

Aus dem Max-Planck-Institut für Physiologische und Klinische Forschung,
W.G. Kerckhoff-Institut, Abteilung für Experimentelle Kardiologie, Bad Nauheim

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Die Rolle der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen beim Phänomen der ischämischen Präkonditionierung am Schweineherzen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Claudia Strohm

Gießen 2002

Aus dem Max-Planck-Institut für Physiologische und Klinische Forschung,
W.G. Kerckhoff-Institut, Abteilung für Experimentelle Kardiologie, Bad Nauheim
Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. W. Schaper

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. med. vet. I. Käufer-Weiss

Die Rolle der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen beim Phänomen der ischämischen Präkonditionierung am Schweineherzen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Claudia Strohm
Tierärztin aus Friedberg/Dorheim

Gießen 2002

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. W. Schaper

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. med vet. I. Käufer-Weiss

Tag der mündlichen Prüfung: 4.11.2002

für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
1. Abstract	1
2. Hintergrund der Studie	3
3. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	4
4. Klinischer Aspekt	5
5. Erläuterung zur Wahl des Tierversuchsmodells und der <i>in vitro</i> -Methodik	7
5.1. <i>in vivo</i> -Schweinemodell	7
5.2. <i>in vitro</i> -Untersuchungsverfahren	8
5.2.1. Tetrazoliumfärbung des Myokardgewebes	8
5.2.2. In-Gel-Phosphorylierung und Western Blot Analyse von Proteinen	10
6. Blutversorgung des Myokards	11
II. LITERATURÜBERSICHT	13
1. Ischämische Präkonditionierung (IP)	13
1.1. Definition und Vorkommen	13
1.2. Stimuli und Effektoren des IP-Signalweges	16
1.2.1. Die Rolle des Adenosin-Signalweges im IP-Phänomen	17
1.2.2. Die Rolle des Kalziums im IP Phänomen	19
1.2.3. Die Rolle des parasymphathischen Signalweges im IP-Phänomen	19
1.2.4. Die Rolle des Bradykinin Signalweges im IP-Phänomen	19
1.2.5. Die Rolle der Kaliumkanäle im IP-Phänomen	20
1.2.5.1. Die physiologische Rolle der mitochondrialen K_{ATP} -Kanäle am Herzen	20
1.2.5.2. Die Rolle der mitochondrialen K_{ATP} -Kanäle im IP-Phänomen	21

	Seite
2. Proteinkinasen im Phänomen der ischämischen Präkonditionierung	23
2.1. Proteinkinasen-Rezeptoren	23
2.2.1. G-Protein-gekoppelte Transmembranrezeptoren	24
2.2.2. Heterotrimere G-Proteine	25
2.2.2.1. Effektormoleküle des G_{α} -GTP-Proteins	26
2.3. Serin/Threonin-spezifische Proteinkinasen	28
2.3.1. Proteinkinase A (PKA)	31
2.3.2. Proteinkinase C (PKC)	31
2.3.3. Ser/Thr-spezifische Proteinphosphatasen	33
2.4. Rezeptor-Tyrosinkinasen	33
2.4.1. Liganden des Rezeptors mit intrinsischer Tyrosinspezifischer Aktivität	34
2.4.2. Proteinmodule der intrazellulären Signalübertragung nach Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen	39
2.4.2.1. SH2-Domäne	39
2.4.2.2. PTB-Domäne	39
2.4.2.3. Pleckstein-Homologie-Domäne (PH-Domäne)	40
2.4.2.4. SH3-Domäne	40
2.4.2.5. Adaptormoleküle	40
2.5. Transmembranrezeptoren mit einer assoziierten Tyrosinkinase	41
2.5.1. Liganden zytoplasmatischer Tyrosin-Proteinkinase	43
2.6. Protein-Tyrosinphosphatasen	44
2.7. Signalübertragung durch Ras-Proteine	45
2.7.1. GTPase-aktivierende Proteine (GAP)	46
2.7.2. Guaninnucleotid-Austauschfaktoren (GEF)	47
2.8. Raf-Kinasen	48
2.9. Mos-Kinase	50

	Seite
3. Signaltransduktion der MAPKs-Kaskaden	51
3.1. Der ERK-1/2-Signalweg	54
3.1.1. Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen-Kinasen-1/2 (MEK-1/2; MKK-1/2)	54
3.1.2. Die extrazellulär-Signal-regulierten Proteinkinasen-1/2 (ERK-1/2)	56
3.1.2.1. Die extrazellulär-Signal-regulierten Proteinkinase 5 (ERK-5)	56
3.1.2.2. Intrazelluläre Regulatoren des ERK-1/2-Signalweges	57
3.1.2.2.1. Die Proteinkinase C (PKC)	57
3.1.2.2.2. Die Raf-Kinasen	57
3.1.2.2.3. Die Jak-Kinasen	58
3.1.2.2.4. Die PI3-Kinasen	59
3.1.3. Substrate der ERK-1/2-Kaskade	59
3.1.3.1. Phospholipase A2	59
3.1.3.2. MAPKAP-K1/Rsk	59
3.1.3.3. Transkriptionsfaktoren	60
3.2. Der Stress-aktivierte MAPKs-Signalweg (JNKs/SAPKs und p38-MAPK)	62
3.2.1. Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen der JNKs/SAPKs und p38-MAPK (MKKs)	63
3.2.2. Die c-Jun-NH ₂ -terminalen Proteinkinasen (JNKs)	64
3.2.3. Die p38-Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (p38-MAPKs)	66
3.2.4. Intrazelluläre Regulatoren der SAPK/JNKs	68
3.2.4.1. Die kleinen regulatorischen GTPasen	68
3.2.4.2. Die PAKs und die MLKs	69
3.2.4.3. Die Proteinkinase N	70
3.2.4.4. Die ROKs	70
3.2.5. Substrate des SAPKs/JNKs und p38-MAPK-Signalweges	70
3.2.5.1. Der Transkriptionsfaktor c-Jun	70
3.2.5.2. Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase aktivierte Proteinkinase 2 (MAPKAP-Kinase-2)	72

	Seite
3.2.5.3. p38-regulierte/aktivierte-Kinase (PRAK)	73
3.2.5.4. Die Transkriptionsfaktoren der p38-MAPK Kaskade	73
4. Myokardiale Ischämie	76
4.1 Definition und Formen der Ischämie	76
4.2. Energetischer Myokardstoffwechsel unter physiologischen Bedingungen	77
4.3. Energetischer Myokardstoffwechsel unter ischämischen Bedingungen	77
4.4. Osmolalität während der Ischämie	77
4.5. Weitere Indikatoren einer irreversibel geschädigten Myokardzelle	78
5. Reperfusion	79
5.1. Definition	79
5.2. Energetischer und osmotischer Zustand während der Reperfusion	79
5.3. Reperfusionsschäden	80
6. Myokardiales Stunning	81
7. Myokardialer Infarkt	81
8. Nekrose	83
8.1. Definition, Ursache und Vorkommen der Nekrose	83
9. Apoptose	84
9.1. Definition, Ursache und Vorkommen der Apoptose	84
III. MATERIAL UND METHODEN	87
1. Allgemeine Chemikalien und Lösungsmittel	87
2. Besondere Reagenzien zur Tiermedikation	87
2.1. Narkotikaherstellung	87
2.1.1. Material	87
2.1.2. Methode	87

	Seite
2.2. Besondere Reagenzien zur systemischen und intra-myokardialen Applikation am Tiermodell	88
2.3. Herstellung der Testsubstanzlösungen	89
2.3.1. Material	89
2.3.2. Methode	89
3. Tiermodell	90
3.1. Material	90
3.1.1. Versuchstiere	90
3.1.2. Medikamente	91
3.1.3. Operationsinstrumente	91
3.2. Methoden	91
3.2.1. Prämedikation und Narkose	91
3.2.2. Operationstechnik	93
3.2.3. Lokale Mikroinfusion in das zu erwartende ischämische Myokard	95
3.2.4. Versuchsprotokolle	96
3.2.5. Entnahme von Myokardbiopsien	98
3.2.5.1. Material	98
3.2.5.2. Methode	98
3.2.6. <i>In vivo</i> -Färbung des Myokardgewebes	98
3.2.6.1. Material	98
3.2.6.2. Methode	99
4. Herzaufarbeitung und <i>in vitro</i>-Färbetechnik	101
4.1. Material	101
4.2. Methode	101
4.2.1. TTC-Färbereaktion und Fotografie der Herzscheiben	101
4.2.2. Auswertungsmethodik und Ergebnisdokumentation	104
5. Allgemeine Verfahren der Proteinbiochemie	104
5.1. Bearbeitung des Biopsiematerials	104

	Seite
5.1.1. Material	104
5.1.2. Methode	105
5.2. Bestimmung von Proteinkonzentrationen	105
5.2.1. Material	106
5.2.2. Methode	107
6. Spezielle Verfahren der Proteinbiochemie	107
6.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	107
6.1.1. Material	107
6.1.2. Methode	109
6.2. Silberfärbung	110
6.2.1. Material	110
6.2.2. Methode	110
6.3. Western Blot Verfahren	111
6.3.1. Proteintransfer	111
6.3.1.1. Material	111
6.3.1.2. Methode	111
6.3.2. Ponceaufärbung	112
6.3.2.1. Material	112
6.3.2.2. Methode	112
6.3.3. Immunologischer Proteinnachweis	113
6.3.3.1. Material	113
6.3.3.2. Methode	116
6.3.4. Immunopräzipitation	117
6.3.4.1. Material	117
6.3.4.2. Methode	117
6.4. Messung der Protein-Kinase-Aktivität durch den in-Gel-Phosphorylierungsassay	117
6.4.1. Material	117
6.4.2. Methoden	118
6.4.2.1. Sephadex-Gel-Filtration	118
6.4.2.2. Bestimmung der ERK-1/2-Aktivitäten	118

	Seite
6.4.2.3. Bestimmung der p38-MAPK-Aktivität	119
6.4.2.4. Bestimmung der SAPKs/JNKs-Aktivitäten	119
7. Aufreinigung von Phosphoproteinen aus dem entnommenen Herzgewebe	120
7.1. Präparative Säulenionenaustauschchromatografie unter der Bildung von Chelatkomplexen	121
7.1.1. Material	121
7.1.2. Methode	121
7.1.3. Reaktion 1 der Chelatkomplexbildung	122
7.1.4. Filtration und Zentrifugation	122
7.1.5. Reaktion 2 der Chelatkomplexbildung	122
7.1.6. Herstellung des Grundzustandes der Ausgangsmatrix	123
8. Molekularbiologische Methoden	123
8.1. Northern-Blot-Analyse	123
8.1.1. Material	123
8.1.2. Geräte	125
8.1.3. Isolierung von Gesa-t-RNA aus Ribonuklease-reichem Gewebe	126
8.1.4. Messung der optischen Dichte	126
8.1.5. Gelelektrophoretische Auftrennung der RNA	127
8.1.6. Fotografie	128
8.2. Spezielle Verfahren	129
8.2.1. Blot-Hybridisierung	129
8.2.1.1. Northern-Blot	129
8.2.1.2. Prähybridisierung	130
8.2.1.3. Markierung einer Hybridisierungssonde (Random-primed-oligolabeling)	130
8.2.1.4. Papierchromatografie	132
8.2.1.5. Hybridisierung	132
8.2.1.6. Waschen der Membran	133
8.2.1.7. Autoradiografie	133

	Seite
9. Auswertung und Statistik	133
IV. ERGEBNISSE	135
1. Etablierung eines <i>in-vivo</i>-Modells des Schweines zur Quantifizierung von Infarkten nach der Applikation MAPKs-inhibierender Substanzen	135
1.1. Ermittlung der Infarktgröße am etablierten Schweinemodell	136
1.2. Wahl des Präkonditionierungsprotokolls zur Testung der MAPKs-Inhibitoren PD98059, UO126, Taxol und Actinomycin-D	136
1.3. Wahl des Indexischämieprotokolls zur Untersuchung des p38-MAPK-Inhibitors SB203580	137
1.4. Auswirkungen der Substanzapplikationen auf die dokumentierten hämodynamischen Parameter des Schweinemodells	137
2. Übersicht über die planimetrisch bestimmten Infarktgrößen der Tiere der verschiedenen Versuchsgruppen	138
3. Infarktgrößendarstellung der Tiere der Ischämie- und Präkonditionierungsprotokolle ohne Testsubstanzapplikation	138
3.1. Infarktgröße der Tiere der Versuchsgruppe I	138
3.2. Infarktgröße der Tiere der Versuchsgruppe IV	138
3.3. Infarktgröße der Tiere der Versuchsgruppen III und V	140
4. Untersuchung der p38-MAPK-Kaskade mittels des spezifischen Inhibitors SB203580	142
4.1. Infarktgröße der Tiere der Versuchsgruppe II	142
4.2. Infarktgröße der Tiere der Versuchsgruppen VI u. VII nach systemischer bzw. intramyokardialer SB203580-Applikation und vorgeschaltetem Präkonditionierungsprotokoll 2	144
5. In-vitro-Untersuchungen der SB203580-Studie	145
5.1. Effekt der SB203580-Applikation auf die Phosphorylierungsintensität und Aktivität der p38-MAPK-Kaskade	145

	Seite
5.2. Effekt der SB203580-Applikation auf die Phosphorylierungsintensität der SAPKs/JNKs-Kaskade	151
6. Untersuchung der ERKs-Kaskade mittels der spezifischen Inhibitoren PD98059 und UO126	152
6.1. Auswirkungen der lokalen/intramyokardialen PD98059- und systemischen UO126-Applikation auf die Infarktentscheidung nach 40 min Ischämie und 60 min Reperfusion ohne Präkonditionierung	152
6.2. Auswirkungen der lokalen/intramyokardialen PD98059- und UO126-Applikation auf die Infarktentscheidung nach 40 min Ischämie/60 min Reperfusion und dem vorgeschalteten Präkonditionierungsprotokoll 2	153
6.3. Auswirkungen der systemischen UO126-Applikation auf die Infarktentscheidung nach 40 min Ischämie/60 min Reperfusion und dem vorgeschalteten Präkonditionierungsprotokoll 2	156
7. In-vitro-Untersuchungen der PD98059- und UO126-Studie	157
7.1. Effekt der PD98059- und UO126-Applikation auf die Phosphorylierungsintensität bzw. Aktivität der ERKs-Kaskade	157
7.2. Effekt der PD98059- und UO126-Applikation auf die Phosphorylierungsintensität bzw. Aktivität der SAPKs-Kaskade	162
7.3. Effekt der PD98059- und UO126-Applikation auf die Phosphorylierungsintensität des ERKs-Transkriptionsfaktors Elk-1	163
8. Untersuchung der SAPKs/JNKs-Kaskade mittels des Inhibitors Taxol	164
8.1. Effekt der systemischen Taxol-Applikation auf die Infarktentscheidung ohne vorhergehende Präkonditionierung	164
8.2. Effekt der systemischen Taxol-Applikation auf die Infarktentscheidung nach 40 min Okklusion/60 min Reperfusion mit dem vorgeschalteten Präkonditionierungsprotokoll 2	164

	Seite
8.3. Effekt der lokalen/intramyokardialen Taxol-Applikation auf die Infarktentscheidung nach 40 min Okklusion/60 min Reperfusion und dem vorgeschalteten Präkonditionierungsprotokoll 2	165
9. In-vitro-Untersuchungen der Taxol-Studie	166
9.1. Effekt von Taxol auf die Phosphorylierungsintensität/Aktivität der SAPKs/JNKs-Kaskade	166
9.2. Effekt von Taxol auf die Phosphorylierungsintensität/Aktivität des SAPKs/JNKs-Transkriptionsfaktors c-Jun	168
10. Untersuchung des nukleären Signaltransduktionsmechanismus der ischämischen Präkonditionierung mittels des Transkriptionsgiftes Actinomycin-D	169
10.1. Effekt der systemischen Actinomycin-D-Applikation auf die Infarktentscheidung nach 40 min Ischämie/60 min Reperfusion ohne Präkonditionierung	169
10.2. Effekt der systemischen Actinomycin-D-Applikation auf die Infarktentscheidung nach 40 min Ischämie/60 min Reperfusion und vorgeschaltetem Präkonditionierungsprotokoll 2	170
10.3. Effekt der lokalen/intramyokardialen Actinomycin-D-Applikation auf die Infarktentscheidung nach 40 min Ischämie/60 min Reperfusion und vorgeschaltetem Präkonditionierungsprotokoll 2	171
10.4. Effekt von Actinomycin-D auf die Phosphorylierungsintensität und Aktivität der SAPK/JNKs, ERKs und p38-MAPKs sowie die ihrer nachgeschalteten spezifischen Substrate	173
10.4.1. Auswirkungen der Actinomycin-D-Applikation auf die Transkriptionsfaktoren c-Jun, ATF-2, Elk-1 und c-Myc	173
10.4.2. Auswirkungen der Actinomycin-D-Applikation auf die ERK-1/2	175
10.4.3. Auswirkungen der Actinomycin-D-Applikation auf die JNK-1/2	178
10.4.4. Auswirkungen der Actinomycin-D-Applikation auf p38-MAPKs	178

	Seite
10.5. Effekt des Transkriptionseinhibitors Actinomycin-D auf den mRNA-Gehalt der MAPKs-spezifischen Substrate c-Jun, ATF-2, Elk-1, c-Myc und c-Fos	180
10.6. Auswirkungen der Actinomycin-D- und UO126-Behandlung auf Phosphoproteine in den durch Säulenionenaustauschchromatografie aufgereinigten Herzgewebeproben	182
10.6.1. Darstellung der zytosolischen, Sephadex-gebundenen Myokardproteinfraktion nach Actinomycin-D- und UO126-Behandlung	183
10.6.2. Darstellung der nukleären und partikulären Sephadex-gebundenen Myokardproteinfraktion nach Actinomycin-D- und UO126-Behandlung	184
10.6.3. Darstellung der zytosolischen, Sephadex-gebundenen Myokardproteinfraktion nach Actinomycin-D- und UO126-Behandlung und folgender Immunopräzipitation	185
10.6.4. Darstellung der zytosolischen, Sephadex-gebundenen Myokardproteinfraktion nach Actinomycin-D- und UO126-Behandlung und folgender Immunopräzipitation mit einem Phospho-Threonin-Antikörper	186
10.6.5. Darstellung der zytosolischen, Sephadex-gebundenen Myokardproteinfraktion nach Actinomycin-D- und UO126-Behandlung und folgender Immunopräzipitation mit einem Phospho-Tyrosin-Antikörper	187
10.6.6. Darstellung der zytosolischen, Sephadex-gebundenen Myokardproteinfraktion nach Actinomycin-D- und UO126-Behandlung und anschließender Immunopräzipitation mit Phospho-Threonin/Prolin- und Phospho-Serin-Antikörper	189
11. Auswirkungen der Präkonditionierung auf die Phosphorylierungsintensität des MAPKs-vorgeschalteten Schaltstellenproteins Ras und der Raf-Kinase	189
11.1. Darstellung der aktivierten Form von H-Ras im präkonditionierten Myokardgewebe	189
11.2. Darstellung der aktivierten Form der c-Raf-1-Kinase im präkonditionierten Myokardgewebe	190

	Seite
V. DISKUSSION	193
1. Kritische Aspekte der verwendeten Färbe- und Infusionstechniken	193
2. Die Wirkung von PD98059 und UO126	194
3. Die Rolle der ERKs während Ischämie/Reperfusion und ischämischer Präkonditionierung	197
4. Die Wirkung von SB203580	200
5. Die Rolle der p38-MAPKs während Ischämie/Reperfusion und ischämischer Präkonditionierung	201
6. Die Wirkung von Taxol	209
7. Die Rolle der SAPK/JNKs während Ischämie/Reperfusion und Präkonditionierung	214
8. Die Wirkung von Actinomycin-D	216
9. Die Rolle der MAPKs-spezifischen Transkriptionsfaktoren während Ischämie/Reperfusion und Präkonditionierung	218
10. Schlussfolgerung und Zukunftsperspektiven	220
VI. ZUSAMMENFASSUNG	221
VII. SUMMARY	223
VIII. ANHANG	225
1. Geräte und Instrumente	225
2. Abkürzungsverzeichnis	227
IX. LITERATURVERZEICHNIS	233
X. DANKSAGUNG	297

I. EINLEITUNG

1. Abstract

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe verschiedener Inhibitoren die Bedeutung der MAPKs (Mitogen-aktivierten Proteinkinasen) im Zustandekommen der Kardioprotektion durch Ischämische Präkonditionierung (IP) untersucht. IP ist ein Phänomen endogener Protektion, welches das Herz sowie andere Organe durch kurze vorgeschaltete Ischämiezyklen gegenüber einer nachfolgenden längeren und schädigenden Ischämie schützt.

