhetika-induzierte Präkonditionierung beobachten konnten.<sup>85</sup> Bad, ein proapoptotisches Mitglied der Proteinfamilie Bcl-2<sup>93</sup> wird durch reversible Phosphorylierung reguliert.<sup>4,91</sup> Ein signifikanter Unterschied war in der Expression von phosphoryliertem Bad (pBad<sup>Ser112</sup>) nach vorheriger Präkonditionierung mit Desfluran 48h im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten. Die Gabe des Pim-1 Kinase Inhibitors nach Präkonditionierung konnte die Expression von pBad<sup>Ser112</sup> auf das Niveau der Kontrolle absenken. Der Pim-1 Kinase-Inhibitor alleine hatte keinen Einfluss.

Die Phosphorylierung von Bad erfolgt durch die Pim-1 Kinase spezifisch am Serinrest 112 und führt zu dessen Inaktivierung.<sup>87</sup> Da diese Phosphorylierungsstelle spezifisch für die Pim-1 Kinase ist, kann die Expression von pBad<sup>Ser112</sup> als Surrogatparameter der Pim-1 Kinase Aktivität angesehen werden.<sup>50,87,89</sup> Unphosphoryliert liegt Bad an Bcl-X<sub>1</sub> und Bcl-2 gebunden vor und inhibiert deren anti-apoptotische Aktivität und trägt so zur Apoptose der Zelle bei.<sup>94</sup> Die Phosphorylierung durch die Pim-1 Kinase bewirkt, dass pBad<sup>Ser112</sup> sich von Bcl-X<sub>1</sub> und Bcl-2 löst und die anti-apoptotische Aktivität von Bcl-2 gesteigert wird.<sup>87</sup> Bcl-2 verhindert die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Intermembranraum der Mitochondrien ins Zytosol<sup>90</sup> und sichert somit das Überleben der Zelle.<sup>37,92</sup> Der durch Präkonditionierung mit Desfluran verursachte Anstieg des Surrogatparameters pBad<sup>Ser112</sup> lässt darauf schließen, dass die Aktivität der Pim-1 Kinase durch Präkonditionierung gesteigert wurde. Zwar sind weitere Kinasen bekannt, die Bad spezifisch am Serinrest 112 phosphorylieren (Proteinkinase A<sup>96</sup>, Rsk1<sup>67</sup> und Pim-2 Kinase<sup>97</sup>), jedoch werden diese nicht durch den verabreichten Pim-1 Kinase-Inhibitor gehemmt. Dieser ist selektiv<sup>101</sup> für die Pim-1 Kinase. Das Absinken von pBad<sup>Ser112</sup> nach Verabreichung des Pim-Inhibitors auf Niveau der Kontrolle spricht gegen eine signifikante Bedeutung der anderen Kinasen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der Pim-1 Kinase während des Zweiten Fensters der Desfluran-induzierten Präkonditionierung untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die Pim-1 Kinase einen entscheidenden Anteil an der Vermittlung der Kardioprotektion trägt und eine Reduktion der Infarktgröße zur Folge hat. In unseren Experimenten zeigte sich, dass die Aktivität der Pim-1 Kinase 48h nach Desfluran-induzierter Präkonditionierung gesteigert werden konnte, nicht jedoch deren Expression. Für das Zweite Fenster wird angenommen, dass dieses vor allem durch Transkription und Synthese von kardioprotektiven Proteinen vermittelt wird, während das Erste Fenster vorrangig durch Aktivitätssteigerung in Form von posttranslationalen Modifikationen bereits synthetisierter Proteine gekennzeichnet ist.<sup>124</sup> Von Akt ist bekannt, dass sie zu den „early mediators“ des Zweiten Fensters zählt.<sup>64</sup> Muraski et al. konnten zeigen, dass die Pim-1 Kinase Akt nachgeschaltet ist.<sup>79</sup> „Early mediators“ steigern die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wie STAT 1/3<sup>67,68</sup> oder NFκB<sup>69</sup>, welche eine Expressionssteigerung von „late mediators“ durch de-novo Proteinsynthese erst möglich machen.<sup>125</sup> Zu den etablierten „late mediators“ zählen beispielsweise die iNOS<sup>65,70</sup> oder die COX-2<sup>37,71</sup>, welche dann über die Endstrecken wie die mPTP<sup>60,61</sup> und den K<sub>ATP</sub>-Kanal<sup>62,63</sup> die Kardioprotektion vermitteln. Die abschließende Einordnung der Pim-1 Kinase in diese Signalkaskade im Zweiten Fenster der Desfluran-induzierten Präkonditionierung konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht ausreichend geklärt werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

