



Doctoral Thesis

## **Kardioprotektive Wirkung durch pharmakologische Präkonditionierung mit Isofluran Die Rolle der Proteinkinasen in der intrazellulären Signalgebung**

**Author(s):**

Uecker, Marina

**Publication Date:**

2004

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004714820> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 15501

**Kardioprotektive Wirkung durch pharmakologische  
Präkonditionierung mit Isofluran:  
Die Rolle der Proteinkinasen in der  
intrazellulären Signalgebung**

**ABHANDLUNG**

zur Erlangung des Titels

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von

**MARINA UECKER**

Dipl.-Pharm., ETH Zürich, Schweiz

Geboren am 20. Oktober 1968

In Leskovac Jugoslawien

Doppelbürgerin YU/CH

Aufgenommen auf Antrag von

Prof. Dr. Hanns Möhler, Referent

Prof. Dr. Marcus C. Schaub, Koreferent

2004

## Zusammenfassung

Der Herzinfarkt stellt eine der häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt dar. Die Behandlungsmethoden für Patienten haben mit der Entwicklung der operativen Revaskularisation während der vergangenen Jahre einen grossen Fortschritt erlebt. Ein pharmakologischer Wirkstoff jedoch, der das Herz während der kritischen Zeit vor der erfolgten Revaskularisation gegen den Infarkt schützen könnte, ist das Ziel intensiver Forschungen. Murry et al. beschrieb 1986 das Phänomen der „Ischämischen Präkonditionierung“ (IPC), ein endogener protektiver Mechanismus für das Myocardium. IPC stellt kurze Perioden von Ischämie dar, die selbst zu kurz sind, um eine myocardiale Nekrose hervorrufen zu können. Sie bewirken aber einen protektiven Effekt auf das Myocardium gegenüber einer lang anhaltenden Ischämie. In Tierversuchen ist IPC die bis jetzt wirksamste Methode, das Herzgewebe vor irreversibler ischämischer Schädigung zu schützen. Die Erforschung der Signalwege dieses Phänomens und pharmakologischer Wirkstoffe, die die Signalwege des IPC nachahmen können, könnte die Möglichkeit aufzeigen, eine Protektion des Herzens mit pharmakologischen Wirkstoffen gegenüber Ischämie zu erreichen. Verschiedene Wirkstoffe mit diesen Eigenschaften inklusive der Klasse der volatilen Anästhetika wurden beschrieben.

Ziel dieser Studie ist es, wichtige Signalwege der anästhetischen Präkonditionierung (APC) mit Isofluran (volatiles Anästhetikum) zu untersuchen und Parallelen oder Unterschiede zur ischämischen Präkonditionierung (IPC) zu erstellen. Die Arbeit gliedert sich in drei Teile:

### 1. Untersuchung der Rolle der Protein-Kinase-C (PKC) und der ATP abhängigen $K^+$ -Kanäle

Protein-Kinase-C (PKC) ist ein Schlüsselenzym im koordinierten Signaltransfer der Präkonditionierung. Die Translokation der Protein-Kinase-C zu den zellulären Zielstrukturen und Endeffektoren der Präkonditionierung (Mitochondrien mit mito- $K^+$ <sub>ATP</sub>-Kanälen, Zellmembranen mit sarc- $K^+$ <sub>ATP</sub>-Kanälen und Zellkerne mit Transkriptionsfaktoren) stellt einen wichtigen Signalschritt in der ischämischen Präkonditionierung (IPC) dar. Um die Rolle der PKC und  $K^+$ <sub>ATP</sub>-Kanäle im IPC und APC (1.5 MAC Isofluran) zu untersuchen, wurden Chelerythrin und Rottlerin als Blocker der Protein-Kinase-C, HMR-1098 als Blocker der ATP abhängigen mito- $K^+$ <sub>ATP</sub>-Kanäle und 5-Hydroxydecanoat als Blocker der sarc- $K^+$ <sub>ATP</sub>-Kanäle verwendet. Die isolierten perfundierten Rattenherzen wurden dabei den Präkonditionierungsstimuli (IPC und APC) ausgesetzt, gefolgt von einer 40 min langen Testischämie und 30 min Reperfusion. Untersucht wurden die hämodynamischen Daten, die während der Perfusion aufgezeichnet wurden. Zur Visualisierung der PKC-Translokation nach der Präkonditionierung wurden immunohistochemische Methoden angewandt. Zusätzlich wurde mittels Western-Blot-Analyse der Phosphorylierungsstatus der PKC-Isoformen untersucht. Chelerythrin, Rottlerin und 5-Hydroxydecanoat hemmen die durch IPC und APC verbesserte postischämische funktionelle Erholung. Für die Hemmung der IPC mussten höhere Konzentrationen an Blockern eingesetzt werden. HMR-1098 zeigte weder bei IPC noch APC einen Effekt. Nach IPC und APC translozieren PKC $\delta$  und PKC $\epsilon$  zu den Zellkernen. Durch die Applikation von Chelerythrin und Rottlerin während des