Ausgelöst durch die aktuelle Diskussion über die Rolle der K_{ATP} -Kanäle in der kardioprotektiven Vermittlung von IP, erlangten die MAPKs eine hochaktuelle Stellung.

Vorhergehende Studien mit Proteinkinaseaktivatoren (Anisomycin und Okada Säure) hatten bereits unterschiedliche Funktionen der verschiedenen MAPKs im IP des Schweinemyokards aufgezeigt. Auch erbrachten die unterschiedlichen Aktivitäten der MAPKs während einer länger anhaltenden Ischämie und der darauffolgenden Reperfusion die Erkenntnis einer MAPKs-Kaskaden-abhängigen Signaltransduktion.

Die Aktivität der ERKs (extrazellulär-Signal-regulierte Kinasen) erhöhte sich gemäßigt während kurzer Ischämiezyklen und deutlich während der folgenden Reperfusionsphase. Die SAPK/JNKs (Stress-aktivierte Proteinkinasen/c-Jun-NH₂-terminale Kinasen) dagegen wurden nur während der Reperfusion maximal aktiviert. Die p38-MAPKs wurden während der Ischämie zu einem Maximalwert aktiviert, jedoch während der folgenden Reperfusionsphase und in einer zweiten Ischämieperiode bereits wieder zum Ausgangswert deaktiviert. Die Aktivierung der SAPKs/JNKs durch Behandlung mit Okada Säure und Anisomycin bewirkte eine Vergrößerung des schützenden Effekts von IP im Schweinemyokard. Beispielhaft wurde durch die intramyokardiale Infusion der Fibroblastwachstumsfaktoren (FGF-1 und FGF-2) gezeigt, dass diese als Aktivatoren der ERKs-Kaskade den Effekt von IP im Schweinemyokard nachahmen. Unter anderem zeigten Peptidwachstumsfaktoren, Epidermalwachstumsfaktoren und Rezeptoragonisten des G-Proteins eine Aktivierung von ERKs im Myokard. Diese Tatsachen und die beobachtete Kardioprotektion durch FGF-1 und FGF-2 untermauerten die Hypothese, dass die ERKs- und JNKs-Kaskade in die ischämischen Präkonditionierung involviert sein muss. Um die Hypothese zu prüfen, wurden in der hier beschriebenen Studie erstmals spezifische Inhibitoren der Kinasen

eingesetzt. PD98059 und UO126 wirken als Inhibitoren der ERKs-Kaskade und Taxol als Inhibitor von SAPKs/JNKs. Andererseits sollte durch den Einsatz des spezifischen Inhibitors des p38-MAPK-Weges, SB203580, die negative Rolle von p38-MAPK auch während des Phänomens der IP bestätigt werden.

Die Untersuchungen wurden in einem *in vivo*-Schweinmodell mit intramyokardialer Mikroinfusion und systemischer Applikation der Substanzen durchgeführt. Der Einfluss der MAPK-Kaskadehemmung auf Infarktentstehung wurde nach einer Periode von Indexischämie und Reperfusion mit vorgeschaltetem IP (von zweimalig 10 min Ischämie und 10 min Reperfusion) oder ohne IP sowie mit oder ohne Infusion der zu testenden Substanzen gemessen. Außerdem wurden die Effekte der Substanz-Infusion auf die MAPK-Aktivitäten bzw. -Phosphorylierungsintensitäten durch "in Gel" Phosphorylierungs-Assays und Western Blot-Analysen nachgewiesen.

PD98059 bedingt eine Inhibierung der Raf-Kinase und dadurch Aktivitätshemmung von MEK-1/2, der proximalen Kinase von ERKs, während UO126 direkt als Inhibitor von MEK-1/2 sowie von ERK-1/2 fungiert. UO126 greift somit an einem distaleren Glied der Phosphorylierungskaskade von ERKs an, bevor die Signalweiterleitung vom Zytosol in den Kern übergeht. Taxol inhibiert SEK 1/2, die direkt vorgeschaltete Kinase der SAPKs/JNKs, und SB203580 blockiert bestimmte Isoformen der p38-MAPKs.

Die intramyokardiale sowie die systemische Applikation der ERKs- und SAPKs-Inhibitoren bedingten eine konzentrationsabhängige Infarktentstehung in dem ansonsten durch IP geschützten Myokard. Die Infarktentstehung nach Inhibitorengabe korrelierte mit einer Abnahme der ERKs bzw. SAPKs/JNKs-Phosphorylierungsintensität sowie der Aktivität ihrer spezifischen Transkriptionsfaktoren. Die Gabe von SB203580 inhibierte die p38-MAPK- und MAPKAP-K2-Phosphorylierung ohne die kardioprotektive Wirkung von IP zu beeinflussen.

Eine allgemeine Eigenschaft aller MAPKs ist die Fähigkeit eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren zu phosphorylieren, hierdurch eine Steigerung ihrer Aktivität zu bedingen und somit in die Transkription spezifischer Gene einzugreifen. Eine Aufhebung, der durch IP erzeugten Kardioprotektion durch die Inhibierung der Phosphorylierung von MAPKs und ihrer folgenden Transkriptionsfaktoren wäre somit ein Beweis, dass IP auch auf der Ebene der Transkription Veränderungen bewirkt. Daher wurde der transkriptionelle Schritt der Signalkette noch im Speziellen untersucht, indem durch den Einsatz des Transkriptionsgiftes Actinomycin-D eine Unterbindung der mRNA Bildung der MAPK-spezifischen

Transkriptionsfaktoren c-Jun, Elk-1, c-Myc und ATF-2 erreicht wurde. Hierbei war ebenfalls eine Aufhebung der kardioprotektiven Wirkung der IP festzustellen.

Zusammenfassend beweist die Aufhebung des kardioprotektiven Effekts von IP durch ERKs- und SAPKs/JNKs-Inhibitoren die Schlüsselrolle dieser Protein-Kinasen beim Zustandekommen des Phänomes. Die schützende Wirkung mittels des p38-MAPK-Inhibitors SB203580 untermauert die Hypothese des "death pathways" der p38-MAP Kinase. Die distale Inhibition von UO126 und Actinomycin-D an der letzten zytosolischen Kinase der ERKs-Kaskade bzw. direkt im Kern bestätigt die Existenz eines nukleären Mechanismus der IP.

2. Hintergrund der Studie

Das Herz als muskulöses Zentralorgan des Blutgefäßsystems bezieht die Energie für seine mechanische Arbeit überwiegend aus dem oxidativen Abbau von Nährstoffen. Darin liegt ein wesentlicher Unterschied zum Skelettmuskel, der seinen akuten Energiebedarf weitestgehend durch anaerobe Prozesse zu decken vermag und dabei eine Sauerstoffschuld eingehen kann, die nachträglich wieder ausgeglichen wird^{1,2}. Das Herz ist jenes Organ, dessen Regenerationsfähigkeit, ebenso wie seine vorhandenen Schutzmechanismen, im Vergleich zu denen anderer Organe unterentwickelt ist. Es erkrankt bei jungen, gesunden Individuen im Verhältnis zu seiner hohen Leistungsbeanspruchung relativ selten primär³. Zwar treten sekundäre Schädigungen nach Infektionen auf, doch letztendlich haben erst die Zunahme der Lebenserwartung, die hohen Stressbelastungen und das häufige Vorkommen von Überernährung in der Bevölkerung westlicher Industrienationen die Erkrankungen des Herz- und Kreislaufsystems an die Spitze der Todesursachen gerückt. Im Jahr 2001 wurde laut der statistischen Veröffentlichung des Deutschen Bundesamtes in der Bundesrepublik-Deutschland bei nahezu jedem zweiten Verstorbenen (202450) der Tod durch Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems ausgelöst. Unter diesen Erkrankungen nahmen die ischämischen Herzkrankheiten, wie die Koronaren Herzkrankheiten und die Peripheren Arteriellen Verschlusskrankheiten die erste Position ein (9,1% der insgesamt Verstorbenen)⁴. Die Koronare Herzkrankheit manifestiert sich in einer Ischämie des Herzmuskels. Krankheitsbilder sind hierbei vor allem die Angina pectoris, der Myokardinfarkt und die Linksherzinsuffizienz.

Die Myokardzelle ist eine Zelle, deren Differenzierung nicht umkehrbar ist, dies bedeutet, dass ventrikuläres Myokard als irreversibles postmitotisches Gewebe im Prinzip unfähig zur Regeneration ist. Allerdings können ein transmuraler Infarkt und der Tod eines Patienten oftmals vermieden werden, wenn der Regulatismus der

kardialen protektiven Konditionierung gewährleistet, dass weniger Nekrosen, weniger ernste Funktionsschwächen und daher bessere Überlebenschancen entstehen⁵. Diese kardiale Protektion (ischämische Präkonditionierung; ischemic preconditioning (IP)) wird durch eine transiente, reversible ischämische Periode ausgelöst, die vor einer folgenden länger andauernden Ischämiephase stattfindet. Kurze Ischämiephasen erhöhen somit für eine bestimmte Zeit die Toleranz des Myokards gegenüber einer folgenden längeren Ischämieperiode. Durch IP wird das Zugrundegehen der Zellen entweder limitiert oder zeitlich verzögert⁶. Die Adaption von Geweben auf wiederholend einwirkende Stressfaktoren ist seit längerem bekannt. Hierzu zählt vor allem die Hypertrophie des Herzens. Dennoch ist die Erkenntnis der sofortigen reaktiven Adaptierung einer Zelle auf akut schädigende Einflüsse, indem sie zu ihrem Ausgangszustand zurückkehrt, erst seit wenigen Jahren bekannt^{5,7,8}. Untersuchungen des myokardialen Signaltransduktionsweges dieses endogenen adaptiven IP-Phänomens war die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit.

3. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

- Ziel unserer Studien war es, die Rolle der Mitogen-aktivierten-Protein-Kinasen (MAPKs) innerhalb der ischämischen Präkonditionierung (IP) und ihrer zugrunde liegenden Signal-Transduktionskaskaden aufzuklären
- Die MAPKs-Signalkaskaden sollten erstmals an einem *in vivo*-Schweinmodell experimentell durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren blockiert werden
- Es sollten die Auswirkungen dieser Inhibition auf die IP-erzeugte Kardioprotektion durch Bestimmung der Infarktgröße als deren Funktion dargestellt werden
- Die Aktivitätsverminderung der MAPKs durch Inhibition sollte über den Grad der Phosphorylierung der MAPKs sowie ihrer Substrate und Transkriptionsfaktoren bestimmt werden

Mit Hilfe der erlangten Forschungsergebnisse könnten evtl. neue Ausgangsgrundlagen der pharmakologisch therapeutischen Präventionsmaßnahmen von Herzinfarkttrisikopatienten geschaffen werden, sodass die Entstehung von Infarkten bereits dezimiert würde. Schon bestehende Therapiemöglichkeiten sind aufgrund der Langzeitmedikation und Nebenwirkungsrate in ihrer Akzeptanz eher unbefriedigend. Die Prognose für viele Herzinfarktpatienten hinsichtlich Lebenserwartung und Lebensqualität hat sich durch immer wieder stattfindende Weiterentwicklungen sicherlich deutlich verbessert. Trotzdem haben diese

Therapieformen nach wie vor hauptsächlich palliativen Charakter, d.h. sie verzögern die z.T. lebensbedrohlichen Komplikationen der Erkrankung. Daher ist die Erforschung von therapeutisch wirksamen endogenen Substanzen, im Sinne von neuen Therapieansätzen, von großer Bedeutung. Das verfolgte therapeutische Ziel unserer Untersuchungen bestand daher darin, eine genauere Erforschung des Phänomens der kardialen Ischämischen Präkonditionierung zu erhalten und IP durch endogene Substanzen zu aktivieren, zu verstärken oder zu ersetzen und durch Inhibitorenapplikationen, d.h. Blockade der IP, den Gegenbeweis zu erbringen.

4. Klinischer Aspekt

In den letzten fünf Jahrzehnten sind bedeutende Fortschritte in der Behandlung und Prophylaxe des akuten Herzinfarktes erreicht worden. Insbesondere die Behandlung von fatalen Arrhythmien in "Coronary Care Units" und Strategien zur Verminderung von Infarktgrößen durch die Einführung von Nitrat- und β -Blocker-Behandlungen haben außerordentliche Fortschritte erbracht. Auch die Möglichkeit einer Bypass-Operation oder einer Herztransplantation verringerte die Todesrate und erhöhte die Lebensqualität der betroffenen Patienten⁹. Die Einführung von thrombolytischen Wirkstoffen wie Aspirin und Heparin sowie die direkte perkutane transluminale Koronare-Angioplastie (PTCA) erzielten eine deutliche Verminderung der Sterblichkeit nach einem akuten Herzinfarkt¹⁰⁻¹³. Dennoch bleibt Herzversagen die führende Todesursache der deutschen Bevölkerung¹⁴⁻¹⁶.

Daher war die Intention der nachfolgend beschriebenen Studie im Hinblick der klinischen Relevanz, aus den gewonnenen Daten ein therapeutisches Prinzip zu entwickeln, um den Untergang von Herzmuskelzellen frühzeitig zu verhindern bzw. die bestehende Latenzphase bis zum Beginn des Zelluntergangs durch eine pharmakologische Behandlung zu verlängern. Bereits eine Verkleinerung des Infarktgebietes oder eine zeitliche Verzögerung der Infarktstehung würden erheblich die Überlebenschancen sowie die Rekonvaleszenzmöglichkeiten der Patienten erhöhen.

Momentan erhofft man sich von dem kardialen Schutz durch Präkonditionierung lediglich eine Verlängerung des Zeitabschnittes vom Beginn des akuten Herzinfarktgeschehens bis zum Eintreffen der Ersten-Hilfe Kräfte, dem Transport zum Krankenhaus und schließlich dem Stattfinden der Behandlung im Krankenhaus. Die Zeitphase bis zum Eintreffen der Notärzte, einschließlich des Transportes war bislang das größte Risiko der Patienten. Präkonditionierung könnte diese Phase in eine weitestgehend stabile Phase überführen.

Der vorrangige Ansatzpunkt zukünftiger Entwicklungen der ischämischen Präkonditionierung wäre der Einsatz nichtinvasiver Behandlungsmethoden, somit die Zugänglichkeit der Therapieform für mehrere Patienten und die Möglichkeit einer präventiven Behandlung, um das Risiko sowie die Kosten für die Patienten zu verringern.

Der wissenschaftliche und pharmakologische Aspekt der Erforschung der ischämischen Präkonditionierung ist es, die molekularen Mechanismen dieses Phänomens zu belegen, um Entwicklungen von Medikamenten voranzutreiben, welche diesen Weg der "endogenen" Protektion fördern. Durch die Erkenntnis des MAPKs-abhängigen Signalweges der IP lag der Schwerpunkt der Arbeit auf dem Signaltransduktionsmechanismus dieser Proteinkinasen. Das Ziel der zukünftigen Behandlung von Herzinfarkt-Risikopatienten wäre somit die prophylaktische medikamentöse Therapie auf der Basis von MAPKs-Aktivatoren, die das Phänomen der ischämischen Präkonditionierung auslösen oder potenzieren könnten, um somit den Schutz des Myokards solange aufrechtzuerhalten, bis eine weitere Medikation stattfinden kann. Erste Versuche die ischämische Präkonditionierung bei Bypasspatienten anzuwenden, zeigten positive Ergebnisse im Hinblick einer verminderten Gewebeschädigungen des Herzens ¹⁷.

Eine Vielzahl weiterer Erkrankungen, die eine MAPK-Vermittlung bzw. -Interaktion aufweisen, sind neben den ischämischen Herzerkrankungen bekannt,. So stellen die kardiale Hypertrophie, die pulmonale Hypertension, der Endotoxinschock, verschiedene Formen von Arthritiden und diabetische Nephropathien weitere Krankheitsbilder dar, die durch die Signalvermittlung der MAPKs mitbegründet sind ¹⁸⁻²¹. Auch weisen 30% der existierenden Krebsformen mitunter Mutationen des Ras-Proteins auf, einem vorgeschalteten Signalschaltprotein des MAPKs-Weges ²²⁻²⁶.

Das Coffin-Lowry Syndrom stellt eine x-chromosomale-rezessive Erbkrankheit dar, die sich durch eine Splice-Mutation oder Deletions-Mutation (bp. 451 und 452) des MAPKAP-K1/Rsk2-Genes manifestiert. MAPKAP-K1/Rsk2 ist ein Substrat der ERK-1/2-Kaskade ^{27,28}. Die Mutation äußert sich durch den Austausch verschiedener Aminosäuren der N-terminalen ATP-Bindungs-Domäne des Proteins oder durch schwerwiegende Konformationsveränderungen des Proteins z.B an einem Tryptophanrest. Die chromosomale Lokalisation des Gens befindet sich auf dem Locus Xp22.1-22.2. Die Mutation findet zu einem postzygotischen Teilungsschritt der Eizelle statt. Betroffene Menschen zeigen unter anderem das klinische Bild einer juvenilen Retinoschisis mit primärer Netzhautspaltung im Bereich der Fovea centralis. Des weiteren ist die Erkrankung durch facialen und digitalen Dysmorphismus, psychosomatische Retardierung, lockerem Sehnen- und Bindegewebs-

aufbau sowie progressiven Skelettdeformationen gekennzeichnet. Die Lebenserwartung ist nahezu normal, jedoch sind Verhaltensänderungen und Lernstörungen bekannt, die oftmals in depressivem oder schizophrenem Verhalten enden können. Aktivitätsassays des veränderten Proteins zeigten keinerlei Aktivitätsnachweis des Proteins und eine fehlende Signalvermittlung durch ERK-1/2^{29,30,31,32}. Eine gezielte Gentherapie des mutierten MAPKs-Gens wäre hier das Ziel zukünftiger Behandlungsmethoden.