Unsere Ergebnisse müssen in Zusammenschau mit verschiedenen potentiell limitierenden Faktoren unserer Versuchsanordnung interpretiert werden. Die Infarktgröße wird maßgeblich von der Größe der AAR<sup>108</sup> und dem koronaren Kollateralblutfluss bestimmt. Dabei gilt, je größer die AAR, desto größer der Infarkt. Die unterschiedlichen Versuchsgruppen wiesen jedoch keine signifikanten Größenunterschiede in Bezug auf die AAR auf, sodass ein Einfluss verschieden großer Ischämiezonen weitestgehend ausgeschlossen werden konnte. In der hier vorliegenden Arbeit wurde der koronare Kollateralblutfluss nicht bestimmt, jedoch zeigen Untersuchungen aus der Vergangenheit, dass kleine Nagetiere kaum koronaren Kollateralblutfluss aufweisen<sup>126</sup> und diese Störgröße somit vernachlässigbar ist. Allerdings wurden weder der myokardiale Sauerstoffverbrauch, noch die koronarvenöse Sauerstoffsättigung direkt quantifiziert, sodass Einflüsse

durch unterschiedliche Sauerstoffsättigung bzw. -ausschöpfung nicht vollständig ausgeschlossen werden können.

Der Pim-Kinase Inhibitor II gilt als hochselektiv für die Pim-1 Kinase<sup>101</sup>, mit hoher Selektivität für Pim-1 verglichen mit der Pim-2 oder Pim-3 Kinase. Potentielle Effekte des Inhibitors auf die Pim-2 und Pim-3 Kinase bzw. andere Kinasen, die an der Signaltransduktionskaskade der Desfluran-induzierten Präkonditionierung teilhaben, können dennoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Es gibt keine Daten zur Halbwertszeit des Pim-1 Kinase Inhibitors oder der Dauer des inhibierenden Effekts. Für die Pim-1 Kinase wurde gezeigt, dass sie das Bad-Protein spezifisch an Serin<sup>112</sup> phosphoryliert.<sup>87</sup> Zwar wurde nachgewiesen, dass Akt das Bad-Protein vorwiegend an Serin<sup>136</sup> phosphoryliert,<sup>88</sup> jedoch kann nicht restlos ausgeschlossen werden, dass auch Akt das Bad-Protein am gleichen Serinrest wie die Pim-1 Kinase phosphoryliert. Zudem muss berücksichtigt werden, dass möglicherweise auch andere Kinasen (Proteinkinase A<sup>96</sup>, Rsk1<sup>67</sup> und Pim-2 Kinase<sup>97</sup>) Bad an Serin<sup>112</sup> phosphorylieren können. Das Absinken von pBad<sup>Ser112</sup> nach Verabreichung des Pim-Inhibitors auf das Niveau der Kontrollgruppe spricht jedoch gegen eine signifikante Bedeutung der anderen Kinasen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeiten deuten darauf hin, dass die Pim-1 Kinase im Zweiten Fenster der Anästhetika-induzierten Präkonditionierung eine entscheidende Vermittlerrolle trägt. Durch die Applikation von Desfluran 48h vor der Koronararterienokklusion zeigte sich eine Aktivitätssteigerung der Pim-1 Kinase, welche über die verstärkte Phosphorylierung von Bad am Serinrest 112 eine anti-apoptische Kaskade vermittelt, die letztendlich protektiv bei einem Ischämie-/Reperfusionsschaden wirkt und eine signifikante Infarktgrößenreduktion zur Folge hat.

## 5. Zusammenfassung

Unter kardialer Präkonditionierung wird ein endogener Schutzmechanismus verstanden, der in einer erhöhten Toleranz des Gewebes gegenüber langandauernden Ischämien resultiert. Es existieren zwei Formen der Präkonditionierung: die ischämische Präkonditionierung (IPC) und die pharmakologische Präkonditionierung (PPC), zu der auch die Anästhetika-induzierte Präkonditionierung (APC) zählt. Beide Formen zeigen ein biphasisches Verlaufsmuster, bestehend aus einem frühen Ersten Fenster sowie einem späten Zweiten Fenster. Beide Fenster sind durch eine Phase ohne kardioprotektive Eigenschaften getrennt. Ziel dieser Arbeit war es die Rolle der Serin/Threonin-Kinase Pim-1 im Zweiten Fenster der Desfluran-induzierten Präkonditionierung zu untersuchen.

Die Untersuchungen wurden in einem in-vivo Herzinfarktmodell an Mäusen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Präkonditionierung mit Desfluran nach 48h zu einer signifikanten Infarktgrößenreduktion führt. Die Bedeutung der Pim-1 Kinase in der Signalvermittlung des Zweiten Fensters wurde mittels Blockade durch den selektiven Pim-1 Kinase Inhibitor II untersucht. Der präkonditionierende Effekt konnte durch die Blockade der Pim-1 Kinase abgeschwächt, jedoch nicht vollständig aufgehoben werden. Somit ist die Pim-1 Kinase am präkonditionierenden Mechanismus des Zweiten Fensters beteiligt, es bestehen jedoch darüber hinaus noch weitere Signalvermittlungswege.