Präkonditionierungsstimulus konnte die Translokation gehemmt werden. PKC $\delta$  transloziert zu den Mitochondrien, nicht aber zur Zellmembran. PKC $\epsilon$  transloziert zur Zellmembran und den Intercalated Discs, nicht aber zu den Mitochondrien. Verglichen mit den Kontrollherzen war PKC $\epsilon$  in den Intercalated Discs bei IPC verstärkt vorhanden. Die Phosphorylierung der PKC $\delta$  an Serin 643 war in IPC und APC erhöht und konnte durch Chelerythrin und Rottlerin gehemmt werden. Die Phosphorylierung der PKC $\delta$  an Threonin 505 war nur im IPC erhöht und konnte weder durch Chelerythrin noch Rottlerin gehemmt werden. Bei PKC $\epsilon$  blieb nach beiden Präkonditionierungsstimuli der Phosphorylierungsstatus an Serin 729 unverändert. In dieser Studie konnte aufgezeigt werden, dass die Translokation von PKC $\delta$  zu den Mitochondrien und Zellkernen eine wichtige Rolle im IPC und APC spielt. Die Phosphorylierung von PKC $\delta$  an Serin 643 scheint von Bedeutung im Transfer des Präkonditionierungsstimulus zu den mitochondrialen K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>-Kanälen zu sein.

## *2. Untersuchung der Rolle der ERK1/2- und p38-MAPK*

Mehrere andere Studien beschreiben die wichtige Rolle der MAPK (Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen) neben der Protein-Kinase-C in der Signalübertragung der ischämischen Präkonditionierung. Die Rolle dieser Kinasen bei der Phosphorylierung der Schlüsselzielstrukturen der myocardialen Protektion in der anästhetischen Präkonditionierung ist noch nicht bekannt. Durch Anwendung von PD98059, einem spezifischen Blocker der ERK1/2-MAPK und von SB203580, einem Blocker der p38-MAPK, wurde die Rolle dieser MAPK in Bezug auf die postischämische funktionelle Erholung an isolierten perfundierten Rattenherzen, die dem IPC- und APC-Stimulus ausgesetzt waren,

untersucht. Mittels Western-Blot-Analyse wurde der Aktivierungsgrad der beiden Kinasen nach der Applikation der Präkonditionierungsstimuli und nach Ischämie und Reperfusion ermittelt.

PD98059 und SB203580 hemmen die verbesserte postischämische funktionelle Erholung nach IPC, nicht aber nach APC. IPC, nicht aber APC, führt zur Aktivierung der ERK1/2- und p38-MAPK, die durch Blocker gehemmt werden konnte. Verglichen zu Herzen, die nicht dem Präkonditionierungsstimulus ausgesetzt worden waren, erhöhte IPC und APC die Aktivität von ERK1/2 nach der Ischämie/Reperfusion und IPC zusätzlich die Aktivität von p38-MAPK. Die Applikation von PD98059 und SB203580 während IPC, nicht aber APC, hemmt die erhöhte Aktivität der MAPK nach der Ischämie. Die Applikation von PD98059 während der Ischämie und Reperfusion hemmt die protektiven Effekte von IPC und APC. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die untersuchten MAPK als Auslöser und Mediatoren der IPC und als Mediatoren im APC wirken.

### *3. Untersuchung der Auswirkung der anästhetischen Präkonditionierung mit Isofluran (APC) auf den Zelltod durch Nekrose und Apoptose*

Die Auswirkung der anästhetischen Präkonditionierung mit Isofluran bezüglich Zelltod durch Nekrose und Apoptose wurde ebenfalls untersucht. Mittels immunohistochemischer Methoden und spezifischer Färbungen für nekrotische Zellmembranschädigung (Propidiumiodid) und apoptotische DNA-Fragmentierung (TUNEL-Färbung) wurde das Ausmass des Zelltods in den Kontrollherzen und Herzen, die dem APC mit Isofluran ausgesetzt waren, untersucht. Die Behandlung mit Isofluran führt zu einer Verringerung der Nekrose, hat aber keinen Einfluss auf den Zelltod durch Apoptose.

## Abstract

In the western world cardiac infarction is one of the most frequent causes of death. Recent developments in methods of treatment with surgical revascularisation have led to an advanced progression in therapeutic medicine for those suffering from these conditions. However, the need of pharmacological agents capable to protect the heart during the critical time prior to revascularization, have led scientists to a new field of investigation. In 1986, Murry and colleagues have described the phenomenon „Ischemic Preconditioning“ (IPC), an endogenous protective mechanism against myocardium infarction. IPC is defined as short periods of ischemia, which are too short to cause myocardium necrosis, but protect the myocardium against a long-lasting period of ischemia. In animal experiments IPC has shown to be the most effective method to protect the heart against irreversible ischemic damage. The elucidation of the IPC mechanism and development of new pharmacological agents which are capable to mimic cardioprotective mechanisms, would yield new therapeutic strategies against myocardium infarction. Different pharmacological agents have been reported to mimic the IPC cardiac protection including the class of volatile anesthetics.