5. Erläuterung zur Wahl des Tierversuchsmodells und der *in vitro*-Methodik

5.1. *in vivo*-Schweinemodell

Trotz der Verwendung eines experimentellen Tiermodells steht am Ende aller Untersuchungen und Bemühungen der Mensch. Für ihn gilt es nun geeignete Medikamente zu entwickeln, die Krankheiten verhindern, vermindern oder heilen können und die Lebensqualität nach einer Erkrankung zu verbessern.

Bei der Mehrzahl der Haus- und Versuchstiere hat die koronare Herzerkrankung aufgrund des geringen Lebensalters nur eine untergeordnete Bedeutung. Doch beobachtet man mit zeitlicher Verzögerung und zunehmendem Wohlstand auch bei Hunden und Katzen eine deutliche Zunahme dieses Krankheitsbildes. Durch die Optimierung der Haltungsbedingungen konnte vor allem bei Hunden eine stetige Zunahme des Lebensalter (ebenfalls Affen, Bären, Papageien und Pferden) beobachtet werden. Unter Berücksichtigung genetischer Dispositionen (angeborene Enzymdefekte, Rassedisposition) und ernährungsbedingter Problematiken wird daher auch bei Tieren frühzeitig in der Behandlung der koronären Veränderungen begonnen³³⁻³⁶. In dem hier behandelten Schweinemodell konnte der Infarkt durch gezielte Experimente ausgelöst und in seinen Auswirkungen nachgeahmt werden³⁷.

Die Präkonditionierung setzt sich aus einem komplexen Zusammenspiel verschiedenster Signalweiterleitungen zusammen. Um diesen Voraussetzungen gerecht zu werden, ist es notwendig, ein geeignetes System zu verwenden, das diesen Anforderungen entspricht und zusätzlich dem menschlichen Organismus ähnlich ist. Dies ist die Ausgangsgrundlage für die Übertragbarkeit der Ergebnisse. Da der Einfluss von endogenen Substanzen auf das unter Ischämie schlagende Herz untersucht werden sollte, setzte das Versuchsmodell ein *in-situ*-schlagendes Herz voraus³⁸.

Wegen der guten Übertragbarkeit auf den Menschen, d.h. durch die fehlende Kollateralisierung, dem Vorhandensein vergleichbarer Hämodynamik und Gefäßarchitektur sowie einer autonomen Innervation, ist das Schweinmodell nach wie vor ausgesprochen gut geeignet. Daher wurden auch eventuelle Mehrkosten der Anschaffung und Tierhaltung gegenüber kleinen Labornagern in Kauf genommen.

Ebenso war es von großer Wichtigkeit, dass eine intramyokardiale Applikation am Versuchsmodell durchführbar war, da einige der zu testenden Substanzen keine systemische Bioverfügbarkeit gewährleisteten. Der limitierende Faktor war in dieser Hinsicht die Größe des Herzens und des zu erwartenden Infarktgebietes. Dadurch waren Experimente an Ratten- und Mäuseherzen ebenfalls nicht möglich.

Versuche am intakten *in vivo*-Organismus sind für bestimmte Untersuchungen und Fragestellungen unerlässlich, da ausschließliche biochemische und molekularbiologische Methoden in *in-vitro*-Experimenten nur Teilaspekte herausstellen könnten. Zellkulturen ermöglichen die Untersuchung von spezifischen Fragestellungen, die eine einzelne Zellart oder das Zusammenspiel zwischen zwei bis drei Zellsystemen betrifft. Zellkulturen beleuchten jedoch stets nur Einzelwege einer Signaltransduktionskaskade und niemals die Interaktion verschiedener Signalwege wie des komplexen Mechanismus der kardialen Präkonditionierung. Um physiologische Bedingungen, wie es der Ischämiestress darstellt, zu simulieren, galt es, ein entsprechendes Modell zu verwenden, dass auch eine folgende Infarktgrößenbestimmung durch Färbung zuließ. Die Untersuchungen im proteinbiochemischen und molekularbiologischen Bereich waren mit dem biopsierten Schweinemyokardgewebe gut durchführbar und die Entnahme von Drillstanzbiopsien aus den intramyokardialen Mikroinfusionsarealen gewährleistete eine große Sicherheit der Pharmakonwirksamkeit im entnommenen Gewebematerial.

5.2. *in vitro*-Untersuchungsverfahren

5.2.1. Tetrazolium-Färbung des Myokardgewebes

Tetrazoliumsalze werden als biologische Reduktionsindikatoren eingesetzt. Sie finden Verwendung in der Biochemie, Histologie, Histophysiologie, Pathologie, in Toxizitätsbestimmungen von Rohstoffen sowie in vielen anderen Verfahren^{39,40}. Die Tetrazoliumsalze sind in Wasser, Alkohol und Azeton löslich, jedoch unlöslich in Äther. Sie sind farblos und verfärben sich bei Lichtkontakt gelblich. Durch die Einwirkung verschiedenster Reduktionsmittel auf das Färbereagenz (z.B. Zinkstaub, Schwefelammonium, lebendes pflanzliches oder tierisches Gewebe, etc.) entstehen wasserunlösliche, tief-rot gefärbte Formazan-Verbindungen. Diese fallen

in Körnchen- und Kristallform aus, je nach verwendeter Konzentration, Temperatur und Wasserstoffanzahl in unterschiedlicher Menge und Größe (Bruchteile eines Mikrons bis zu einer Länge von $100 \mu\text{m}$)^{41,42}.

Tetrazoliumsalze haben im Vergleich zu anderen Reduktionsindikatoren (Methylenblau) den Vorteil, dass ihre Reduktionsprodukte wasserunlöslich sind, d.h. Triphenylformazan fällt am Ort seiner Entstehung aus und kann nicht ausgespült werden. Weiterhin sind die Reduktionsstufen sauerstoffunempfindlich. Der Herzmuskel färbt sich nach TTC-Inkubation, sofern er im Zustand physiologischer Bedingungen entnommen wurde und frisch dem Farbstoff zugesetzt wurde, purpurrot an. Es kommt zu einer starken, jedoch unregelmäßigen Formazankristallbildung. Die Kristalle liegen in den Muskelfasern und im Perimysium internum vielfach zu Zöpfen in langen Reihen verflochten und in paralleler Verlaufsrichtung zu den Muskelfasern. Die Verteilung und Stärke der Formazanbildung in den einzelnen Organen ist unterschiedlich und steht wahrscheinlich in Beziehung zur Intensität der Stoffwechselfvorgänge. Die Literatur kam zu dem übereinstimmenden Ergebnis, dass die TTC-Reduktion durch das Dehydrogenasesystem bedingt wird und daher in engem Zusammenhang mit der Zellatmung steht. So entstehen Formazankristalle in Geweben mit einem hohen Grad an Stoffwechselfvorgängen schneller und in größerer Menge als in bradytrophem Geweben⁴³. Welche Stoffwechselprodukte bzw. -prozesse eine positive bzw. negative TTC-Reduktion im Herzmuskel nach Ischämiezuständen bewirken, konnte anhand vielfältiger Untersuchungen am MPI Bad Nauheim durch *Schaper et al.*, *Klein et al.* und *Ito et al.*⁴⁴⁻⁴⁶ aufgezeigt werden. Die Fermente der Oxidations-Reduktions-Reaktionen des energieliefernden Zitratzyklus sind in hypoxämischen Herzmuskelgebieten vermindert oder fehlen. Es handelt sich dabei um einen großen Multienzymkomplex und beinhaltet z.B. den Pyruvat-Dehydrogenasekomplex, eine Vielzahl von Koenzymen und die Diaphorasen (= Liponsäureamid-Dehydrogenase oder auch als NADH_2 Liponsäureamid-Oxydoreduktase bezeichnet). Das Nicotinamidadenindinucleotid (NAD^+) ist hierbei der wichtigste Elektronenakzeptor der Oxidation von Brennstoffen. Der reaktive Teil des NAD^+ ist sein Nicotinamidringssystem. Bei der Oxidation eines Substrats nimmt der Nicotinamidring des NAD^+ ein Wasserstoffion und zwei Elektronen auf, was einem Hydridion entspricht. Bei dieser Dehydrogenierung wird ein Wasserstoffatom des Substrates direkt auf NAD^+ übertragen, während das andere in der Lösung erscheint. Beide Elektronen aus dem Substrat werden auf den Nicotinamidring überführt. Die reduzierte Form dieses Carriers wird als NADH bezeichnet und fungiert bei der Mehrzahl der Biosynthesen, die eine Reduktion erfordern, als Elektronendonator. Fehlende Formazanbildung bedeutet daher fehlendes NAD/NADH . Der NADH -Verlust aus den Mitochondrien führt zum Zelltod. Die

Ausschwemmung des bereits translozierten NADH durch Reperfusion ist somit notwendig, um falsch-negative Resultate zu vermeiden.

Histologisch befinden sich in den Gebieten mit negativer Reaktion vor allem fettige Degenerationsherde oder typische hypoxämische Nekrosen mit den morphologischen Veränderungen der Sarkoplasmaverklumpung, Kernpyknose, Karyolysis und Verlust von Querstreifung. Es besteht eine Korrelation zwischen dem Reaktionsausfall, der TTC-Färbung und den morphologisch elektronenmikroskopisch nachweisbaren Veränderungen. Dies bedeutet, dass die negative Fermentreaktion bereits ein frühzeitiger sensitiver Nachweis für die Schädigung der Herzmuskelfasern ist. Die hypämischen Nekrosen umfassen zu Beginn meistens nur einzelne Fasern, dazwischen liegen noch morphologisch intakte Herzmuskelbezirke. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die reduzierenden Fermente auch in diesen Fasern schon vermindert sind. Durch den negativen Ausfall der TTC-Reduktion, d.h. durch das Zustandekommen der Leukoform des TTCs, ist es möglich einen makroskopischen Hinweis auf einen Herzinfarkt zu erlangen, bevor die typischen Kriterien einer anämischen Herzmuskelnekrose vollständig ausgeprägt sind.

5.2.2. In-Gel-Phosphorylierung und Western Blot Analyse von Proteinen

Eine Methode, um die Phosphorylierung von Proteinen darzustellen und zu messen, ist die "in-Gel" Phosphorylierung. Dazu wird ein Elektrophorese-Gel mit einem Substrat (Phosphatakzeptor) gemischt und mit zytosolischen Kinasen geladen. Nach Ende der Elektrophorese wird das Gel mit radioaktivem ATP inkubiert. Dabei überträgt die jeweils aktive Kinase die radioaktive γ -ATP Gruppe auf das Substrat⁴⁷.

Während die Gewinnung von Kinasen und Membranfraktionen aus Kontrolltieren keiner Ischämie bedarf, ist die Aktivierung von Proteinkinasen, wie die der MAPKs Signaltransduktionkette, nur durch regionale Ischämie möglich. Nach unseren Erfahrungen mussten zwei Perioden von 10 minütiger Ischämie von 2 Perioden 10 minütiger Reperfusionen unterbrochen werden, um Aktivität zu bewirken.

Ein weiteres Verfahren in der Identifizierung der Kinasen stellt die Western Blot Analyse dar. Hierbei werden nach Aufbereitung der Myokardbiopsien, Proteine mit Hilfe elektrophoretischer Auftrennung je nach ihrem spezifischen Molekulargewicht separiert. Nach einem Transfer dieser Proteine auf eine Zellulosemembran können nach der Inkubation mit einem Primär- und Sekundärantikörper spezielle Proteine anhand der Bindung des Antikörpers definiert werden^{48,49}. Durch die Möglichkeit der Myokardbiopsieentnahme zu verschiedensten Zeitpunkten eines

Vesuchsablaufes konnte somit der Aktivitäts- und Phosphorylierungszustand von Kinasen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Ischämie und Reperfusion, sowohl *in vivo* als auch *in vitro* dargestellt werden. Da bisher hypothetisch verschiedenste Kinasen im Präkonditionierungsprozess des Herzens eine Rolle spielen, musste eine weitgefächerte Untersuchung aller drei Hauptfamilien der MAPKs erfolgen. Möglichkeiten ihrer näheren Untersuchung bot hierbei sowohl die Inhibierung, als auch die Stimulierung der Kinasen mittels spezifischer Substanzen. Eine anschließende biochemische Bestätigung der makroskopisch ausgewerteten Herzscheiben war von essentieller Bedeutung.

6. Blutversorgung des Myokards

Die Blutversorgung des Myokards erfolgt durch den Koronarkreislauf, welcher einen Teil des großen Kreislaufs darstellt. Im Herzen des Schweines befinden sich zwei Koronararterien, die beide aus der Aortenwurzel entspringen. Die rechte Koronararterie (*Arteria coronaria dextra*) nimmt ihren Ursprung aus dem zur rechten Semilunarklappe gehörenden Sinus des *Bulbus aortae*. Die linke Koronararterie (*Arteria coronaria sinistra*) entspringt aus dem linken Sinus des *Bulbus aortae* und gabelt sich nach kurzem Verlauf in den *Ramus interventricularis paraconalis* und in den *Ramus circumflexus* auf.³⁸

In der hier vorgestellten Studie okkludierten wir den *Ramus interventricularis paraconalis* direkt proximal seines ersten diagonalen Nebenastes (*A. coni arteriosi*) sowie die *Vena cordis magna*. Wir reperfundierten das zuvor verschlossene ischämische Myokardareal in einem folgenden Versuchsabschnitt durch Öffnung der Okklusionsstelle.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Ischämische Präkonditionierung

1.1. Definition und Vorkommen

Unter ischämischer Präkonditionierung des Herzens (ischemic preconditioning, IP) versteht man die kardiale Konditionierung durch sich wiederholende, kurzzeitige Ischämie- und Reperfusionen. Das Herz konditioniert sich hierbei für eine nachfolgend längeranhaltende Ischämie- und Reperfusionsperiode. Ischämische Präkonditionierung ist das paradoxe endogene Phänomen der Zunahme von Ischämietoleranz. Es ist eine der wirksamsten Methoden, die Ausbreitungsgeschwindigkeit eines Infarktes zu verlangsamen. Es resultiert in einer Reduktion der endgültigen Infarktgröße (IS) oder in einem verzögerten Beginn der Infarkt-entstehung um die Zeitspanne von ca. 2 Stunden, d.h. in einer Verschiebung der Beziehung zwischen Infarktgröße (Ordinate) und Verschlusszeit (Abszisse) nach rechts.

Erste Veröffentlichungen von *Nobel und Kollegen* berichten im Jahr 1943 von einem akuten Adaptionsgeschehen⁵⁰. Diente er anfänglich der Benennung des Phänomens der stressinduzierten endogenen Toleranzfähigkeit des gesamten Organismus gegenüber traumatischen Situationen oder differenten Stressoren, so differenzierte man später den Begriff nach dem konditionierten Organ und dem Charakter des auslösenden Stressstimulus. Die erforderliche Dauer des Stresses Ischämie/Reperfusion (Schwellenwert) sowie die Anzahl der Wiederholungen unterschied sich je nach untersuchter Tierspezies. *Strasser et al.* und *Schott et al.* erzielten am Schweine-myokard mit zweimalig 10 min Ischämie, jeweils gefolgt von 30 minütiger Reperfusion und anschließendem 60 minütigem Koronarverschluss eine statistisch signifikante Infarktgrößenreduktion gegenüber unprä-konditionierten Schweineherzen^{8,51}. Am Kaninchenherzen wurde eine notwendige minimale Ischämie der Präkonditionierung von zweimalig 2 bis 5 Minuten⁵²⁻⁵⁴ und am Hund von 2,5 bis 5 Minuten^{55,56} ermittelt.

Das Schweine-Tiermodell mit einer alternierenden Ischämie und Reperfusion am Myokard wurde vor allem durch die Arbeitsgruppen *Verdouw und Schaper*⁵⁷⁻⁶⁰ entwickelt. Die Kurve der Versuchsserie der ischämischen Präkonditionierung zeigte eine deutliche Abflachung und somit Rechtsverschiebung der Infarktgrößenentwicklung. In den Fällen der IP-Protokolle von zweimalig 10 min Ischämie (CO)/30 min Reperfusion (RP) oder zweimalig 10 min/10 min CO/RP

enstanden die ersten Myokardnekrosen im Zeitraum zwischen 30 und 40 Minuten der folgenden Indexischämie. Jedoch wurde mit Präkonditionierung der Spitzenwert der Vergleichskurve ohne IP auch nach 90 Minuten nicht erreicht, wohingegen sich ohne IP ein 90 Minutenwert aufgrund der hohen, ad Exitum führenden Myokardschädigungen, nicht ermitteln ließ⁶¹.

Das Ausgangsprotokoll der hier dargestellten Untersuchungen begründete sich aus den Erkenntnissen dieser früheren Studien. Sie zeigten, dass die Ischämietoleranz des Schweineherzens durch kurze ischämische Pulse von 10 minütigen Koronarverschlüssen und gefolgt Reperfusion von 10 Minuten am wirkungsvollsten induziert werden konnte. Erklärungen für dieses Verhalten sollten nun unter anderem in der differentiellen Aktivierung der MAP-Kinasen gesucht werden⁶²⁻⁶⁵.

Man unterscheidet das IP-Phänomens in ein "early" (*first window*) und "late" Preconditioning (*second window*), d.h. zum einen eine schnell einsetzende, aber nur kurz anhaltende protektive Reaktion des Myokards mit Verlangsamung des Zell-todes und zum anderen ein verzögertes Einsetzen der Protektion nach ca. 24 Stunden⁶⁶⁻⁶⁸. Betrachtete man die späte Präkonditionierung am Schwein, berichtete die Arbeitsgruppe von *Qiu et al.* von einem massiven Unterschied der frühen Phase gegenüber der späten. Während die Tiere, die einer frühen Präkonditionierung unterzogen wurden, signifikante Infarktreaktionen und schnelle Regulation post-ischämischer Dysfunktionen zeigten, konnte ein Effekt der späten Phase nicht dargestellt werden⁶⁹. Im Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse *Takanos et al.*, die eine Protektion der späten Phase der Präkonditionierung feststellen konnten^{70,71}.

Der metabolische Hintergrund der ischämischen Präkonditionierung begründet sich in einer Anpassung des Zellstoffwechsels. Die Zelle reagiert mit einem verminderten Energieumsatz während der ischämischen Situation. Beim präkonditionierten Myokard wurde im Verlauf der nachfolgenden langen Okklusion ein verminderter Abfall des myokardialen ATPs⁷² und ein verringerter Anstieg des Laktatpiegels beobachtet^{73,74}.

Die ursprüngliche Definition der Präkonditionierung, die einst allein die Ischämie als den auslösenden Reiz und die darauffolgend resultierende Infarktgröße als ihren Endpunktparameter benutzte, ist vielfältig erweitert worden. Einflüsse wie Hitzestress^{75,76}, Tachykardiastress⁷⁷⁻⁷⁹, Dehnungsreize, Endotoxine⁸⁰⁻⁸⁴, zyklische Koronarflussvariationen und myokardprotektive Agentien wie Adenosin⁸⁵⁻⁹⁰ sind weitere beispielhafte Stimuli der Präkonditionierung⁷⁰. Auch Stickstoffmonoxid (NO), reaktive Sauerstoffspezies (ROS), IL-1, TNF- α und - β , δ -Opioid Rezeptor Agonisten gehören zu den IP-auslösenden Faktoren⁹¹⁻¹⁰⁴.