Die Bestimmung der Proteinexpression von Pim-1 Kinase, Bad und phosphoryliertem Bad<sup>Ser112</sup> erfolgte mithilfe des Western Immunoblot Verfahrens. Als Surrogatparameter der Pim-1 Aktivität diente das Phosphorylierungsmaß von Bad an Serin 112 (pBad<sup>Ser112</sup>). 48h nach Präkonditionierung mit Desfluran zeigte sich eine signifikante Zunahme der Phosphorylierung von Bad. Durch Applikation des Pim-Inhibitors II konnte dieser Effekt komplett aufgehoben werden, sodass die vorliegende Arbeit deutliche Hinweise erbringt, dass die Pim-1 Kinase an der intrazellulären Signalvermittlung des Zweiten Fensters der Desfluran-induzierten Präkonditionierung beteiligt ist.

## 6. Literaturverzeichnis

1. White, H.D. & Chew, D.P. Acute myocardial infarction. *Lancet* **372**, 570-584 (2008).
2. Van de Werf, F., *et al.* Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the Management of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* **29**, 2909-2945 (2008).
3. Yellon, D.M. & Hausenloy, D.J. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* **357**, 1121-1135 (2007).
4. Turrentine, F.E., Wang, H., Simpson, V.B. & Jones, R.S. Surgical risk factors, morbidity, and mortality in elderly patients. *J Am Coll Surg* **203**, 865-877 (2006).
5. Yazdanyar, A. & Newman, A.B. The burden of cardiovascular disease in the elderly: morbidity, mortality, and costs. *Clinics in geriatric medicine* **25**, 563-577, vii (2009).
6. Mangano, D.T., Wong, M.G., London, M.J., Tubau, J.F. & Rapp, J.A. Perioperative myocardial ischemia in patients undergoing noncardiac surgery-II: Incidence and severity during the 1st week after surgery. The Study of Perioperative Ischemia (SPI) Research Group. *J Am Coll Cardiol* **17**, 851-857 (1991).
7. Fleisher, L.A., Eagle, K.A., Shaffer, T. & Anderson, G.F. Perioperative- and long-term mortality rates after major vascular surgery: the relationship to preoperative testing in the medicare population. *Anesth Analg* **89**, 849-855 (1999).
8. Thygesen, K., *et al.* Third universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* **60**, 1581-1598 (2012).
9. Smul, T.M., *et al.* Time course of desflurane-induced preconditioning in rabbits. *J Cardiothorac Vasc Anesth* **24**, 91-98 (2010).
10. Liu, G.S., *et al.* Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation* **84**, 350-356 (1991).
11. Cope, D.K., Impastato, W.K., Cohen, M.V. & Downey, J.M. Volatile anesthetics protect the ischemic rabbit myocardium from infarction. *Anesthesiology* **86**, 699-709 (1997).
12. Banerjee, A., *et al.* Preconditioning against myocardial dysfunction after ischemia and reperfusion by an alpha 1-adrenergic mechanism. *Circ Res* **73**, 656-670 (1993).
13. Murry, C.E., Jennings, R.B. & Reimer, K.A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **74**, 1124-1136 (1986).
14. Payne, R.S., Akca, O., Roewer, N., Schurr, A. & Kehl, F. Sevoflurane-induced preconditioning protects against cerebral ischemic neuronal damage in rats. *Brain Res* **1034**, 147-152 (2005).
15. Bonventre, J.V. Kidney ischemic preconditioning. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **11**, 43-48 (2002).
16. Li, G., Chen, S., Lu, E. & Luo, W. Cardiac ischemic preconditioning improves lung preservation in valve replacement operations. *Ann Thorac Surg* **71**, 631-635 (2001).
17. Peralta, C., *et al.* Hepatic preconditioning in rats is defined by a balance of adenosine and xanthine. *Hepatology* **28**, 768-773 (1998).