Therefore the goal of this study is to characterize the signalling pathways involved in anesthetic preconditioning (APC), specifically isoflurane, and to determine the differences and commonalities to ischemic preconditioning (IPC). The study was divided into three parts:

*1. Investigation of the role of Protein-Kinase-C (PKC) and the ATP dependend  $K^+$  channels*

Protein-Kinase-C (PKC) has been shown to be one of the major players in transferring the signals during the preconditioning mechanism.

Translocation of PKC to subcellular targets including mitochondria (mitochondrial  $K^+_{ATP}$  channels), cell membrane (sarcolemma  $K^+_{ATP}$  channels) and cell nucleus (transcriptional factors) has revealed an important signalling step in the ischemic preconditioning (IPC) mechanism. In order to investigate the role of PKC and adenosine triphosphate potassium dependent channels ( $K^+_{ATP}$  channels) in ischemic and anesthetic-induced preconditioning (1.5 MAC Isoflurane), the PKC blockers chelerythrine and rottlerin, and the  $K^+_{ATP}$  channels blockers HMR-1098 (sarc  $K^+$ -ATP) and 5-Hydroxydecanoate were used. Isolated perfused rat hearts were exposed to preconditioning-stimuli (IPC and APC), followed by a 40 min test ischemia and 30 min reperfusion. Immunohistochemistry was used to visualise the translocation of PKC after preconditioning stimulus. Additionally, the phosphorylation status of different PKC isoforms were measured by Western-Blot analysis. Chelerythrine, rottlerin and 5-Hydroxydecanoate completely abolished the postischemic functional recovery achieved by IPC and APC treated hearts. However, for IPC higher concentrations were needed. HMR-1098 has no effect in IPC or APC. After IPC and APC, PKC $\delta$  and PKC $\epsilon$  translocated to the cell nucleus. Administration of chelerythrine and rottlerin during preconditioning stimulus inhibited translocation of both PKC-Isoforms. PKC $\delta$  further translocated to the mitochondria, but not to the cell membrane. PKC $\epsilon$  translocates to the cell membranes and intercaleted discs, but not to the mitochondria. PKC $\epsilon$  was even enhanced in the intercaleted discs of the IPC hearts compared to control. The phosphorylation of PKC $\delta$  on Serine 643 residue was increased at IPC and APC treated hearts. These enhancement was abolished by chelerythrine and rottlerin. The phosphorylation of PKC $\delta$  on Threonine



505 was exclusively increased in IPC and could not be blocked by neither chelerythrine nor rottlerin. No significant changes were observed on the phosphorylation status of PKC $\epsilon$  on Serine 729 by both types of preconditioning. Our study suggests that translocation of PKC $\delta$  to mitochondria and cell nucleus may play an important role in IPC and APC mechanism. The phosphorylation of PKC $\delta$  to Serine 643 reveal its importance in transferring the preconditioning stimulus to mitochondrial K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> channels.

## *2. Investigation of the role of ERK1/2- and p38-MAPK*

Besides PKC, numerous other key kinases have been reported to play a role in the intracellular transmission of the signal, triggered by preconditioning. In the IPC mechanism, the family of stress-related mitogen activated protein kinase (MAPK) has been increasingly implicated in the phosphorylation of key targets of cardiac protection. However, it is not yet known whether APC activates MAPK cascades. PD98059, a specific blocker of ERK1/2-MAPK, and SB203580, a blocker of p38-MAPK were applied in order to investigate the role of these kinases in the postischemic functional recovery in isolated rat hearts subjected to IPC- and APC stimulus. By Western-Blot analysis, the degree of activation of both kinases was determined at two different time points, immediately after the preconditioning stimulus and after ischemia and reperfusion.

PD98059 and SB203580 abolished the improved postischemic functional recovery after IPC, but not after APC. IPC, but not APC, lead to activation of ERK1/2- and p38-MAPK, which was blocked by the specific inhibitors. After ischemia and reperfusion, both IPC and APC increased the activity of ERK1/2.

However p38-MAPK activity was enhanced only by IPC. Administration of PD98059 and SB203580 during IPC stimuli, but not during APC, abolished the increased activity of MAPK after ischemia and reperfusion. The application of PD98059 during ischemia and reperfusion inhibited the protective effects of IPC and APC. These results indicate that MAPK acts both as trigger and mediator in IPC, but only as a mediator in APC.

*3. Investigation of the effect of anesthetic preconditioning with Isoflurane (APC) on cell death due to nekrosis and apoptosis*

The cardioprotective effects of anaesthetic preconditioning with isoflurane was further investigated by measurements on necrotic and or apoptotic cell deaths. By using immunohistochemical methods, a specific staining for necrotic death (propidiumiodide) and apoptotic DNA fragmentation (TUNEL), it was shown that APC induced hearts reduced necrosis cell death as compared to ischemia alone, but it has no effect in cell death via apoptosis.