Andere Parameter der Resultatdokumentation sind neben der Infarktgröße, die Inzidenz von Reperfusionsarrhythmien, die Zeitspanne bis zum Wiedererlangen kontraktiver Ventrikelfunktion, Koronarflussmessungen sowie die Messung metabolischer Veränderungen¹⁰⁵. Betrachtet man die enzymatischen Effektoren einiger genannter Stimuli, wie z.B die Cyclooxygenase-2 nach Prostaglandin- oder NO-Gabe^{106,107}, die Aldose-Reduktase nach oxidativer Stress-, Zytokin- oder Sauerstoffradikalaussetzung¹⁰⁸ sowie den Mn-Superoxid-Dismutasegehalt des Myokards nach IL-1 β - oder TNF- α -Gabe,^{97,109-111} so wurden stets erhöhte Werte dieser Enzyme nach IP festgestellt. Der Effekt von IP konnte somit durch Gaben dieser Enzyme blockiert werden und wiederum durch spezifische Enzyminhibitoren ausgelöst werden.

Wie bereits erwähnt sind tierartspezifische Unterschiede im Zustandekommen der IP festzustellen, jedoch stellt die Präkonditionierung einen nahezu ubiquitär vorkommenden protektiven Mechanismus dar. Zudem konnte im Laufe der Jahre das Phänomen bei verschiedensten Säugerspezies nachgewiesen werden^{7,112,113}. Bei Kaninchen, Meerschweinchen, Katzen, Ratten, Schweinen und Hunden sind die Ergebnisse eindeutig¹¹⁴⁻¹¹⁹, während sich bei Mäusen kontroverse Ergebnisse finden lassen¹²⁰⁻¹²³.

Neben dem Herzen sind vor allem die großen Organsysteme im Hinblick der Präkonditionierung untersucht worden. Vor allem das Gehirn^{124,125}, die Leber¹²⁶⁻¹²⁹, die Nieren¹³⁰⁻¹³², der Gastro-Intestinaltrakt^{133,134} und die Skelettmuskulatur¹³⁵⁻¹³⁷ sind präkonditionierbar.

Die ersten Studien der ischämischen Präkonditionierung durch *Noble*⁵⁰ berichteten über "resistente Tiere", d.h. Tiere, die über einen Zeitraum von 12-14 Tagen einem schweren Schleuder-Trauma ausgesetzt wurden. Sie erschienen nach Wiederholung des Traumas in jeder Hinsicht normal und zeigten keinerlei Anzeichen des Schocks und wurden daher als Trauma-resistente Tiere bezeichnet. Der Vergleich zu nicht-vorbehandelten Tieren war dramatisch. Diese Tiere überlebten die experimentelle Traumatisierung nicht. Endogene Toleranz gegenüber traumatischen Situationen ist größtenteils reproduzierbar und eine Reihe von Untersuchungen haben nachgewiesen, dass traumatischer oder endotoxischer Schock eine Toleranz gegenüber gleichen oder zum Teil auch anderen Stressoren induzieren kann. *Janoff et al.*¹³⁸ gebrauchten den Begriff "Preconditioning", um das Phänomen einer stressinduzierten endogenen Toleranz zu beschreiben. Er erforschte die molekularen Vorgänge der lysosomalen Enzymfreisetzung der Leber unter Verwendung des Modell Nobles im Vergleich einer kortisonvorbehandelten Gruppe.

Seit *Janoff* 1964 den Begriff Präkonditionierung erstmalig verwendete, wurde seine Bedeutung mehrfach modifiziert und eingegrenzt. So benutzte *Murry* ⁶ den Begriff zur Beschreibung der alleinigen myokardialen Adaptionsfähigkeit. Hierbei induzierte eine vorübergehende Ischämie eine Protektion gegen nachfolgende Verletzungen durch Ischämie und Reperfusion. Die Arbeitsgruppe nahm dazu Versuche an Hunden vor. Eine Ligatur der linken Koronararterie wurde gesetzt und die Parameter, wie linksatrialer und arterieller Druck, Kollateralfluss, EKG und Perikardtemperatur wurden dokumentiert. Es wurden verschiedene Versuchsgruppen verglichen, indem die Effekte der Präkonditionierungsprotokolle aus jeweils vier Intervallen fünf minütiger Okklusion, alternierend mit fünf Minuten Reperfusion mit den Ergebnissen der jeweiligen Indexischämie verglichen wurden. Die Resultate zeigten deutliche Infarktgrößenreduktion der präkonditionierten Tiere. Ebenfalls auffällig waren die unterschiedlichen morphologischen Charakteristika der Myokardinfarkte der Gruppen. So zeigten die Kontrolltiere generalisierte, solide Infarkte, die sich von der subendokardialen Begrenzung des anatomischen Risikogebietes nach endokardial erstreckten. Die präkonditionierten Tiere wiesen dagegen nur vereinzelte punktförmig-konfluierende Nekrosen auf.

Enorme Fortschritte im Verständnis des hochpotenten Schutzmechanismus am Herzen sind seit der Studie *Murrys* erzielt worden. Erstmals bei Hunden beschrieben, konnte *Ischemic Preconditioning* inzwischen auch am menschlichen Myokard gezeigt werden. *Kloner* sowie *Andreotti* beobachteten unabhängig voneinander einen protektiven Effekt bei Angina pectoris-Patienten, sofern der Anfall einem folgenden Infarkt 24 bis 48 Stunden vorausgegangen war ^{6,112,116,139-142}. Anhand von Messungen der Kreatinkinase-Werte erhielt man den Hinweis eines endogenen protektiven Mechanismus des menschlichen Myokards durch Anginastress ^{139,141,143}. Folgende *ex vivo* Untersuchungen von *Yellon* und seinen Kollegen an isolierter Vorhoftrabekelmuskulatur erbrachten weitere Informationen der ischämischen Präkonditionierung am menschlichen Myokardgewebe ¹⁴⁴. So wurde bei Bypass-Patienten festgestellt, dass eine Phase vorübergehender Ischämie das Absinken des ventrikulären ATP-Spiegels verhinderte und somit lebensbedrohliches Kammerflimmern nicht zu beobachten war.

1.2. Stimuli und Effektoren des IP-Signalweges

Die nähere Erforschung des Phänomens sowie letztlich seine therapeutische Nutzbarmachung setzte jedoch eine strikte Trennung des Signalweges voraus. Das bedeutete, dass die zellulären Abläufe zum einen in den Abschnitt der Informationsvermittlung von extra- nach intrazellulär und zum anderen in den

Transduktionsabschnitt der intrazellulären Informationsweitergabe differenziert werden mussten. Man unterschied also die membrangebunden Abläufe und Strukturen von den zytosolisch und nukleär lokalisierten Zellorganellen. In vorhergehenden Studien der Wachstumsfaktoren-Signalvermittlung der IP konnte ansatzweise gezeigt werden, dass die Signale, die bei Kurzzeitschämie von der Zellmembran ausgehen, im Zytosol weitergeleitet werden, hier ihren Signalkaskadenendpunkt erreichen oder über eine Hintereinanderschaltung von Kinasen in den Zellkern vermittelt werden, um letztlich dort das Genom zur Gentranskription anzuregen¹⁴⁵⁻¹⁴⁸. Der Vorgang der Gentranskription und die nachfolgende Translation der mRNA in ein funktionelles Protein dauern jedoch länger an, als der Schutz durch IP vorhanden ist. Es ist daher anzunehmen, dass die zytosolischen Kinasen nicht nur Transkriptionsfaktoren, sondern auch andere zytosolisch lokalisierte Proteine phosphorylieren und aktivieren, die die Protektion vermitteln. Es ist wahrscheinlich, dass Membranproteine oder auch Membranrezeptoren zu diesen Proteinen gehören. Hierzu zählen Ionenkanäle oder Ionenaustauscher, die nach Kurzzeitschämie und Reperfusion den intrazellulären pH-Wert regulieren und damit die Ischämieresistenz erhöhen können. Experimente der Kalzium-¹⁴⁹⁻¹⁵², Kaliumkanäle¹⁵³⁻¹⁶¹ oder Natrium-Protonenaustauscher^{162,163} im Hinblick der IP erbrachten noch widersprüchliche Resultate. Die Differenzierung der Kaliumkanäle in die mitochondrialen und sarkolemmalen ATP-sensitiven Kaliumkanälen, war Hauptbestandteil weiterer Untersuchungen^{54,61,70,86,161,164-169}. Des Weiteren werden die Inhibitoren des NHE (Natrium-Protonen-Austauscher) im Setting des IP-Phänomens diskutiert. Antiarrhythmische Effekte werden bei dieser Substanzgruppe beschrieben, doch eine durch sie bedingte Kardioprotektion ist noch umstritten¹⁷⁰.

Die bislang wirkungsvollsten Stimuli des IP stellen die Aktivierungsstimuli des Adenosin-A1-Rezeptors, des Bradykinin-B2-Rezeptors¹⁷¹⁻¹⁷⁶, des muskarinischen M2-Rezeptors¹⁷⁷ und der 5'-Ectonucleotidase dar^{178,179}.

1.2.1. Die Rolle des Adenosin-Signalweges im IP-Phänomen

Verschiedene Autoren berichten von positiven Effekten des Adenosins hinsichtlich des ischämischen Myokards^{87,88,112,180-189}. Die protektiven Effekte des Adenosins während Hypoperfusion resultieren aus einer folgenden Vasodilatation der Koronararterien, was zu einer verbesserten Sauerstoffzufuhr führt und eine negativ inotrope Wirkung mit der Folge geringeren Sauerstoffverbrauches nach sich zieht. Während der Ischämie führt der myokardiale ATP-Verbrauch somit zu einer Akkumulation des Nukleotids¹⁹⁰⁻¹⁹².

Die kardialen Wirkungsmechanismen des Adenosins sind unterschiedlich aufgrund der Existenz der zwei Rezeptorsubtypen A1 und A2¹⁹³. Pharmakologische Antagonisten des A1-Rezeptors, nicht jedoch des A2-Rezeptors verhindern einen Schutz durch IP. Stimulation des A1-Rezeptors mittels Adenosin sowie durch einen selektiven Adenosin-Rezeptor-Agonisten führen zu einer Ischämie-Reperfusion-Stress-Toleranz vergleichbar derer, die durch IP ausgelöst werden kann¹⁹⁴. Der Mechanismus der adenosininduzierten Protektion ist bei vielen Spezies, einschließlich des Menschen, an die Aktivierung der PKC und der K_{ATP}-Kanäle gebunden^{153,155,167,168,195-197}. Bei der Ratte wird dabei allerdings die Bedeutung des Adenosin-Signalweges von verschiedenen Autoren in Frage gestellt^{182,186,198-200}. Versuche IP bei dieser Spezies durch Adenosin auszulösen blieben erfolglos. Der α 1-adrenerge Signalweg scheint dagegen bei diesen Tieren der vorherrschende Mechanismus zu sein.^{184,192,201,202} Die divergierenden Ergebnisse der Adenosinbedeutung konnten auf die unterschiedlichen Versuchsprotokolle hinsichtlich Dosierung und Schweregrad des Stresses zurückgeführt werden²⁰³.

Die Rolle der α 1-Adrenorezeptoren im IP-Phänomen ist ebenfalls noch nicht gesichert. Es wird postuliert, dass eine vorübergehende Ischämie vom Myokard "wahrgenommen" wird und zu einer Freisetzung endogener Mediatoren führt, die dann wiederum Einfluss auf den zellulären Stoffwechsel nehmen. Es wurde daher angenommen, dass Norepinephrin in die rezeptorvermittelte Signaltransduktion eingebunden ist, die schließlich zur Auslösung des IP führt. Immerhin haben frühere Studien bereits an Leber und Intestinum eine positive Einflussnahme des Zellstoffwechsels bei Stress nachgewiesen²⁰⁴. Die Rolle der α 1-adrenergen Stimulation durch Katecholamine bei IP wird durch die Beobachtungen unterstützt, dass zum einen kurze Ischämien die Norepinephrinfreisetzung fördern, zweitens eine exogene Zugabe von Norepinephrin den Schutzeffekt von IP stimuliert und drittens die Präkonditionierung aufgehoben wird, sobald ein selektiver α 1-adrenerger Rezeptorblocker vor oder nach der Kurzischämie verabreicht wird. Des Weiteren führen α 1-adrenerge Rezeptorblocker zur Eliminierung des protektiven Effektes exogenen Norepinephrins und eine IP äquivalente Protektion kann mittels selektiver α 1-adrenerger Stimulation durch Phenylephrine ausgelöst werden^{88,156,205,206}.

Diskussionsansatzpunkte bezüglich der unterschiedlichen Ergebnisse des α 1-adrenergen Rezeptors im Zustandekommen von IP waren einerseits die Resultate *Banerjees et al.*. Sie zeigten am Rattenherzen eine schnellere Erholungsphase der postischämischen kontraktile Dysfunktionen des Myokards nach Noradrenalingabe. Auch konnte Ischämie-induzierte Protektion durch Reserpin-bedingte Entleerung der präsynaptischen noradrenergen Vesikel

verhindert werden^{199,207}. *Weselcouch et al.* und *Bugge et al.* beobachteten ebenfalls nach Reserpinvorbehandlung eine andauernde Protektion durch Ischämie^{208,209}. Am Kaninchenherzen wiederum konnten *Toombs et al.* keine Protektion nach Reserpinvorbehandlung nachweisen²¹⁰.

Beim Menschen scheint zwar der Adenosin-Stimulationsweg der IP vorzuherrschen, jedoch kommt auch der α 1-adrenerge Signalweg vor^{193,211-213}.

1.2.2. Die Rolle des Kalziums im IP-Phänomen

Das Kalziumgleichgewicht wird durch verschiedene Signalwege aufrechterhalten^{150,151,158,214-216}. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung wird als gemeinsamer Nenner von Ischämie/Reperfusionstress-bedingter Zelldysfunktion und -tod angenommen.^{217,218} Die postischämische Dysfunktion reversibel geschädigter Myozyten sowie die irreversible letale Schädigung stehen somit in Zusammenhang mit einer erhöhten Ca^{2+} -Konzentration^{149,219}.

Ein endogener myokardialer Schutzmechanismus benötigt folglich einen Mechanismus, um diese zelluläre Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung zu verhindern. Alle genannten Stimuli der Präkonditionierung (Ischämie, Adenosin, Norepinephrin) erhöhen die Ca^{2+} -Konzentration, daher ist seine Rolle als Second messenger oder intrazellulärer Stressor des IP gesichert^{152,220,221}. Dagegen wird IP durch eine Blockade der L-type- Ca^{2+} -Kanäle mittels Verapamil verhindert und ein vorübergehender präischämischer Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration ahmt den Effekt von IP nach²²²⁻²³⁴.

1.2.3. Die Rolle des parasympathischen Signalweges im IP-Phänomen

Veröffentlichungen von *Thornton* und *Yao et al.* berichteten am perfundierten Rattenherzen sowie am Hundeherz von einer Reduktion der Infarktgröße durch Stimulation des muskarinischen M2-Rezeptors mittels Carbachol oder Acetylcholin.^{177,188,235}

Der Adenosinrezeptor und der muskarinische M2-Rezeptor sind dabei über ein G_i -Protein mit dem K_{ATP} -Kanal gekoppelt, sodass ihre protektive Wirkung über eine Blockade der Kaliumkanäle gehemmt werden kann²³⁶⁻²⁴¹.

1.2.4. Die Rolle des Bradykinin-Signalweges im IP-Phänomen

Der Bradykinin-B2-Rezeptor am Schweine- und Rattenherz konnte durch Gabe des spezifischen Bradykinin-B2-Antagonisten HOE 140 blockiert werden. Dies hatte zur Folge, dass eine IP-induzierte Infarktgrößenreduktion verhindert wurde²⁴²⁻²⁴⁷.

Im Gegenzug konnte an Kaninchen und Hunden²⁴⁸⁻²⁵⁹ durch die Gabe von Bradykinin und von Ramiprilat, einem Hemmer des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE), Protektion induziert werden^{173,174,260}.

1.2.5. Die Rolle der Kaliumkanäle im IP-Phänomen

Unbeeinflusst von der vorherrschenden kontroversen Diskussion entdeckten *Groß* und *Auchampach* 1993, von *Rohmann* 1994 bestätigt, dass die ATP-abhängigen Kaliumkanäle wesentlich an der Vermittlung des Ischemic Preconditioning beteiligt sind^{7,86,155,159,160,261}. Denn an den Spezies Schwein²⁶², Kaninchen^{191,263-266}, Hund¹⁵⁶ sowie beim Menschen²⁶⁷ konnten reproduzierbare Experimente durchgeführt werden. Der bisher unverständliche Anstieg der kardiovaskulären Mortalität durch orale Antidiabetika (K_{ATP}-Kanal-Blocker: Glibenclamid) im Vergleich zu rein diätetisch behandelten Diabetikern²⁶⁸ konnte aufgrund der K_{ATP}-blockierenden Wirkung des Antidiabetikums Glibenclamid erklärt werden. *Cleveland et al.* zeigten, dass das Mykord von Patienten, die mit K_{ATP}-Kanal-Blockern therapiert wurden, sich in anschließenden Versuchen nicht präkonditionieren liessen. Hier setzten die neuen Erkenntnisse hinsichtlich der physiologischen Unterschiede der Kaliumkanäle der Zellmembran und der Mitochondrialmembran an¹⁵³.

1.2.5.1. Die physiologische Rolle der mitochondrialen K_{ATP}-Kanäle am Herzen

ATP-abhängige Kaliumkanäle verbinden den metabolischen Status der Myozyten durch Veränderung des Membranpotenzials, sie werden bei physiologischem intrazellulären ATP-Gehalt blockiert und öffnen sich bei fallendem ATP-Level²⁶⁹. Die Funktion der mitochondrialen K_{ATP}-Kanäle am Herzen besteht darin, dass mitochondriale Matrixvolumen aufrecht zu erhalten. Das erhöhte Leistungsniveau des arbeitenden Herzen mit achtfachen ATP- und Sauerstoffverbrauchswerten bewirkt eine Aktivierung des mitochondrialen Elektronentransportsystems. Hierbei werden intramitochondriale Protonen gegen Kaliumionen ausgetauscht und ein Abfall des elektrischen Potenzials mit Depolarisation der mitochondrialen Membran ist die Folge²⁷⁰. Der Grad der Depolarisierung steht hierbei in direktem Zusammenhang mit dem Anstieg der Kaliumioneneinschleusung. Von *Garlid et al.* wurde vermutet, dass der Kaliumioneneinfluss der mitochondrialen K_{ATP}-Kanäle nur 5% der Gesamtkapazität übernimmt. Andere Gruppen vermuteten hingegen, dass die Öffnung der mitochondrialen K_{ATP}-Kanäle zu einer massiven Depolarisierung und einer sekundären Reduktion der mitochondrialen Kalziumaufnahme führt^{265,266,271,272}.