18. Pang, C.Y., *et al.* Acute ischaemic preconditioning protects against skeletal muscle infarction in the pig. *Cardiovasc Res* **29**, 782-788 (1995).
19. Yellon, D.M. & Downey, J.M. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev* **83**, 1113-1151 (2003).
20. Kersten, J.R., Schmeling, T.J., Pagel, P.S., Gross, G.J. & Warltier, D.C. Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. *Anesthesiology* **87**, 361-370 (1997).
21. Schultz, J.E., Rose, E., Yao, Z. & Gross, G.J. Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts. *Am J Physiol* **268**, H2157-2161 (1995).
22. Kloner, R.A. & Jennings, R.B. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation* **104**, 2981-2989 (2001).
23. Kuzuya, T., *et al.* Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res* **72**, 1293-1299 (1993).
24. Baxter, G.F., Goma, F.M. & Yellon, D.M. Characterisation of the infarct-limiting effect of delayed preconditioning: timecourse and dose-dependency studies in rabbit myocardium. *Basic Res Cardiol* **92**, 159-167 (1997).
25. Marber, M.S., Latchman, D.S., Walker, J.M. & Yellon, D.M. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* **88**, 1264-1272 (1993).
26. Rizvi, A., *et al.* Increased protein synthesis is necessary for the development of late preconditioning against myocardial stunning. *Am J Physiol* **277**, H874-884 (1999).
27. Bolli, R. Preconditioning: a paradigm shift in the biology of myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**, H19-27 (2007).
28. Stumpner, J. Desflurane induces a first and a second window of preconditioning against myocardial infarction in vivo Würzburg, Univ., Diss., (2007).
29. Warltier, D.C., al-Wathiqui, M.H., Kampine, J.P. & Schmeling, W.T. Recovery of contractile function of stunned myocardium in chronically instrumented dogs is enhanced by halothane or isoflurane. *Anesthesiology* **69**, 552-565 (1988).
30. Larach, D.R. & Schuler, H.G. Potassium channel blockade and halothane vasodilation in conducting and resistance coronary arteries. *J Pharmacol Exp Ther* **267**, 72-81 (1993).
31. Cason, B.A., Shubayev, I. & Hickey, R.F. Blockade of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels eliminates isoflurane-induced coronary artery vasodilation. *Anesthesiology* **81**, 1245-1255; discussion 1227A-1228A (1994).
32. Kersten, J.R., *et al.* Glyburide, a KATP channel antagonist, attenuates the cardioprotective effects of isoflurane in stunned myocardium. *Anesth Analg* **83**, 27-33 (1996).
33. Kersten, J.R., *et al.* Mechanism of myocardial protection by isoflurane. Role of adenosine triphosphate-regulated potassium (KATP) channels. *Anesthesiology* **85**, 794-807; discussion 727A (1996).
34. Piriou, V., *et al.* Pharmacological preconditioning: comparison of desflurane, sevoflurane, isoflurane and halothane in rabbit myocardium. *Br J Anaesth* **89**, 486-491 (2002).
35. Lange, M., *et al.* Desflurane-induced preconditioning has a threshold that is lowered by repetitive application and is mediated by beta 2-adrenergic receptors. *J Cardiothorac Vasc Anesth* **23**, 607-613 (2009).

36. Kehl, F., *et al.* Is isoflurane-induced preconditioning dose related? *Anesthesiology* **96**, 675-680 (2002).
37. Tanaka, K., *et al.* Isoflurane produces delayed preconditioning against myocardial ischemia and reperfusion injury: role of cyclooxygenase-2. *Anesthesiology* **100**, 525-531 (2004).
38. Redel, A., *et al.* Endothelial nitric oxide synthase mediates the first and inducible nitric oxide synthase mediates the second window of desflurane-induced preconditioning. *J Cardiothorac Vasc Anesth* **27**, 494-501 (2013).
39. Huffmyer, J. & Raphael, J. Physiology and pharmacology of myocardial preconditioning and postconditioning. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth* **13**, 5-18 (2009).
40. Toller, W.G., Kersten, J.R., Gross, E.R., Pagel, P.S. & Warltier, D.C. Isoflurane preconditions myocardium against infarction via activation of inhibitory guanine nucleotide binding proteins. *Anesthesiology* **92**, 1400-1407 (2000).
41. Tritto, I., *et al.* Oxygen radicals can induce preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res* **80**, 743-748 (1997).
42. Downey, J.M., Cohen, M.V., Ytrehus, K. & Liu, Y. Cellular mechanisms in ischemic preconditioning: the role of adenosine and protein kinase C. *Ann N Y Acad Sci* **723**, 82-98 (1994).
43. Wang, Y. & Ashraf, M. Activation of alpha1-adrenergic receptor during Ca<sup>2+</sup> pre-conditioning elicits strong protection against Ca<sup>2+</sup> overload injury via protein kinase C signaling pathway. *J Mol Cell Cardiol* **30**, 2423-2435 (1998).
44. Zhao, J., *et al.* The expression of constitutively active isoforms of protein kinase C to investigate preconditioning. *J Biol Chem* **273**, 23072-23079 (1998).
45. Gray, M.O., Karliner, J.S. & Mochly-Rosen, D. A selective epsilon-protein kinase C antagonist inhibits protection of cardiac myocytes from hypoxia-induced cell death. *J Biol Chem* **272**, 30945-30951 (1997).
46. Gross, G.J. & Auchampach, J.A. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res* **70**, 223-233 (1992).
47. Liu, Y., Sato, T., O'Rourke, B. & Marban, E. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation* **97**, 2463-2469 (1998).
48. Tanaka, K., *et al.* Mitochondrial adenosine triphosphate-regulated potassium channel opening acts as a trigger for isoflurane-induced preconditioning by generating reactive oxygen species. *Anesthesiology* **98**, 935-943 (2003).
49. Redel, A., *et al.* Activation of mitochondrial large-conductance calcium-activated K<sup>+</sup> channels via protein kinase A mediates desflurane-induced preconditioning. *Anesth Analg* **106**, 384-391, table of contents (2008).
50. Stumpner, J., *et al.* Desflurane-induced and ischaemic postconditioning against myocardial infarction are mediated by Pim-1 kinase. *Acta Anaesthesiol Scand* **56**, 904-913 (2012).
51. Holmuhamedov, E.L., Wang, L. & Terzic, A. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel openers prevent Ca<sup>2+</sup> overload in rat cardiac mitochondria. *J Physiol* **519 Pt 2**, 347-360 (1999).
52. Benter, I.F., *et al.* 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* **268**, 175-183 (2005).