1.2.5.2. Die Rolle der mitochondrialen K_{ATP} -Kanäle im IP-Phänomen

Heute wird davon ausgegangen, dass die ATP-abhängigen Kaliumkanäle der mitochondrialen Membran im Gegensatz zu den oberflächlich lokalisierten sarkolemmalen ATP-abhängigen Kaliumkanälen, die entscheidenden Effektoren der ischämischen Präkonditionierung sind^{189,265,273-279}. Bei präischämischer Applikation des selektiv sarkolemmalen K_{ATP} -Kanal-Inhibitors „HMR 1098“ wurde im Gegensatz zur mitochondrialen K_{ATP} -Kanal-Blockade der kardioprotektive Effekt der ischämischen Präkonditionierung nicht beeinflusst^{167,168}.

Diazoxide sind selektive Öffner der mitochondrialen K_{ATP} -Kanäle. Sie besitzen eine 2000fach höhere Affinität gegenüber den mitochondrialen als den sarkolemmalen Kanälen^{280,281}. Es wurde gezeigt, dass sich die herzschtützende Wirkung der Diazoxide vor allem durch Verbesserung der funktionellen Erholungsphase isolierter Rattenherzen nach Einfluss von Ischämie/ Reperfusion²⁷⁶ sowie Infarktgrößenreduktion von Ratten-^{165,166} und Kaninchenherzen definierte^{164,282}. Andererseits wurde mittels des pharmakologischen Blockers 5-Hydroxydecanoate (5-HD), einem selektiven mitochondrialen K_{ATP} -Kanal-Inhibitor, der kardioprotektive Effekt von Diazoxiden^{265,276,282} und der ischämischen Präkonditionierung^{86,165,261,283} aufgehoben.

Glibenclamid dagegen ist ein Blocker sowohl der mitochondrialen als auch der sarkolemmalen K_{ATP} -Kanäle und wurde in Studien am Schwein²⁶², Hund²⁸⁴ und Kaninchen²⁸⁵ zur Blockade der myokardialen K_{ATP} -Kanäle verwendet. Auch hier zeigte sich, dass sowohl die Herzschutzwirkung durch pharmakologische K_{ATP} -Kanal-Öffnung als auch ischämische Präkonditionierung durch präischämische Glibenclamidverabreichung partiell oder vollständig aufgehoben werden konnten. Auch am präkonditionierten menschlichen Herz wurde Kardioprotektion durch aktivierte mitochondriale K_{ATP} -Kanäle bestätigt²⁸⁶. Der Zeitpunkt der Applikation der pharmakologischen K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren zeigte sich als entscheidender Faktor des protektiven Effekts. So mussten die Substanzen bereits vor oder spätestens zu Beginn des Präkonditionierungsprotokolls verabreicht werden, um die Schutzwirkung aufzuheben²⁸⁵. Eine Öffnung der K_{ATP} -Kanäle bereits während der Präkonditionierung ist daher für die kardioprotektive Wirkung notwendig²⁸⁷.

So attraktiv das Konzept der K_{ATP} -Kanäle der IP auch erscheint, kann es nicht darüber hinwegtäuschen, dass eine Reihe signifikanter Symptome der ischämischen Präkonditionierung nicht erklärt werden können, wie beispielsweise der „Gedächtnis-Effekt“. Daher waren Untersuchungen von intrazellulären Proteinkinase, mit der Fähigkeit Genmodulation zu bewirken, die unabweichliche Konsequenz der Erforschung von IP.

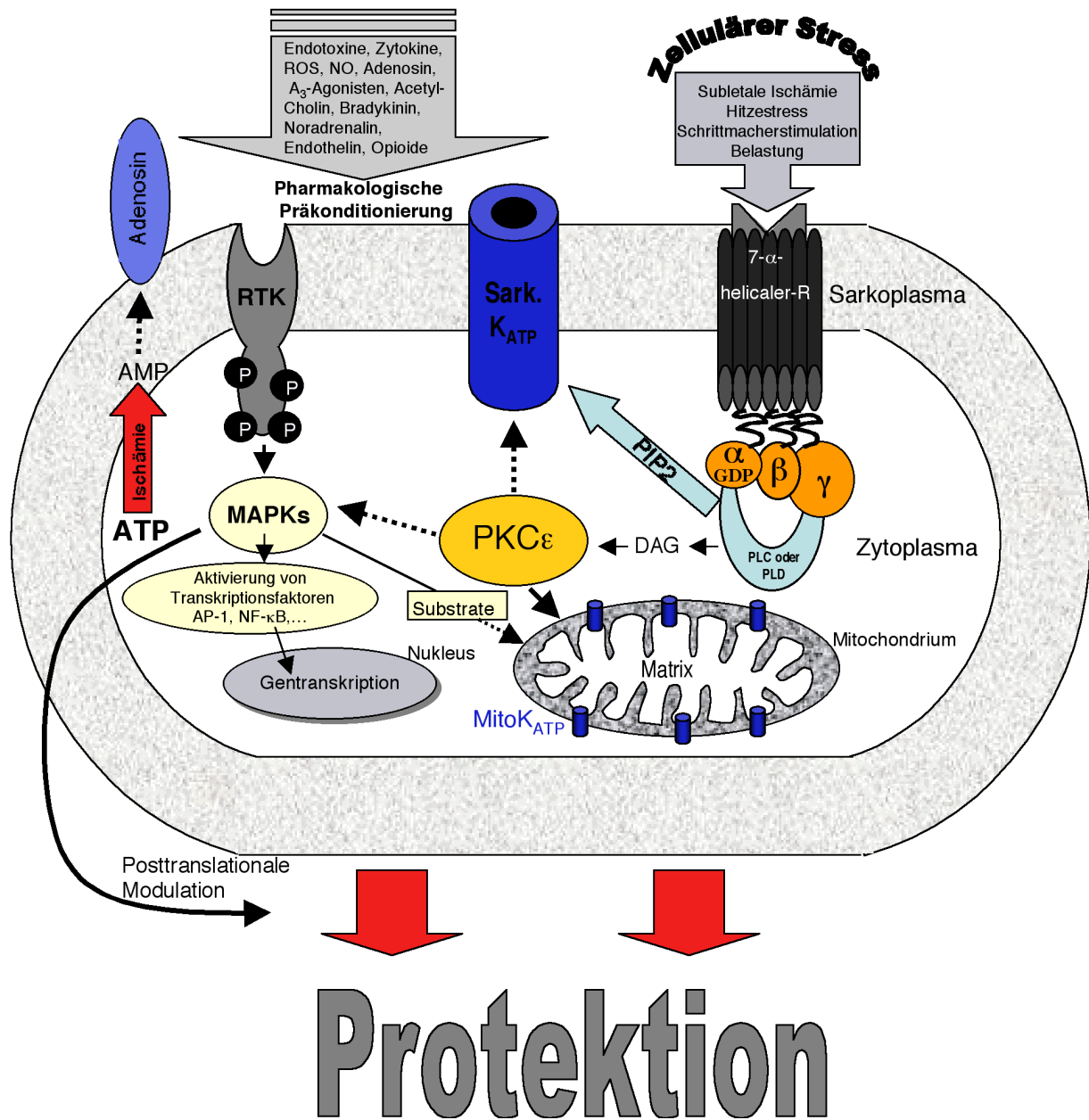


Abb. 1: Schematische Darstellung des zellulären Mechanismus der ischämischen Präkonditionierung (Protektion). RTK: Rezeptor-Tyrosinkinase; Sark K_{ATP} : sarkoplasmale Kaliumkanäle; Mitok K_{ATP} : mitochondriale Kaliumkanäle; R: Rezeptor; P: Phosphorylierungsstelle; ATP: Adenosin-Triphosphat; AMP: Adenosin-Monophosphat; PLC: Phospholipase C; PLD: Phospholipase D; PKC ϵ : Isoform epsilon der Proteinkinase C; PIP2: Phosphatidyl-Inositol-Biphosphat; DAG: Diacylglycerol; ROS: reactive oxygen species; NO: Stickstoffmonoxid; MAPKs: Mitogen-aktivierte Proteinkinasen.

2. Proteinkinasen im Phänomen der ischämischen Präkonditionierung

Die Registrierung extrazellulärer Signale verläuft in enger Assoziation mit der Membran. Der Transport durch die Zellmembran kann entweder durch Diffusion, gerichteten Transport oder untereinander vernetzte Reaktionskaskaden ablaufen. Auf der Zelloberfläche befinden sich in die Membran integrierte Membranrezeptoren. Die Aktivierung erfolgt durch die Bindung eines Liganden nach dem "Schlüssel-Schloss-Prinzip", d.h. spezielle Signale (Liganden) initiieren nach der Bindung an den spezifischen Rezeptor einen Informationsfluss über Kaskaden ins Zellinnere. Danach bedient sich die Zelle verschiedener, untereinander vernetzter Signaltransduktionsmechanismen, die das Signal an der zytoplasmatischen Seite, innerhalb des Zellinneren bis hin zum Zellkern weiterleiten. Es geschieht zum einen über Protein-Protein-Wechselwirkungen, wobei die Proteine in Form eines Rezeptors, eines Adaptorproteins oder als Enzym vorliegen können. Ein anderer Weg der Signalvermittlung ist über intrazelluläre, niedermolekulare Botenstoffe (second messenger), die im Verlauf der Signalübertragung in spezifischen enzymatischen Reaktionen gebildet werden und als Effektoren der nachgeschalteten Proteinregulation fungieren²⁸⁸. Diese beiden Wege der intrazellulären Signalvermittlung bedingen auch eine Aktivierung, d.h. Phosphorylierung von zytoplasmatischen Proteinkinasen, zu denen die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) gehören²⁸⁹⁻²⁹². Die Phosphorylierung eines Proteins ist eine spezifische enzymatische Reaktion, bei der einem Protein, das als Substrat dient, eine spezifische Proteinkinase zugeordnet wird. Die Proteinkinasen sind Phosphotransferasen. Sie katalysieren die Übertragung einer Phosphatgruppe von ATP auf eine Akzeptor-Aminosäure im Substratprotein. Das Produkt der Proteinphosphorylierung ist ein Phosphatester, der bei neutralem pH-Wert zwei negative Ladungen trägt. Von einem ungeladenen Aminosäurerest ausgehend, werden durch die Phosphorylierung zwei zusätzliche negative Ladungen im Substratprotein erzeugt. Die Änderung des Ladungszustandes des Proteins in definierten Strukturbereichen ist der entscheidende Aspekt der Proteinphosphorylierung und der folgenden Konformationsänderung²⁹³⁻²⁹⁵.

2.1. Proteinkinasen-Rezeptoren

Die sogenannten "Eintrittspforten", die Empfangsstellen für eintreffende Signale, die eine Reizweiterleitung durch die Phosphorylierungskaskaden von Proteinkinasen erfahren sind von vielfältiger Gestalt und Natur. Die Gewebeverteilung, d.h. die Expression eines Rezeptors, ist auf spezifische Zelltypen im Organismus

beschränkt. Das Expressionsmuster wird durch regulatorische Elemente wie Promotor und Enhancer beeinflusst. Es muss des weiteren ein aktivierender Ligand im Gewebe verfügbar sein, der an die extrazelluläre Region des Rezeptors bindet. Die Antwort auf die Rezeptor-Aktivierung hängt schließlich von intrazellulären Zielproteinen ab, die durch Phosphorylierungen aktiviert werden ²⁹⁶.

2.2.1. G-Protein-gekoppelte Transmembranrezeptoren

Die Liganden der G-Protein-gekoppelten Transmembranrezeptoren sind vor allem die biogenen Amine wie das Adrenalin, Noradrenalin, Histamine und Serotonin. Aber auch Peptide wie das Bradykinin, Bombesin und Thrombin sowie große Glykoproteine (z.B. Parathormon) stellen Liganden dieser Rezeptoren dar. Darüberhinaus werden auch sensorische Signale wie Licht von den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren aufgenommen und in intrazelluläre Signale umgewandelt ²⁹⁷. Der Transmembranrezeptor stellt ein integrales Membranprotein (Glykoprotein) dar, d.h. er besitzt Strukturanteile, die die Membran durchspannen und als Transmembrandomäne bezeichnet werden. An sie anschließend befindet sich eine extrazelluläre (ezD) sowie eine intrazelluläre (zytosolische) Domäne (izD) ²⁹⁸⁻³⁰¹.

Der extrazellulär lokalisierte Proteinanteil enthält die Ligandenbindungsstelle sowie Glykolisierungsstellen, welche Anheftungsstellen für Kohlenhydratreste darstellen. Die Struktur der extrazellulären Domäne hängt von der Anzahl und dem Aufbau der Transmembrandomänen (tmD) sowie von den Untereinheitenstrukturen des Rezeptors ab. Untereinheitenstrukturen können weitere Peptide bzw. Proteine sein, die sich über Disulfidbrücken oder nicht-kovalente Wechselwirkungen assoziativ an die ezD oder izD binden und in homotropem (mehrere identische Untereinheiten) oder in heterotropem Aufbau (unterschiedliche Untereinheiten) vorliegen ³⁰².

Die tmD kann in monomerer Form (meist aus 20-25 überwiegend hydrophoben Aminosäuren), aber auch dimere oder oligomere (aus bis zu 7 α -Helices zusammengesetzt oder gebündelt = 7 α -Helix-Transmembranrezeptor) Formen besitzen. Ihre Aufgabe ist es, Signale an die zytosolische Domäne weiterzuleiten und eine Fixierung des Rezeptors in der Phospholipid-Doppelschicht der Zellmembran zu erzielen ³⁰³⁻³⁰⁵.

Die Weiterleitung des Signals auf die Innenseite der Membran erfolgt zuerst über die Bindung der genannten Liganden an die ezD. Die Bindung bewirkt eine Konformationsänderung des zuvor konformationell gespannten, bindungsinaktiven

Rezeptors und überführt ihn in einen aktiven Zustand (Protein-Protein-Wechselwirkungen). Dies geschieht in Form eines weiteren Signals an die Innenseite der Membran, d.h. an die α -Untereinheit und an die nachgeschalteten Effektorproteine³⁰⁶. Der Empfang löst somit eine enzymatische Aktivität in der zytosolischen Domäne aus, die dann weitere Reaktionen in den Effektorproteinen bewirkt. Dies kann eine Aktivierung von G-Proteinen, die Bildung von sekundären Signalmolekülen, eine Tyrosin-spezifische-Kinasen-Aktivitätssteigerung, eine Ser/Thr-Kinase-Aktivitätssteigerung, die Bindung von Adaptormolekülen sowie die Aktivierung (Öffnung) von Ionenkanälen sein. Ebenfalls trägt die zytosolische Domäne wichtige Sequenzsignale, die für eine kurz- oder längerfristige Regulation der Rezeptoraktivität verantwortlich sind (Prinzip der Desensibilisierung). Es handelt sich hierbei vor allem um Proteinsequenzen wie Ser/Thr- oder Tyr-Reste, die eine Phosphorylierung des Rezeptors durch Proteinkinasen (Proteinkinase C oder cAMP-abhängige Proteinkinase A) ermöglichen³⁰⁷.

Die G-Proteine gehören zu der Familie der regulatorischen GTPasen, die mit ihren mehreren hundert Mitgliedern, wiederum durch die Existenz verschiedener AS-Sequenzen, Molekulargewichte und Untereinheitenstrukturen, in weitere Superfamilien unterteilt werden³⁰⁸. Hierzu gehören die Familie der heterotrimeren G-Proteine, die Ras/GTP-Superfamilie sowie die Familie der Initiations- und Elongationsfaktoren³⁰⁹⁻³¹².

2.2.2. Heterotrimere G-Proteine

Heterotrimere G-Proteine stellen die spezifischen Reaktionspartner der bereits besprochenen 7 α -Helices-Transmembranrezeptoren dar³¹³. Das charakteristische Strukturmerkmal der G-Proteine ist ihr Aufbau aus drei Untereinheiten^{314,315}.

Es kann die große α -Untereinheit (39-46 kDa) von einer β -Untereinheit (37 kDa) und einer γ -Untereinheit (8 kDa)³¹⁶ differenziert werden. Die Untereinheiten weisen eine große Diversität zwischen den Spezies auf und ihr Vorkommen ist auf spezifische Gewebetypen beschränkt. Eine assoziative Verankerung der α -Untereinheit (an ihrem N-Terminus) und des $\beta\gamma$ -Komplexes (am C-Terminus der γ -Untereinheit) mit der Membran erfolgt über Membrananker^{317,318}.

Die hauptsächliche Funktion der Signalübertragung, d.h. der Sitz der GTPase, wird von der α -Untereinheit übernommen³¹⁹. Die GTPasen binden und hydrolysieren GTP und üben dabei eine Schalterfunktion aus. Schalterfunktion bedeutet hier den zyklischen, unidirektionalen Übergang zwischen einer aktiven GTP-gebundenen Form in eine inaktive GDP-gebundene Form³²⁰. Die α -Untereinheit erlangt wie bereits beschrieben durch den Austausch von GDP gegen GTP und durch

Dissoziation der kleinen Untereinheiten β und γ ihren aktiven Zustand und löst sich schließlich aus dem Komplex mit dem Rezeptor. Die freie α -Untereinheit stellt somit die aktivierte G_{α} -GTP-Form des G-Proteins dar und trägt das Signal weiter^{321,322}. Der aus dem Komplex entlassene Rezeptor kann noch weitere inaktive G-Proteine aktivieren, wodurch eine Amplifikation des Signals erreicht wird. Die Wechselwirkung von G_{α} -GTP mit dem zugehörigen Effektormolekül führt zu dessen Aktivierung und somit zur Weiterleitung der Signalübertragungskette³²³. Die Bindungsstellen für den Effektor und für den $\beta\gamma$ -Komplex überlappen sich zum Teil, sodass die Bindung und schließlich die Aktivierung des Effektormoleküls erst dann erfolgen kann, nachdem der $\beta\gamma$ -Komplex abdissoziiert ist. Der freigesetzte $\beta\gamma$ -Komplex kann ebenfalls an der Signalleitung teilnehmen, indem er an ein ihm zugeordnetes Effektormolekül bindet und dies für eine weitere Signalleitung aktiviert. Seine Aktivierung erfährt der Komplex allein durch die Freisetzung aus dem inaktiven G_{α} -GDP- $\beta\gamma$ -Komplex³²⁴. Die G_{α} -Untereinheit fungiert hier als negativer Regulator, indem sie den Wechselwirkungsbereich des $\beta\gamma$ -Komplexes für nachgeschaltete Effektormoleküle maskiert³²⁵. Spezifisch dem $\beta\gamma$ -Komplex zugeordnete Effektoren sind Subtypen der Phospholipase C, die Adenylatzyklase, die β -adrenerge Rezeptorkinase sowie K^+ -Kanäle³²⁶.

Die Termination der Signalübertragung auf der Ebene der G-Proteine wird durch die Hydrolyse von GTP erzielt. Die Überführung des aktiven Zustandes in den inaktiven erfolgt durch Hydrolyse des gebundenen GTPs durch eine intrinsische GTPase. Dieser Zyklus der GTPasen wird zum einen durch Signale der Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren und zum anderen durch den kontrollierenden Eingriff von GTPase-aktivierenden-Proteinen (GAPs) und G-Nucleotid-Dissoziations-Inhibitoren (GDIs) intrinsisch mitbestimmt³²⁷⁻³²⁹. In der nun inaktiven, an GDP gebundenen Form, besitzt die α -Untereinheit eine starke Affinität zum $\beta\gamma$ -Komplex, sodass durch Assoziation der drei Untereinheiten der heterotrimere Grundzustand des G-Proteins wieder hergestellt wird³³⁰.