53. Hausenloy, D.J. & Yellon, D.M. The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* **35**, 339-341 (2003).
54. Crompton, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* **341 ( Pt 2)**, 233-249 (1999).
55. Zimmermann, K.C. & Green, D.R. How cells die: apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immunol* **108**, S99-103 (2001).
56. Sedlic, F., *et al.* Mitochondrial depolarization underlies delay in permeability transition by preconditioning with isoflurane: roles of ROS and Ca<sup>2+</sup>. *Am J Physiol Cell Physiol* **299**, C506-515 (2010).
57. Javadov, S.A., *et al.* Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart. *J Physiol* **549**, 513-524 (2003).
58. Piriou, V., *et al.* Desflurane-induced preconditioning alters calcium-induced mitochondrial permeability transition. *Anesthesiology* **100**, 581-588 (2004).
59. Hausenloy, D.J., Maddock, H.L., Baxter, G.F. & Yellon, D.M. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovasc Res* **55**, 534-543 (2002).
60. West, M.B., *et al.* Cardiac myocyte-specific expression of inducible nitric oxide synthase protects against ischemia/reperfusion injury by preventing mitochondrial permeability transition. *Circulation* **118**, 1970-1978 (2008).
61. Rajesh, K.G., *et al.* Second window of ischemic preconditioning regulates mitochondrial permeability transition pore by enhancing Bcl-2 expression. *Cardiovasc Res* **59**, 297-307 (2003).
62. Mullenheim, J., *et al.* Additive protective effects of late and early ischaemic preconditioning are mediated by the opening of KATP channels in vivo. *Pflugers Arch* **442**, 178-187 (2001).
63. Bernardo, N.L., D'Angelo, M., Okubo, S., Joy, A. & Kukreja, R.C. Delayed ischemic preconditioning is mediated by opening of ATP-sensitive potassium channels in the rabbit heart. *Am J Physiol* **276**, H1323-1330 (1999).
64. Kis, A., Yellon, D.M. & Baxter, G.F. Second window of protection following myocardial preconditioning: an essential role for PI3 kinase and p70S6 kinase. *J Mol Cell Cardiol* **35**, 1063-1071 (2003).
65. Imagawa, J., Baxter, G.F. & Yellon, D.M. Genistein, a tyrosine kinase inhibitor, blocks the "second window of protection" 48 h after ischemic preconditioning in the rabbit. *J Mol Cell Cardiol* **29**, 1885-1893 (1997).
66. Baxter, G.F., Goma, F.M. & Yellon, D.M. Involvement of protein kinase C in the delayed cytoprotection following sublethal ischaemia in rabbit myocardium. *Br J Pharmacol* **115**, 222-224 (1995).
67. Xuan, Y.T., *et al.* Mechanism of cyclooxygenase-2 upregulation in late preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* **35**, 525-537 (2003).
68. Xuan, Y.T., *et al.* Role of the protein kinase C-epsilon-Raf-1-MEK-1/2-p44/42 MAPK signaling cascade in the activation of signal transducers and activators of transcription 1 and 3 and induction of cyclooxygenase-2 after ischemic preconditioning. *Circulation* **112**, 1971-1978 (2005).
69. Xuan, Y.T., *et al.* Nuclear factor-kappaB plays an essential role in the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Circ Res* **84**, 1095-1109 (1999).
70. Takano, H., *et al.* Nitric oxide synthase is the mediator of late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits. *Circulation* **98**, 441-449 (1998).

71. Alcindor, D., Krolikowski, J.G., Pagel, P.S., Warltier, D.C. & Kersten, J.R. Cyclooxygenase-2 mediates ischemic, anesthetic, and pharmacologic preconditioning in vivo. *Anesthesiology* **100**, 547-554 (2004).
72. Wang, Z., *et al.* Pim-1: a serine/threonine kinase with a role in cell survival, proliferation, differentiation and tumorigenesis. *J Vet Sci* **2**, 167-179 (2001).
73. Hammerman, P.S., Fox, C.J., Birnbaum, M.J. & Thompson, C.B. Pim and Akt oncogenes are independent regulators of hematopoietic cell growth and survival. *Blood* **105**, 4477-4483 (2005).
74. Schafer, A., *et al.* Clopidogrel improves endothelial function and NO bioavailability by sensitizing adenylyl cyclase in rats with congestive heart failure. *Basic Res Cardiol* **106**, 485-494 (2011).
75. Mikkers, H., *et al.* Mice deficient for all PIM kinases display reduced body size and impaired responses to hematopoietic growth factors. *Mol Cell Biol* **24**, 6104-6115 (2004).
76. Bachmann, M. & Moroy, T. The serine/threonine kinase Pim-1. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 726-730 (2005).
77. Amson, R., *et al.* The human protooncogene product p33pim is expressed during fetal hematopoiesis and in diverse leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 8857-8861 (1989).
78. Tong, H., Chen, W., Steenbergen, C. & Murphy, E. Ischemic preconditioning activates phosphatidylinositol-3-kinase upstream of protein kinase C. *Circ Res* **87**, 309-315 (2000).
79. Muraski, J.A., *et al.* Pim-1 regulates cardiomyocyte survival downstream of Akt. *Nat Med* **13**, 1467-1475 (2007).
80. Muraski, J.A., *et al.* Pim-1 kinase antagonizes aspects of myocardial hypertrophy and compensation to pathological pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 13889-13894 (2008).
81. Cottage, C.T., *et al.* Cardiac progenitor cell cycling stimulated by pim-1 kinase. *Circ Res* **106**, 891-901 (2010).
82. Raphael, J., Rivo, J. & Gozal, Y. Isoflurane-induced myocardial preconditioning is dependent on phosphatidylinositol-3-kinase/Akt signalling. *Br J Anaesth* **95**, 756-763 (2005).
83. Shirogane, T., *et al.* Synergistic roles for Pim-1 and c-Myc in STAT3-mediated cell cycle progression and antiapoptosis. *Immunity* **11**, 709-719 (1999).
84. Bolli, R., *et al.* Discovery of a new function of cyclooxygenase (COX)-2: COX-2 is a cardioprotective protein that alleviates ischemia/reperfusion injury and mediates the late phase of preconditioning. *Cardiovasc Res* **55**, 506-519 (2002).
85. Xuan, Y.T., Guo, Y., Han, H., Zhu, Y. & Bolli, R. An essential role of the JAK-STAT pathway in ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9050-9055 (2001).
86. Stumpner, J., *et al.* The second window of desflurane-induced preconditioning is mediated by STAT3: role of Pim-1 kinase. *Acta Anaesthesiol Scand* **60**, 103-116 (2016).
87. Aho, T.L., *et al.* Pim-1 kinase promotes inactivation of the pro-apoptotic Bad protein by phosphorylating it on the Ser112 gatekeeper site. *FEBS Lett* **571**, 43-49 (2004).
88. Lilly, M., Sandholm, J., Cooper, J.J., Koskinen, P.J. & Kraft, A. The PIM-1 serine kinase prolongs survival and inhibits apoptosis-related mitochondrial dysfunction in part through a bcl-2-dependent pathway. *Oncogene* **18**, 4022-4031 (1999).

89. Stumpner, J., *et al.* Differential role of Pim-1 kinase in anesthetic-induced and ischemic preconditioning against myocardial infarction. *Anesthesiology* **111**, 1257-1264 (2009).
90. Borillo, G.A., *et al.* Pim-1 kinase protects mitochondrial integrity in cardiomyocytes. *Circ Res* **106**, 1265-1274 (2010).
91. Lamkanfi, M., Festjens, N., Declercq, W., Vanden Berghe, T. & Vandenabeele, P. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell death and differentiation* **14**, 44-55 (2007).
92. Guo, Y., *et al.* The late phase of ischemic preconditioning is abrogated by targeted disruption of the inducible NO synthase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11507-11512 (1999).
93. Adams, J.M. & Cory, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**, 1322-1326 (1998).
94. Fischer, K.M., *et al.* Enhancement of myocardial regeneration through genetic engineering of cardiac progenitor cells expressing Pim-1 kinase. *Circulation* **120**, 2077-2087 (2009).
95. Eckle, T., *et al.* Systematic evaluation of a novel model for cardiac ischemic preconditioning in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**, H2533-2540 (2006).
96. Giorgi, C., Romagnoli, A., Pinton, P. & Rizzuto, R. Ca<sup>2+</sup> signaling, mitochondria and cell death. *Current molecular medicine* **8**, 119-130 (2008).
97. Yan, B., *et al.* The PIM-2 kinase phosphorylates BAD on serine 112 and reverses BAD-induced cell death. *J Biol Chem* **278**, 45358-45367 (2003).
98. Liu, J.D., Chen, H.J., Wang, D.L., Wang, H. & Deng, Q. Pim-1 Kinase Regulating Dynamics Related Protein 1 Mediates Sevoflurane Postconditioning-induced Cardioprotection. *Chinese medical journal* **130**, 309-317 (2017).
99. Warltier, D.C., Zyvoloski, M.G., Gross, G.J., Hardman, H.F. & Brooks, H.L. Determination of experimental myocardial infarct size. *J Pharmacol Methods* **6**, 199-210 (1981).
100. Sonner, J.M., Gong, D. & Eger, E.I., 2nd. Naturally occurring variability in anesthetic potency among inbred mouse strains. *Anesth Analg* **91**, 720-726 (2000).
101. Cheney, I.W., *et al.* Identification and structure-activity relationships of substituted pyridones as inhibitors of Pim-1 kinase. *Bioorg Med Chem Lett* **17**, 1679-1683 (2007).
102. Redel, A., *et al.* Impact of ischemia and reperfusion times on myocardial infarct size in mice in vivo. *Exp Biol Med (Maywood)* **233**, 84-93 (2008).
103. Michael, L.H., *et al.* Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol* **269**, H2147-2154 (1995).
104. Yang, X.M., *et al.* Infarct limitation of the second window of protection in a conscious rabbit model. *Cardiovasc Res* **31**, 777-783 (1996).
105. Tsutsumi, Y.M., Patel, H.H., Huang, D. & Roth, D.M. Role of 12-lipoxygenase in volatile anesthetic-induced delayed preconditioning in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**, H979-983 (2006).
106. Guo, Y., *et al.* Demonstration of an early and a late phase of ischemic preconditioning in mice. *Am J Physiol* **275**, H1375-1387 (1998).
107. Kehl, F., *et al.* Isoflurane does not produce a second window of preconditioning against myocardial infarction in vivo. *Anesth Analg* **95**, 1162-1168, table of contents (2002).