Des weiteren ist die Existenz von GTP-Analoga zu nennen, die von den GTPasen nur langsam oder überhaupt nicht hydrolysiert werden können. Somit kann es zu einer permanenten Aktivierung des Signalübertragungsweges kommen, wobei der primäre Signalweg blockiert wird. Im einzelnen sind GTP-Analoga: $GTP\gamma S$, β,γ -Methylen-GTP und β,γ -Imino-GTP³³¹.

2.2.2.1. Effektormoleküle des G_{α} -GTP-Proteins

Die aktivierten G-Proteine geben das Signal an folgende Effektormoleküle weiter:

1. Adenylatzyklase, Guanylatzyklase
2. Phospholipasen

Die Aktivierung dieser Enzyme führt zu Konzentrationsänderungen diffusibler Signalmoleküle. Hierzu gehören cAMP, cGMP, Diacylglycerol, Inositol-Triphosphat und Ca^{2+} , die wiederum weitere spezifische Reaktionen auslösen. Intrazelluläre Botenstoffe können in ortsspezifischen enzymatischen Reaktionen rasch und in großen Mengen gebildet und wieder schnell entfernt werden, d.h. inaktiv werden. Sie können außerdem, wie im Beispiel von Ca^{2+} , in Speicherorganellen gespeichert werden und so durch ein eintreffendes Signal schnell freigesetzt werden³³².

zu 1.) Die Adenylat-Zyklasten sind die Katalysatoren der 3,5-cyclischen-AMP-Bildung (cAMP) aus ATP. Der Bildung steht der Abbau des cAMP, d.h. die Inaktivierung durch Phosphodiesterasen gegenüber³³³.

Die Adenylat-Zyclase selbst ist ein Transmembranprotein, welches aus zwei Transmembrandomänen besteht, die je einen zytoplasmatischen N-terminalen Abschnitt besitzen. Die Struktur-Funktionsanalyse der Adenylat-Zyclase zeigte, dass die ATP-Bindung und die enzymatische Aktivität der cAMP-Synthese in den zytosolischen Domänen lokalisiert sind. Sie sind auch die Strukturelemente, die mit der α -Untereinheit der G-Proteine in Wechselwirkung treten³³⁴.

In der Literatur sind bis zu acht verschiedene Adenylat-Zyklasten beschrieben. Sie weisen hohe Sequenzhomologien auf, doch bewirkt die Vielfalt ihrer aktivierenden Signale oftmals eine gegensätzliche Regulation^{335,336}.

Die Existenz verschiedener Subtypen der Adenylat-Zyklasten und deren unterschiedliches Regulationsmuster lassen vermuten, dass den einzelnen Subtypen in verschiedenen Zellkompartimenten und Geweben spezifische Aufgaben zukommen, die jeweils einem definierten Regulationsprozess unterworfen sind³³⁷.

Das cAMP hat als eines der zentralen Botenstoffe die Aufgabe, Proteinkinasen zu aktivieren. Es handelt sich dabei vor allem um die Proteinkinasen A. Des weiteren reguliert cAMP die Ca^{2+} Passage durch Kationenkanäle. In analoger Weise wie cAMP wird das cGMP aus GTP unter Katalyse einer Guanylatcyclase gebildet. cGMP bewirkt ebenfalls die regulative Aktivierung ihrer abhängiger Proteinkinasen. Die cGMP-abhängigen Proteinkinasen besitzen vergleichbare Strukturelemente wie die Proteinkinase A^{333,338-340} (Abb. 2).

zu 2.) Eine weitere Klasse von Effektormolekülen, die eine Aktivierung durch G-Proteine erfahren, sind die Phospholipasen des Types A1, A2, C ($\text{C}\alpha$, $\text{C}\beta$) und D^{341,342}. Sie besitzen enzymatische Fähigkeiten, Phospholipide zu spalten^{343,344}. Die katalytische Spaltung von Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat in die beiden Botenstoffe Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Triphosphat (PtdIns-P_3) ist in der hier dargestellten Thematik eine Schlüsselreaktion der Phospholipase C. Sie

sind beide intrazelluläre Botenstoffe, wobei DAG mit seinem hydrophoben Charakter membranlokalisiert ist. Es gelangt durch Diffusion in der Plasmamembran zu membranassoziierten Effektorproteinen und reguliert dort deren Aktivität. Die zwei Funktionen des DAG-Signalmoleküls ist zum einen die Freisetzung von Arachidonsäure und folgend die Biosynthese der Prostaglandine³⁴⁵. Die zweite Funktion und in Hinsicht der MAPK-Regulation die wichtigere, ist die Stimulation der Proteinkinase C (PKC). Das hydrophile PtdIns-P3 ist nach Abspaltung als Signalmolekül wirksam. Es bewirkt dort seine primäre Signalfunktion, d.h. die Mobilisierung von Ca^{2+} aus Speicherorganellen des endoplasmatischen Retikulums. Nach der Bindung an seinen Rezeptor, einem Liganden-gesteuerten Transmembranprotein mit der Funktion eines Kalziumkanals, öffnet sich dieser unter weiterer komplexer Zusammenwirkung von Ca^{2+} , Mg^{2+} und ATP³⁴⁶ (Abb. 2)

2.3. Serin/Threonin-spezifische Proteinkinasen

Von den über 1000 bekannten Proteinkinasen sind die Ser/Thr-spezifischen und Tyr-spezifischen Enzyme am besten charakterisiert³⁴⁷ und gehören zu den hauptsächlichen Effektor-Kinasen der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion. Die Ser/Thr-spezifische Proteinkinase verestert einen Phosphatrest der alkoholischen Gruppe der Ser- und Thr-Reste unter Bildung von ADP aus ATP. Tyr-spezifische Proteinkinasen dagegen erzeugen einen Phosphatester mit der phenolischen OH-Gruppe von Tyr-Resten. Die Phosphorylierungsstelle eines Substratproteins am Ser/Thr-Rest wird durch zwei Determinanten charakterisiert. Es ist zum einen die Aminosäuresequenz in der Nachbarschaft der Phosphorylierungsstelle und zum anderen die Zugänglichkeit zum Ser/Thr-Rest. Die Sequenzen der Phosphorylierungsstellen zeigen kaum Sequenzhomologien, d.h. eine gemeinsame Konsensussequenz für alle Ser/Thr-Proteinkinasen ist nicht vorhanden, doch ist dies aufgrund der hohen Anzahl und Variabilität, d.h. der Unspezifität der Substratproteine auch nicht zu erwarten. Es ist weiterhin festzustellen, dass in vielen untersuchten Phosphorylierungssequenzen mehrere Ser/Thr-Reste vorkommen, sodass eine multiple und kooperative Phosphorylierung in einem Sequenzabschnitt möglich ist³⁴⁸.

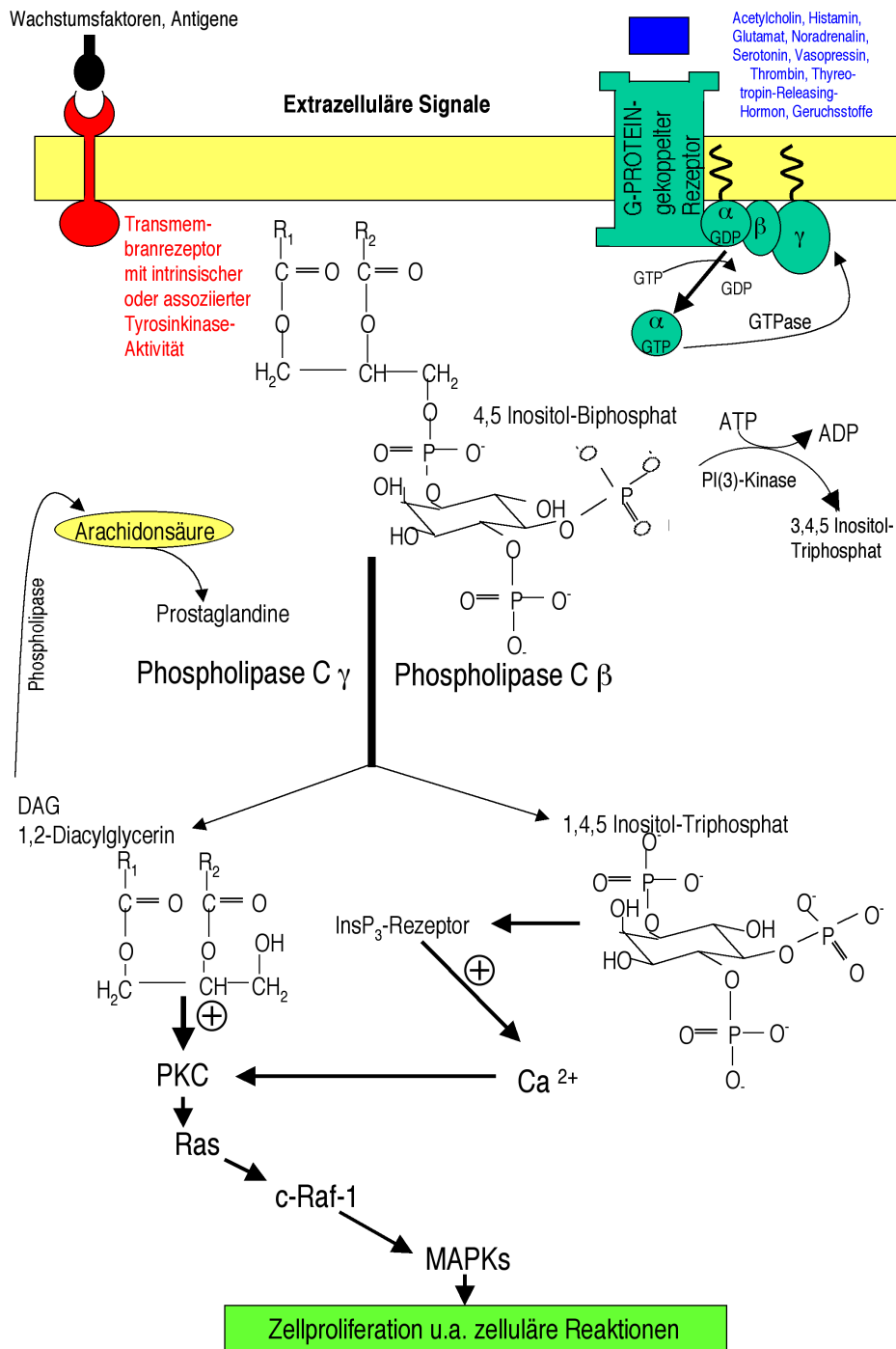


Abb. 2: Funktion und Bildung intrazellulärer Botenstoffe im Signalweg der Tyrosinkinase-Rezeptoren, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und Phospholipasen. PKC: Proteinkinase C; Ras: Schaltstellen Protein (erstmals im Rous Sarkom Virus isoliert); c-Raf-1: zytoplasmatische Proteinkinase (erstmals im murinen Leukämie Virus entdeckt); MAPKs: Mitogen-aktivierte Proteinkinasen; \oplus : aktivierender Stimulus.

Inhibition der Proteinkinasen durch Bindung spezifischer Strukturelemente eines Inhibitorproteins konnte bei fast allen Proteinkinasen beobachtet werden. Das aktive Zentrum der Kinase wird hierbei durch Bindung eines strukturkomplementären Substratproteins (Pseudosubstrat) blockiert. Dieser Mechanismus wird als intrinsische Regulation bezeichnet. Ist der Inhibitor selbst Teil der Proteinkinase, bezeichnet man den Vorgang als Autoinhibition. Durch das Fehlen des Phosphatakzeptors im Pseudosubstrat erfolgt jedoch keine Phosphorylierung. Die Inhibition wird dann aufgelöst, sobald ein externes aktivierendes Signal der Proteinkinase eintrifft. Dies kann z.B. ein Phosphorylierungssignal oder die Bindung eines Botenstoffes an das Inhibitorprotein sein.

Die Klassifizierung der Ser/Thr-spezifischen Proteinkinasen erfolgte 1991 durch *Hunter* und zeigte erstmals eine Aufstellung aller wichtigen Subfamilien³⁴⁹⁻³⁵¹:

1. ***durch cyclische Nukleotide regulierte Proteinkinasen***

1.1. cAMP-regulierte Proteinkinase A (PKA)

1.2. cGMP-regulierte Proteinkinasen

2. ***Diacylglycerol-regulierte Proteinkinasen***

Proteinkinase C (PKC) und ihre weitere Unterteilung in α , β I, β II, γ , δ , ϵ , ζ , η , ν , ι , λ und μ -Isoformen (Subtypen).

3. ***Kalzium/Calmodulin regulierte Proteinkinasen***

3.1. γ -Untereinheiten der Phosphorylase-Kinase

3.2. Myosin Light Chain Kinase

3.3. Ca^{2+} -Calmodulin abhängige Proteinkinase II

4. ***Ribosomale S6-Proteinkinase***

5. ***β -adrenergische-Rezeptorkinase***

6. ***Casein-Kinase II***

7. ***Glycogen-Synthase-Kinase***

8. ***CDCD2-Kinasen***

9. ***Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs)***, Kinasen mit zweifacher Spezifität, da sie sowohl Ser/Thr- als auch Tyr-Reste phosphorylieren können.

10. ***Mos/Raf-Proteinkinasen***

Aufgrund der Beteiligung der PKA, PKC und Mos/Raf-Kinasen in der Phosphorylierungskaskade der hier untersuchten MAPKs werden nur diese Kinasen beispielhaft näher beschrieben.

2.3.1. Proteinkinase A (PKA)

Die Struktur der Proteinkinase A besteht aus einem kleineren β -Faltblattstrukturanteil und einem größeren, hauptsächlich α -helikal strukturiertem Lappen. Beide sind flexibel miteinander verbunden. Der Bereich zwischen den beiden Anteilen stellt die ATP- und Substratbindungsstelle dar und transferiert nach Bindung des ATPs in das Innere des Proteinkinasemoleküls^{352,353}.

Ihre Aktivität wird durch das cAMP reguliert, in Abwesenheit von cAMP liegt sie inaktiv in der Struktur eines Tetramers, bestehend aus zwei regulatorischen (R₂) und zwei katalytischen Untereinheiten (C₂) vor. Um eine Aktivierung der Kinase zu erzielen, muss die Konzentration von cAMP ansteigen, sodass das inaktive Holoenzym (C₂R₂) seine noch maskierte katalytische Bindungsstelle freigeben kann. Dies geschieht dadurch, dass cAMP durch die Bindung an die R-Untereinheit, eine Dissoziation der beiden R-Untereinheiten als dimere Form bewirkt. Die beiden katalytischen Untereinheiten liegen nun als Monomere vor und sind in dieser Form aktiv, d.h. die Affinität zum Proteinsubstrat und zu ATP ist erhöht³⁵⁴. Der Vorgang der Aktivierung der PKA ist oftmals mit dem Wechsel der Lokalisation innerhalb der Zelle verbunden. Es können Translokationen der katalytischen Untereinheiten vom Golgi-Apparat über das Zytosol in den Kern beobachtet werden. Eine Assoziation und Bindung (über A-Kinase-Ankerproteine) zum Zytoskelett ist ebenfalls bekannt³⁵⁵. Die physiologischen Funktionen der Proteinkinase A sind vielfältig. Sie ist u.a. an der Regulation des Glycogen-, Glukose- und Lipidstoffwechsels beteiligt. Ihre Rolle im Phänomen der ischämischen Prækonditionierung ist nicht eindeutig geklärt. Eine PKA-Abhängigkeit der MAPK-Aktivierung im protektiven Mechanismus der IP ist jedoch nicht nachzuweisen³⁵⁶⁻³⁵⁸.

2.3.2. Proteinkinase C (PKC)

Die Proteinkinase C besitzt in ihrer aktivierten Form, durch die Bindung an RACK-Proteine (= **R**ezeptoren für die **a**ktiviert**e K**inase **C**), eine membranassoziierte Lokalisation³⁵⁹. Die Translokation aus dem Zytosol in die Membran geschieht mit Hilfe eines transienten Anstieges ihrer hydrophoben Cofaktoren, wie den Phospholipiden (z.B. Phosphatidylserin), Diacylglycerol bzw. Phorbolsterin^{347,360}. Ansonsten besteht zwischen membran- und zytosolgebundener

Form ein dynamisches Gleichgewicht. Die RACK-Proteine binden einen Strukturabschnitt der PKC, der weder das katalytische noch die Substratbindungsstelle blockiert, sodass die PKC schnell und ohne größeren Eingriff in die katalytische Aktivität gezielt an die Membran herangeführt und verankert werden kann ³⁶¹.

Ein eindeutiges Charakteristikum der PKC ist ihre Aktivierung durch Phorbolster (TPA = Tetradecanoyl-Phorbol-Acetat; PMA = Phorbol 12-myristate 13-acetat) ^{206,362}. Die gesteigerte Aktivität der Kinase durch den Zustand von Ischämie und Reperfusion dezimierte sich auf die selektive Aktivierung der Isoformen ϵ und η ^{201,363}. Vor allem die PKC ϵ bedingt das kardioprotektive Potenzial der Kinase, das durch verschiedenste Formen der pharmakologischen Präkonditionierung sowie der NO-bedingten Präkonditionierung zustande kommt. Ihre Funktion ist breitgefächert, sie ist an einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie Proliferationsregulationen und Differenzierungsprozessen beteiligt. Die bereits erwähnten 12 Subtypen zeigen die große Heterogenität der Kinase auf ³⁶⁴. Die unterschiedliche zelluläre Lokalisation und Aktivierbarkeit durch ihre Cofaktoren, die verschiedenen Funktionen und Substratproteine machen dies aus ^{349,365}.

Die Primärstruktur der Kinase ist eine Polypeptidkette, ihr Molekulargewicht liegt je nach Subtyp zwischen 68-83 kDa ³⁶⁶. Die Polypeptidkette trennt sich in einen C-terminalen Abschnitt, in dem sich die katalytische Domäne befindet, und in einen N-terminalen Abschnitt mit Sitz der regulatorischen Domäne auf. Der C-Terminus besteht aus vier C-Untereinheiten, wobei C1 mit zwei Cysteinresten für die Bindung von PMA verantwortlich ist. C2 bindet Ca^{2+} , C3 und C4 besitzen Bindungssequenzen für ATP und das Substratprotein ³⁶⁷.