108. Ytrehus, K., *et al.* Rat and rabbit heart infarction: effects of anesthesia, perfusate, risk zone, and method of infarct sizing. *Am J Physiol* **267**, H2383-2390 (1994).
109. Halestrap, A.P. & Pasdois, P. The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochim Biophys Acta* **1787**, 1402-1415 (2009).
110. Halestrap, A.P., Kerr, P.M., Javadov, S. & Woodfield, K.Y. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim Biophys Acta* **1366**, 79-94 (1998).
111. Jennings, R.B. & Reimer, K.A. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med* **42**, 225-246 (1991).
112. Suleiman, M.S., Halestrap, A.P. & Griffiths, E.J. Mitochondria: a target for myocardial protection. *Pharmacol Ther* **89**, 29-46 (2001).
113. Nakayama, H., *et al.* Ca<sup>2+</sup>- and mitochondrial-dependent cardiomyocyte necrosis as a primary mediator of heart failure. *J Clin Invest* **117**, 2431-2444 (2007).
114. Nutt, L.K., *et al.* Bax and Bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> stores. *J Biol Chem* **277**, 9219-9225 (2002).
115. Xuan, Y.T., *et al.* Biphasic response of cardiac NO synthase isoforms to ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**, H2360-2371 (2000).
116. Chen, C.H., Chuang, J.H., Liu, K. & Chan, J.Y. Nitric oxide triggers delayed anesthetic preconditioning-induced cardiac protection via activation of nuclear factor-kappaB and upregulation of inducible nitric oxide synthase. *Shock* **30**, 241-249 (2008).
117. Li, R.C., *et al.* PKCepsilon modulates NF-kappaB and AP-1 via mitogen-activated protein kinases in adult rabbit cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**, H1679-1689 (2000).
118. Lange, M., *et al.* Differential role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in desflurane-induced preconditioning and cardioprotection by metoprolol: metoprolol blocks desflurane-induced preconditioning. *Anesthesiology* **109**, 72-80 (2008).
119. Santos, N.C., Figueira-Coelho, J., Martins-Silva, J. & Saldanha, C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem Pharmacol* **65**, 1035-1041 (2003).
120. Meldrum, D.R., *et al.* Early and delayed preconditioning: differential mechanisms and additive protection. *Am J Physiol* **273**, H725-733 (1997).
121. Eiken, H.G., *et al.* Myocardial gene expression of leukaemia inhibitory factor, interleukin-6 and glycoprotein 130 in end-stage human heart failure. *Eur J Clin Invest* **31**, 389-397 (2001).
122. Ahmad, N., *et al.* Cardiac protection by mitoKATP channels is dependent on Akt translocation from cytosol to mitochondria during late preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**, H2402-2408 (2006).
123. Chen, J., *et al.* Hypoxia-mediated up-regulation of Pim-1 contributes to solid tumor formation. *Am J Pathol* **175**, 400-411 (2009).
124. Bienengraeber, M.W., Weihrauch, D., Kersten, J.R., Pagel, P.S. & Warltier, D.C. Cardioprotection by volatile anesthetics. *Vascul Pharmacol* **42**, 243-252 (2005).
125. Hausenloy, D.J. & Yellon, D.M. The second window of preconditioning (SWOP) where are we now? *Cardiovasc Drugs Ther* **24**, 235-254 (2010).

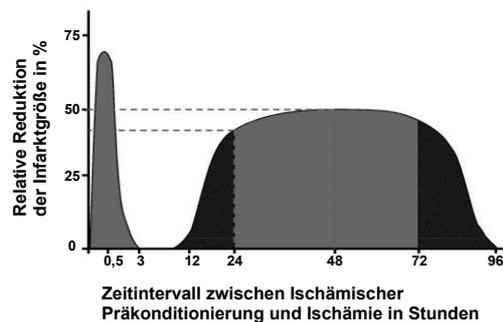
126. Maxwell, M.P., Hearse, D.J. & Yellon, D.M. Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischaemia: a critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction. *Cardiovasc Res* **21**, 737-746 (1987).

Bitte bei Antwort angeben:			
Ihre Nachricht vom:	Unser Zeichen: JS	Telefon: (09 31) 2 01 – 3 00 15	Würzburg, 22.03.2020
Ihr Zeichen:		Telefax: (09 31) 2 01 – 3 00 19	
		Stumpner_J@ukw.de	

Betreff: Abbildungserlaubnis

Sehr geehrte Damen und Herren,

hiermit erteile ich, Priv.-Doz. Dr. med. Jan Stumpner, Frau Julia Neuser die Erlaubnis, die folgende Abbildung in Ihrer Dissertation zu verwenden.



Mit freundlichen Grüßen,

*Jan Stumpner*

Priv.-Doz. Dr. med. Jan Stumpner

**Direktion:**  
Prof. Dr. P. Meybohm, MHBA  
Tel.: (09 31) 2 01 - 3 00 00

**Vorzimmer:**  
Tel.: (09 31) 2 01 - 3 00 01  
Fax: (09 31) 2 01 - 3 00 09

**Sekretariat:**  
Tel.: (09 31) 2 01 - 3 00 15  
Fax: (09 31) 2 01 - 3 00 19

**Anästhesiologische Intensivstation:**  
Tel.: (09 31) 2 01 - 3 04 00  
Fax: (09 31) 2 01 - 3 04 09

**Anästhesie-Leitstelle:**  
Tel.: (09 31) 2 01 - 3 09 55  
Fax: (09 31) 2 01 - 3 09 59

**Notfallmedizin:**  
Tel.: (09 31) 2 01 - 3 01 10  
Fax: (09 31) 2 01 - 3 01 09

**Akut-Schmerz-Dienst:**  
Tel.: (09 31) 2 01 - 3 01 00

**Schmerztagesklinik:**  
Tel.: (0931) 201 – 3 02 51  
Fax: (0931) 201 – 3 02 59

**Schmerzambulanz:**  
Tel.: (09 31) 2 01 - 3 02 00  
Fax: (09 31) 2 01 - 3 02 09

**Prämedikationsambulanz:**  
Tel.: (09 31) 2 01 - 3 01 00

**Maligne-Hyperthermie-Ambulanz:**  
Tel.: (09 31) 2 01 - 3 07 35

**Simulationsmedizin:**  
Tel.: (09 31) 2 01 - 3 00 61

**IT-Bereich:**  
Tel.: (09 31) 2 01 - 3 04 15  
Fax: (09 31) 2 01 - 3 04 09

**Forschungslabor:**  
Tel.: (09 31) 201 - 3 07 15

## **Danksagung**

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Markus Lange danke ich für die Überlassung des Themas und für seine Unterstützung, die zum Gelingen der Arbeit grundlegend beigetragen hat.

Mein besonderer Dank gilt Priv.-Doz. Dr. med. Jan Stumpner für zahllose hilfreiche Anregungen und Diskussionen, für sein außerordentliches Engagement während der Laborphase und seine Unterstützung und Geduld bei der Niederschrift der Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön gilt dem Team des Forschungslabors, allen voran Tobias Tischer-Zeitz, für eine interessante und bereichernde Zeit.

Ein großer Dank gilt Jonas Neuser, für die jahrelange bedingungslose Unterstützung, das offene Ohr und die Motivation.

Meinen Eltern danke ich für den stets liebevollen Rückhalt sowie die Ermöglichung meines Studiums und der Anfertigung dieser Arbeit.

Zu guter Letzt bedanke ich mich für die Unterstützung, die mir durch das Promotionsstipendium der medizinischen Fakultät der Universität Würzburg zuteil kam.

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Julia Neuser geb. Umminger  
Geburtsdaten: 09.06.1986 in Bad Mergentheim

### **Ärztliche Tätigkeit**

seit 10/13 Assistenzärztin der Klinik für Herz-,Thorax-, Transplantations- und Gefäßchirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover

### **Studium**

10/06 – 05/13 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
Ärztliche Prüfung am 7. Mai 2013 , Gesamtnote „gut“ (1,83)

### **Praktisches Jahr**

02/12-06/12 Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Uniklinikum Würzburg  
06/12 – 08/12 Medizinische Klinik , Stiftung Juliusspital Würzburg  
08/12 – 10/12 Department of Internal Medicine, University of Rochester, New York, USA  
10/12 – 01/13 Allgemein- und Viszeralchirurgie, Klinikum Coburg

### **Schulbildung**

09/92 – 07/96 Grundschule Oberlauda  
09/96 – 07/02 Realschule Lauda-Königshofen  
08/02 – 06/03 Poolesville High School, Maryland, USA  
09/03 – 07/06 Martin-Schleyer-Gymnasium, Abitur am 19.06.20116, Note 1,4

### **Stipendien**

04/10 Promotionsstipendium der Medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
07/10 – 07/11 Mentoring studmed  
08/12 Homberger-Stipendium für die University of Rochester, New York