Von den vielen Substratproteinen der PKC sind die MARCKS-Proteine charakteristische und vor allem spezifische Substratproteine der sonst wenig substratspezifischen PKC. MARCKS steht für **m**yristoyliertes, **A**lanin-reiches **C**-Kinase **S**ubstrat. Sie sind Proteine, die nach Proteinkinase C-vermittelter Phosphorylierung durch Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts an Vorgängen wie Zellmobilität, Sekretion, Membrantransport und Regulation des Zellzyklus beteiligt sind ^{368,369}. Weitere Substrate der PKC sind z.B. der Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor, ein inhibitorisches Protein des Transkriptionsfaktors NF κ B (=I κ B), ein Na^+/H^+ -Austauschprotein, verschiedene Tyrosinkinasen (vor allem Isoenzyme der Src- und Lck-Subfamilie), die Serin-Threoninkinase Akt, die Raf-Kinasen, mitochondriale und sarkolemmale ATP-sensitive Kaliumkanäle sowie Transkriptionsfaktoren des AP-1-Komplexes ^{370,371}. Es können sowohl PKC-abhängige als auch PKC-unabhängige Wege der MAPK-Aktivierung aufgezeigt werden ³⁷²⁻³⁷⁴.

Die Bedeutung der Proteinkinase C im Zustandekommen der protektiven Wirkung von IP ist ebenfalls kontrovers. An der Ratte^{196,197,209}, am Kaninchen³⁷⁵⁻³⁷⁷ und am Meerschweinchen³⁷⁸ führt eine Hemmung der PKC zum Verlust der protektiven Wirkung von IP. Die Aktivierung der Proteinkinase durch PMA induziert dagegen Protektion. Am Hunde-³⁷⁹ und am Schweinemyokard³⁸⁰ führte eine Aktivierung bzw. Hemmung der PKC jedoch nicht zur Protektionsvermittlung respektive -blockade.

2.3.3. Ser/Thr-spezifische Proteinphosphatasen

Die Termination der Ser/Thr-Proteinkinasen-vermittelten Signale erfolgt durch spezifische Protein-Phosphatasen, die die unter physiologischen Bedingungen sehr stabilen Phosphatester an den Ser/Thr-Resten abspalten.

Im Säugetier sind vier verschiedene Ser/Thr-Phosphatasen zu unterscheiden. Es sind die Proteinphosphatasen (PP) 1, 2A, 2B und 2C. Sie liegen als Heterodimere vor und sind untereinander in hohem Maße strukturhomolog. Sie weisen lediglich Unterschiede in der Substratpräferenz und in der Art ihrer Regulation auf³⁸¹.

Proteinphosphatasen sind eine Art "dualer Kontrahenten" der Proteinkinasen. Sie terminieren oder schwächen deren Signalvermittlung, können aber auch durch Dephosphorylierung eines Signalproteins das Signal der Kinase verstärken. Daher ist es von essentieller Wichtigkeit, dass es im Verlauf einer Signalvermittlung ein koordiniertes und abgestuftes Zusammenwirken der Proteinkinasen und -phosphatasen gibt³⁸². Ein spezifisch inhibierendes Agens der Proteinphosphatase 2A ist Okada-Säure (okadaic acid)³⁸³⁻³⁸⁵. Es konnte eine protektive Wirkung des Inhibitors im ischämischen Myokard sowie der ischämischen Präkonditionierung festgestellt werden.

2.4. Rezeptor-Tyrosinkinasen

Eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren (Proteinhormone) stellen extrazelluläre Signale dar, die durch Bindung an Transmembranrezeptoren mit intrinsischer tyrosinspezifischer Aktivität oder einer assoziierten Tyrosinkinaseaktivität die intrazelluläre Signalleitung der MAPKs-Wege aktivieren. Charakteristisch ist der Aufbau der Rezeptor-Tyrosinkinase, bestehend aus einer extrazellulären, einer transmembranen und einer intrazellulären Tyrosinkinasedomäne.

Intrinsische Tyrosinkinaseaktivität bedeutet, dass die Ligandenbindungsdomäne und die Tyrosinkinase Teil eines Rezeptorproteins sind. Wogegen der Rezeptor mit einer assoziierten Tyrosinkinase-Aktivität das Signal an eine Tyrosinkinase

weiterleitet, die nicht intrinsischer Teil des Rezeptors ist, sondern permanent oder transient an die zytoplasmatische Rezeptordomäne assoziiert ist ³⁸⁶.

Die extrazelluläre und die transmembrane Domäne überspannen die Zellmembran im inaktiven Zustand als Monomere. Durch ligandeninduzierte Dimerisierung werden zwei der inaktiven Monomere aktiviert. Sie sind dann in der Lage, sich gegenseitig zu phosphorylieren und die Phosphorylierung weiterer zytoplasmatischer Proteine anzuregen ^{387,388}.

2.4.1. Liganden des Rezeptors mit intrinsischer-tyrosinspezifischer Aktivität

- Platelet Derived Growth Factor; PDGF
- Epidermal Growth Factor; EGF
- Transforming Growth Factor, TGF- α und β 1-3
- Insulin-like Growth Factor; IGF-1 und -2
- Fibroblast Growth Factor; FGF 1-4

Dies sind einige Beispiele der Wachstumsfaktoren, die als Folge der Tyrosin-Phosphorylierung die Teilungsaktivität, Differenzierung und Morphogenese von Zellen mitregulieren. Das ursprüngliche Charakteristikum der Entdeckung der Wachstumsfaktoren war die Fähigkeit, die Teilung kultivierter Zellen anzuregen ³⁸⁹⁻³⁹¹.

Fantl et al. beschrieben mehr als 50 Mitglieder der Rezeptortyrosinkinasefamilie, die wiederum nach ihren Ligandenspezifitäten in weitere Subfamilien unterteilt werden ³⁸⁶. *Ullrich und Schlessinger* klassifizierten die Subfamilien anhand der Sequenz- und Strukturunterschiede der Ligandenbindungsdomäne. Sie zeigten die Unterteilung in vier Klassen. Klasse I-Rezeptoren besitzen zwei cysteinreiche Sequenzen im extrazellulären Teil ³⁹². Beispielhaft für diese Klasse ist der Rezeptor des "Epidermal Growth Factors". Klasse II-Rezeptoren stellen die einzige Rezeptorklasse dar, welche immer als Dimer vorliegt. Sie bestehen aus je zwei α - und β -Untereinheiten, welche über extrazelluläre Disulfidbrücken zusammengehalten werden. Als Beispiel für diese Rezeptorklasse dient der Insulinrezeptor ³⁹³. Charakteristisch für Rezeptoren der Klassen III und IV sind immunglobulinähnliche, extrazelluläre Domänen, deren Struktur durch Disulfidbrückenbildung zwischen Cysteinresten einer spezifischen Abfolge stabilisiert werden. Klasse III-Rezeptoren besitzen fünf, Klasse IV-Rezeptoren drei dieser immunglobulinähnlichen Domänen. Beide Rezeptorklassen kennzeichnet außerdem ein sogenanntes "kinase-insert", welches die Tyrosinkinasedomäne in zwei Teile unterteilt. Beispielhaft für Klasse III-Rezeptoren ist der "Platelet Derived Growth Factor

Receptor (PDGF-Rezeptor)"^{289,394}, für die Klasse IV-Rezeptoren der "Fibroblast Growth Factor Receptor (FGF-Rezeptor)". In die Klasse V der Tyrosinkinase-Rezeptoren sind die Rezeptoren der Neurotrophine einzuordnen, beispielhaft ist der Rezeptor TrkA des „Nerve-Growth-Factors“ (NGF) zu nennen^{395,396} (Abb. 3).

Beispielhaft für die Signaltransduktion, die von Rezeptor-Tyrosinkinasen ausgeht, wird die FGF-Rezeptor-Kaskade (FGFR-1) beschrieben. Hier ist der Signalverlauf über die Ras-Raf-ERK-Kaskade gesichert³⁹⁷. Die intramyokardiale Applikation von b-FGF bewirkte im hier beschriebenen Schweinemodell eine kardioprotektive Wirkung, ähnlich der ischämischen Präkonditionierung^{64,398}. Zytoprotektive Wirkungen des Wachstumsfaktors bei zerebraler Ischämie konnten bereits in verschiedenen Tiermodellen dargestellt werden.

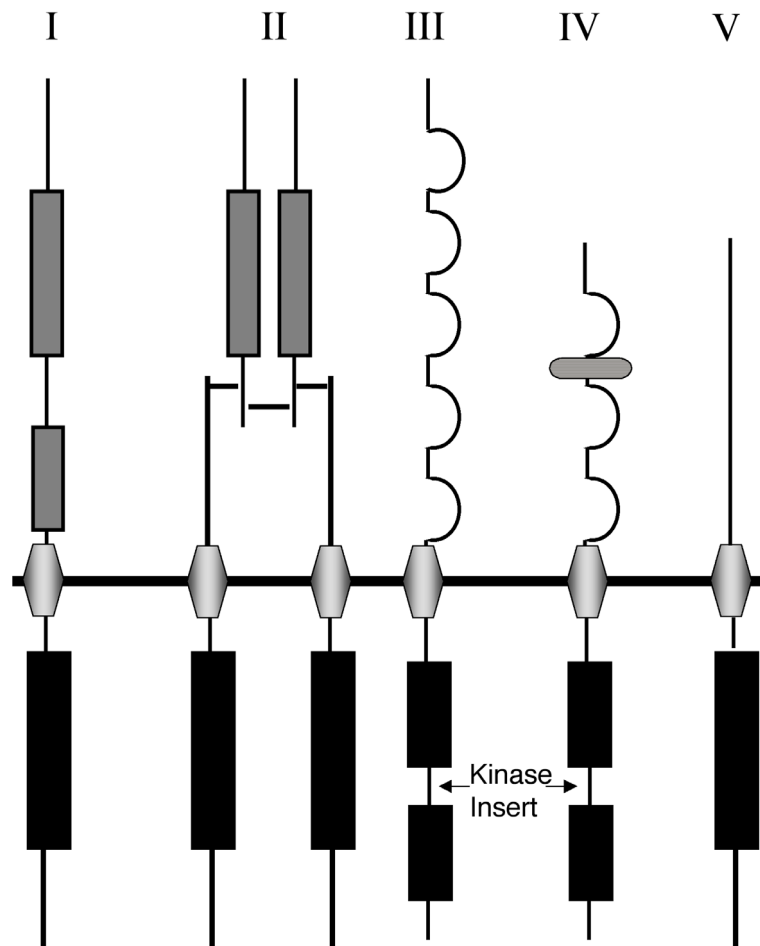
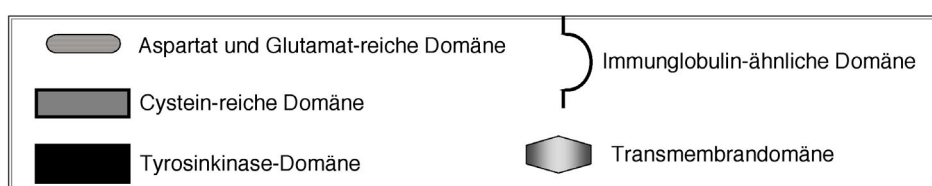


Abb. 3: Lineare Darstellung der Domänenstruktur einiger Rezeptor-Tyrosinkinasen nach der Klassifizierung von Ullrich & Schlessinger (1990).



FGFs wirken mitogen auf Fibroblasten, Neuroektodermalzellen, Kapillar- und Endothelzellen. Den FGF-Faktoren werden *in vivo* physiologische wie auch pathologische Funktionen zugesprochen³⁹⁹⁻⁴⁰². Spezifische Mitglieder der FGF Familie sind intrazelluläre Schlüsselmoleküle während der embryonalen, fetalen und juvenilen Entwicklung⁴⁰³. Im Speziellen sind sie dafür verantwortlich, dass während der frühen embryonalen Entwicklung eine Segmentierung des Mesoderms stattfindet^{404,405}. Sie spielen außerdem eine entscheidende Rolle bei der Gliedmassenentwicklung und sind darüberhinaus durch ihre Wirkung auf Endothelzellen wesentlich an der Entwicklung des Gefäßsystems beteiligt^{406,407}. Rezeptorgekoppelte FGF-Signale regulieren die Mitogenese und das Überleben von embryonalen Myozyten der frühen Kardiogenese^{408,409}. Weiterhin ermöglicht die Aktivierung des FGFR-1 den Signalweg des Neuritenwachstums und stimuliert die Bildung von Blutzellen. Andererseits sind sie an der diabetischen Retinopathie, der rheumatoiden Arthritis und am Tumorwachstum beteiligt^{410,411}. Daher ist es von besonderer Wichtigkeit, die Möglichkeit der FGF-Beteiligung in der Angiogenese, am Wundheilungsprozess, an der Infarktentstehung und an Gefäßerkrankungen zu betrachten⁴⁰⁴.

Die Liganden, d.h. die Wachstumsfaktoren, liegen häufig wie beschrieben in homo- oder heterodimerer Form vor, sodass eine Bindung an einen homo- bzw. heterodimeren Rezeptor notwendig ist. Die Tyrosinkinase-Domäne der Rezeptor-Tyrosinkinase wird durch eine multiple Ligandenbindung aktiviert, die zur Oligomerisierung des zuvor dimeren oder monomeren Rezeptors führt⁴¹². Eine Autophosphorylierung oder die Phosphorylierung von Substratproteinen ist die Folge. Die Substratproteine (Effektorproteine) des Rezeptors können durch die Phosphorylierung eine enzymatische Aktivität erlangen oder auch als Adaptorproteine wirksam werden^{413,414}. Die Funktion eines Adaptorproteins ist es, weitere Signalproteine zur Zellmembran bzw. zum aktivierten Rezeptor zu bringen und somit Teil des Signalkreislaufes zu werden. Unter Autophosphorylierung versteht man zum einen die Autoaktivierung der Tyrosinkinase selbst. Dies geschieht durch Phosphorylierung der Tyrosinreste, die in der Nähe oder direkt im aktiven Zentrum der Kinase lokalisiert sind. Zum anderen werden durch die Autophosphorylierung neue Tyrosinreste geschaffen, die wieder Bindungsstellen für nachgeschaltete Effektormoleküle darstellen⁴¹³.

Das Zusammenspiel von FGF (Ligand), Rezeptor und Heparansulfatproteoglykanen (HSPGs) ist verantwortlich für die Aktivierung und beginnende Signalübertragung.

Nachdem der Ligand gebunden hat, dimerisieren 2 Rezeptormoleküle. Diese Dimerisierung aktiviert den Rezeptor⁴¹⁵⁻⁴¹⁷. Die Aktivität wird durch intermolekulare Autophosphorylierung des Rezeptors im Bereich beider zytoplasmatischer Tyrosinreste weiter verstärkt. Die Autophosphorylierung stellt ein Signal für die Liganden-induzierte Rezeptor-Endozytose dar, ein Phänomen der Internalisierung nach Ligandenbindung, das zum einen für die Rezeptor-Signalwirkung erforderlich ist aber auch eine Abschwächung des Signals durch Herunterregulierung bewirken kann⁴¹⁸. Das FGF-Rezeptor-Protein gelangt durch Translokation von der Zelloberfläche als strukturell intakte und funktionstüchtige Tyrosinkinase über das Zytoskelett in eine perinukleäre Position⁴¹⁹.

Die phosphorylierten Tyrosinstellen am Rezeptor entsprechen Bindungsstellen für Substratproteine. Bedeutende Substratproteine (Effektorproteine) der Rezeptor-Tyrosinkinasen sind⁴²⁰⁻⁴²³:

- p85 (kDa)-Untereinheit der **Phosphoinositol-3-Kinase**
- **Phospholipase C γ**
- **zytoplasmatische Tyrosinkinase der Src-Tyrosinkinase-Familie** (p60 und p85, Homologe zu Cortaktin, einem F-Aktin-bindenden Protein)
- **p120-GAP** (GTPase aktiviert), ein Enzym der Ras-Signalvermittlung
- Adaptorprotein **Grb2** der Ras Signalübertragung
- Adaptorprotein **SHC** (SH₂ domain-containing adaptor-protein: Adaptorprotein mit SH₂-Domäne)
- **SOS**, ein Ras-Guanin-Nukleotidfreisetzungsfaktor
- **Tyrosinspezifische Proteinphosphatase SH-PTP2**

Die Übertragung des Signals vom aktivierten Tyrosinkinase-Rezeptor zu den genannten Effektorproteinen und an nachgeschaltete Zielproteine geschieht durch spezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen. Diese Wechselwirkungen werden von sogenannten Protein-Domänen oder auch Proteinmodulen (60-100 Aminosäuren) des Effektorproteins vermittelt. Sie schaffen eine enge räumliche Zuordnung von signalübertragenden Enzymen zu ihren Zielsubstraten. Das p120-GAP-Enzyme hat z.B. das Ras-Protein zum Zielprotein. Das Ras-Protein ist an der Membran lokalisiert, sodass durch die Protein-Domäne des p120-GAP-Enzymes die Translokation des zytosolischen Enzymes zur Membran eingeleitet wird. Der FGF-Signalweg führt über einen möglichen SHC-Grb2-SOS-Komplex zur Aktivierung von Ras. *Vainikka et al.* konnten zwar keine direkte Interaktion von Grb2 mit dem FGF-Rezeptor-1 feststellen, eine Stimulierung von FGFR-1-

exprimierenden Zellen führte jedoch zur Hyperphosphorylierung von Raf-1, einer Protein-Serin-Kinase, die Ras nachgeschaltet ist. Darüber hinaus erfolgte eine Phosphorylierung der MAPKs, vor allem der ERK-1 und ERK-2⁴²⁴. Die aktivierten MAP-Kinasen können in den Zellkern transloziert werden, wo sie Transkriptionsfaktoren, wie c-Myc, c-Fos und Elk-1 aktivieren. Nukleäre onkogene Proteine wie c-Fos und c-Jun, die in kardialen Muskelzellen durch aFGF und bFGF induziert werden, nehmen in einfachen Systemen Einfluss auf die Genexpression⁴²⁵. Die ERK-Aktivität der beiden 44 und 42 kDa (ERK1 und-2) großen Proteine wird in adulten Kardiomyozyten durch bFGF um mehr als das 2-fache stimuliert⁴²⁶. Versuche mit Mäusen einer transgenen Linie, die das kardiospezifische Expressions-Konstrukt der humanen FGF-1-cDNA aufzeigen, welches an die ventrikuläre Isoform der "myosin light chain", als Promotor gekoppelt ist, zeigten verzögerte Infarktentstehung im Vergleich zu Wildtypmäusen. Diese Kardioprotektion kam durch ein erhöhtes Aktivitätspotenzials der ERK-1/2 in den transgenen Tieren zustande. Die Inhibierung des ERK-1/2-Weges mittels des spezifischen Inhibitors UO126 minderte den kardioprotektiven Effekt von FGF-1 auf den Level der Wildtyp-Mäuse^{427,428}.

Für die Bindung der genannten Adaptorproteine mit den nachfolgenden Effektorproteinen sind eine Vielzahl von Protein-Domänen verantwortlich. Für die MAPK-Signalkaskade wichtig sind die SH2-, SH3, PTB- (Phosphotyrosin-Bindungsdomäne) und Pleckstein-Homologie- (PH-) Domänen. Die oben genannten Effektorproteine können eine größere Anzahl dieser Domänen oder auch die Kombination verschiedener in ihrer Sequenz vereinigen. Auch ist der lineare unidirektionelle Weg der Signaltransduktion, wie im Schema (Abb. 4) dargestellt, nur selten zu beobachten. So weist zum Beispiel der FGF-Rezeptor mehrere Auto-phosphorylierungsstellen auf, die unterschiedliche Sequenzumgebungen haben und daher unterschiedlichen SH2-haltigen Effektormolekülen zugeordnet sind. Bis zu acht unterschiedliche Effektormoleküle können über die verschiedenen Phosphotyrosin-Sequenzen an die zytoplasmatische Seite des FGF-Rezeptors binden, sodass ein und derselbe Rezeptor an sehr unterschiedlichen Signalwegen beteiligt sein kann⁴²⁹.

Die Herunterregulierung von FGF-Signalen impliziert einen lysosomalen Abbau und einen Abfall der Menge an verfügbaren Oberflächenrezeptoren. Hierbei spielt die Dephosphorylierung von Rezeptoren und Substraten durch Protein-Tyrosin-Phosphatasen eine wichtige Rolle. Bevor jedoch eine Inaktivierung des Rezeptors durch Proteasen erfolgt, werden an den Rezeptor Ubiquitin-Moleküle gebunden, die in die ATP-abhängige Proteolyse von kurzlebigen Proteinen, wie z.B. Myc und Fos verwickelt sind⁴³⁰.

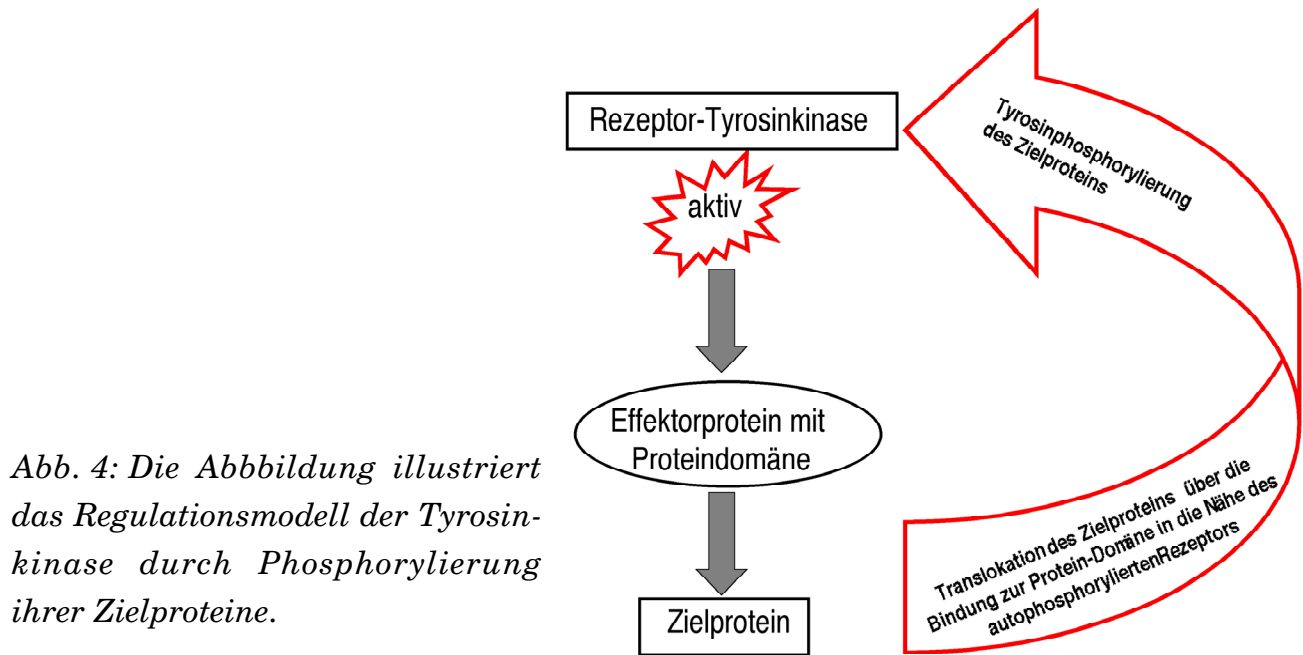


Abb. 4: Die Abbildung illustriert das Regulationsmodell der Tyrosinkinase durch Phosphorylierung ihrer Zielproteine.

2.4.2. Proteinmodule der intrazellulären Signalübertragung nach Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen

2.4.2.1. SH2-Domäne

Die Bezeichnung der Domäne stammt von **Src-Homolog**, wobei Src-Tyrosinkinasen die ersten charakterisierten Tyrosinkinasen sind und die SH2-Domäne große Homologien zu ihnen aufweist. *Songyang und Cantley* teilten die SH2-Domänen in weitere fünf Klassen ein (1A, 1B, 2, 3, 4)⁴³¹⁻⁴³⁶. Die SH2 Domänen erkennen in ihren Zielproteinen Phosphotyrosinreste und deren spezifische Nachbarsequenzen, die für die Bindung der Domäne an das Zielprotein zwingend erforderlich sind. Die SH2 1A-Domäne der Src-Tyrosinkinase benötigt zur Bindung an das Zielprotein zum Beispiel in Position +3 zum Phosphotyrosin die Aminosäure Isoleucin⁴³⁷.

2.4.2.2. PTB-Domäne

Bei den **Phosphotyrosin-Bindungs-Domänen** handelt sich um Bindungsstellen, die z.B. in dem Adaptormolekül Shc vorhanden sind⁴³⁸. *Zhou und Pawson* untersuchten das Insulinrezeptorsubstrat IRS1, welches eine PTB-Domäne enthält und zeigten, dass die Domäne vor allem Phosphotyrosinreste im Kontext zu N-terminal gelegenen Sequenzabschnitten erkennt. Obwohl die PTB-Domäne die Präferenz zu Phosphotyrosinresten mit der SH2-Domäne teilt, weisen sie doch unterschiedliche Strukturen auf. Die sekundäre Struktur ähnelt nach der Art der Faltungstopologie eher der PH-Domäne^{391,439,440}.

2.4.2.3. Pleckstein-Homologie-Domäne (PH-Domäne)

Die Bezeichnung der Domäne stammt von dem ursprünglichen Fundort der Domäne, den Pleckstein-Proteinen, die Bestandteile der Blutplättchen sind und dort als Hauptsubstrat der PKC fungieren³⁰³. Des Weiteren wurde die Domäne noch in einer Vielzahl weiterer Signalmoleküle, wie der Phospholipase C, in G-Nucleotid austauschfaktoren und in Proteinen des Zytoskeletts nachgewiesen. Am Beispiel der Phospholipase C konnte gezeigt werden, dass die PH-Domäne mit hoher Affinität Phospholipide bindet, wodurch die Domäne eine Verankerung der Lipase an die Membran erreicht⁴⁴¹.

2.4.2.4. SH3-Domäne

Auch diese Domäne kommt in Signalproteinen des Tyrosin-Kinase-Signalweges vor. Außerdem ist sie Bestandteil des Zytoskeletts (Aktin-bindendes Protein von α -Spectrin und Myosin I β). *Cohen et al.* zeigten in Untereinheiten der neutrophilen Cytochromoxidase das Vorkommen der SH3-Domäne. Bindungssubstrate der Domäne sind prolinreiche Aminosäuresequenzen (>10 Aminosäuren), wobei die invarianten Prolinreste an eine hydrophobe Stelle der Domäne gebunden werden⁴⁴². Ähnlich der SH2-Domäne erfolgt eine weitere Unterteilung in mehrere Klassen. *Feller et al.* zeigten, dass durch Deletion der SH3-Domäne aus der zytoplasmatischen Src-Tyrosinkinase das tumortransformierende Potential der Kinase anstieg. Sie zogen daraus den Rückschluss, dass die Domäne die schrittweise Akkumulation der genetischen Information einer Zelle mitverändert. Dies bedeutet, dass die Kinase durch Mutation in ein dominantes Onkoprotein überführt werden konnte, woraus eine unkontrolliert erhöhte Tyrosinkinase-Aktivität mit folgender unkontrollierter Zellproliferation/-differenzierung resultierte⁴⁴³.

2.4.2.5. Adaptormoleküle

Ein Adaptorprotein ist ein Bindeglied oder auch Vernetzungsproteinmodul, das gezielt Signalmoleküle zusammenführt, um damit z.B. ein Enzym in die unmittelbare Nachbarschaft seines Substrates zu bringen⁴⁴⁴⁻⁴⁴⁶. Das Grb-2-Protein (**G**rowth factor **r**eceptor **b**inding protein) ist ein Adaptorprotein, welches als Komponente der Signalübertragung von Wachstumsfaktoren zum Ras-Signal-Weg identifiziert wurde. Das Adaptorprotein Grb-2 besitzt selbst keine enzymatische Aktivität, es hat jedoch in seine Sequenz sowohl die SH2 als auch die SH3-Domäne eingeschlossen. Über diese Domänen erhält das Adaptorprotein Assoziation und schließlich Bindung an weitere Adaptorproteine, wie z.B. das Shc-Adaptorprotein.

Eine Bindung an den EGF- und den PDGF-Rezeptor sowie an den GTP - GDP-Austauschfaktor SOS, ist ebenso möglich^{447,448}. SOS leitet folgend über Nucleotid-austausch das Signal an das Ras-Protein weiter.

2.5. Transmembranrezeptoren mit einer assoziierten Tyrosinkinase

Hierbei handelt es sich um Tyrosinkinasen, die nicht integraler Bestandteil eines Rezeptors sind. Sie sind permanent oder transient an Strukturen des Zytoplasmas gebunden. Eine schematische Übersicht modifiziert nach *Taniguchi et al.* zeigt beispielhaft einige Familien der zytoplasmatischen Tyrosinkinasen³⁸⁹ (Abb. 5).

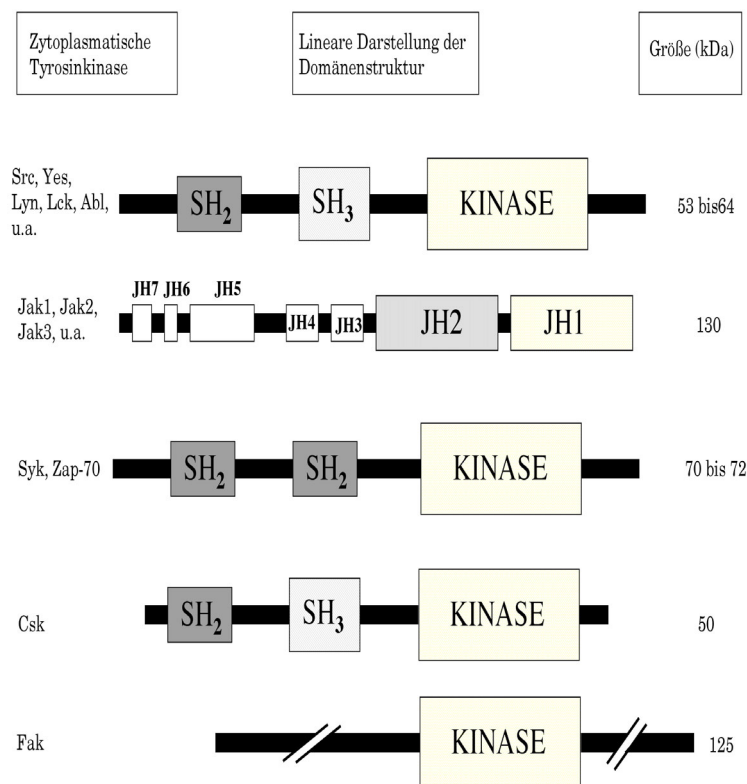


Abb. 5: Lineare Darstellung der Domänenstruktur zytoplasmatischer Tyrosinkinasen. Src: im Rous Sarcoma Virus entdeckte Tyrosinkinase, Abl: im Abelson-Leukämie-Virus der Maus entdeckte Tyrosinkinase, Jak: Janus-Kinase, Syk: spleen tyrosine kinase, Zap-70: ξ (Zeta)-chain-associated Protein 70, Csk: cytoplasmic-Src-tyrosine kinase; Fak: focal adhesion kinase (=Pyk: Proline-rich tyrosine kinase), SH₂ und SH₃: Src-Kinase-Homologie-Region, JH: Janus-Kinase-Homologie-Region, kDa: Kilo Dalton = Einheit der Molekülgröße.

Zu den Transmembranrezeptoren mit assoziierter Tyrosinkinase-Aktivität gehören z.B. die Zytokin-Rezeptoren. Es können drei Typen von Zytokin-Rezeptoren unterschieden werden. Sie weisen alle NH₂-terminale, extrazellulär lokalisierte Sequenzabschnitte auf. Man differenziert die Abschnitte in Cystein-reiche, Fibronectin-Typ III-, oder auch Immunglobulin-ähnliche Domänen. Die Polypeptidkette des Rezeptors besitzt anschließend eine oder mehrere Transmembranelemente und den intrazellulär lokalisierten COOH-Terminus. Die Untereinheiten können homo- oder heterooligomere Strukturen aufweisen ⁴⁴⁹⁻⁴⁵³.

Die meisten assoziierten Protein-Tyrosinkinasen gehören zur Familie der Src- und der Jak-Kinasen. Die Src-Tyrosinkinase, die eine Phosphorylierung des Ras-Proteins bedingt und somit in der Signalkette der MAPKs ein Glied darstellt, wurde wie auch das Ras-Protein im Rous **Sarcoma** Virus entdeckt. Sie trägt einen Myristinsäurerest an ihrem C-terminalen Ende, der als Membrananker fungiert. Sie besitzt sowohl SH2 als auch SH3 Domänen und wird durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung in komplexer Weise reguliert.

Die **Janus-Kinasen** (Jak-Kinasen 1-3 und Tyk2), sind vor allem an der Signalübertragung der Interferone, dem Erythropoetin und der Interleukine beteiligt. ⁴⁵⁴⁻⁴⁶⁶. Das Charakteristikum ihres Strukturaufbaues ist das Vorkommen von zwei Tyrosin-Kinase-Domänen, wobei nur eine der beiden komplett funktionierende Kinaseaktivität aufweist. Ein weiteres auffallendes Charakteristikum der durch sie vermittelten Signaltransduktion ist die Assoziation mehrerer Jak-Kinasen an einen aktivierten Rezeptor ^{449,467-470}. Durch die Bindung an den aktivierten Rezeptor erfahren die Jak-Kinasen durch den Mechanismus der gegenseitigen trans-Phosphorylierung eine Aktivierung. Die Jak-Kinasen katalysieren jedoch auch die Tyr-Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors, wobei alle entstandenen Phosphotyrosinreste als Bindungsstellen für Adaptorproteine oder Effektorproteine dienen ⁴⁷¹.

Die Signalübertragung der aktivierten Jak-Kinasen geht zumeist direkt über in die Ebene der Transkriptionsfaktoren, die an ihren Tyrosinresten phosphoryliert werden und somit für eine Transkriptionsstimulation aktiviert werden ⁴⁷². Die Transkriptionsfaktoren der Jak-Kinasen sind die Stat-Proteine (**s**ignal **t**ransducer and **a**ctivator of **t**ranscription). Es sind mindestens 6 verschiedene Stat-Proteine bekannt, sie sind zytoplasmatisch lokalisiert und werden durch Phosphorylierung ihrer Tyrosinreste aktiviert ⁴⁷³⁻⁴⁷⁶. Durch die Aktivierung erfolgt eine Zusammenlagerung der Stat-Proteine zu Homo- oder Heterodimerkomplexen ^{477,478}. Die Komplexe werden mittels Bindung des Phosphotyrosinrestes des einen Stat-Proteins und der SH2-Domäne des anderen Stat-Proteins gebildet. Die dimerisierten Komplexe werden in den Kern transportiert, binden an ihnen

zugeordnete DNA-Elemente (= Zytokin-regulierte "enhancers", interferone- γ site response element) und aktivieren die Transkription von benachbarten Genabschnitten. Die Signalübertragung auf Stat-Proteine ist durch eine Vielfalt und Variabilität auf allen drei Ebenen der Übertragung zu beobachten. Zuerst auf der Ebene des Rezeptors und der Jak-Kinasen. Folgend auf der Ebene der Stat-Proteine mit ihrer großen Vielfalt an zell- und gewebsspezifischen Expressionen und schließlich auf der DNA-Ebene. Die Zuordnung variabler DNA-Elemente an die Stat-Proteine sowie die unterschiedliche Zugänglichkeit der jeweiligen Promotorstellen stellt schließlich die größte Kombinationsvielfalt dar ⁴⁷⁹.

2.5.1. Liganden zytoplasmatischer Tyrosin-Proteinkinase

Durch die Bindung der Liganden wird die Assoziation der zytoplasmatisch lokalisierten Tyrosinkinase induziert und aktiviert. Liganden der zytoplasmatisch lokalisierten Tyrosinkinase, die eine Signalvermittlung unter anderem durch die MAPKs erfahren, sind vor allem die Zytokine. Zu ihnen gehören:

- Interleukine (IL 1-7; 9, 12, 15)
- Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)
- Interferone (INF α , β , γ)
- Erythropoetin
- CD40- und Fas-Proteine
- Granulozyten-Colony Stimulating Factor; G-CSF
- Granulozyten/Makrophagen-Colony Stimulating Factor; GM-CSF
- Leukemia Inhibitory Factor (LIF)
- Nerve Growth Factor; NGF
- Monocyte-Chemoattractant-Protein 1; MCP-1

Zytokine sind regulatorische Proteine. Sie steuern die Proliferation, Differenzierung und funktionelle Prägung der Zellen des Immun- und des blutbildenden Systems. Sie sind an Entzündungsprozessen sowie an neuronalen, hämatopoetischen und embryonalen Entwicklungen des Organismus beteiligt ^{450,452}. Zu den Zytokinen gehören Wachstumsfaktoren, koloniestimulierende Faktoren, Lymphokine, Monokine, Interleukine und Interferone. Sie werden in geringen Konzentrationen (2-5 pg/ml Blut) von Zellen produziert. Sie agieren als biologische Sensoren, indem sie den Sauerstoffgehalt von Geweben, die Immunreaktion des Körpers sowie die Anzahl der weißen und roten Blutkörperchen regulieren ⁴⁸⁰. Nach erfolgreicher

Zytokin-vermittelter Signaltransduktion kann die Zelle die Zytokine durch Proteasen zerstören lassen. Ein klassisches Merkmal der Zytokine ist, dass sie nicht wie andere Botenstoffe (wie z.B. Hormone) mit dem Blutstrom zum Wirkort transportiert werden, sondern i.d.R. direkt auf die dem Sekretionsort benachbarten Zellen wirken. Sie besitzen eine vielfältige Wirkungsbreite, wobei Funktionen einzelner Zytokine überlappen können^{481,482}. Vor allem der Signalweg Ras-Raf-MAPKs-JAK-STAT zeigt eine massive Beteiligung an maligner kanzerogener Entartung von Zellen. Eine Vielzahl von Onkoproteinen besitzt die Fähigkeit, direkt STAT zu aktivieren und die Onkogenese in Gang zu setzen⁴⁸³⁻⁴⁸⁸.

2.6. Protein-Tyrosinphosphatasen

Wie bei den Ser/Thr-Proteinkinasen, existieren auch für die Tyrosinkinase Gegenspieler, es sind die Protein-Tyrosinphosphatasen. Betrachtet man die Gesamtaktivität der beiden Enzyme im Verhältnis, so ist das Gleichgewicht zu Gunsten der Proteinphosphatasen verschoben, sie haben eine drei bis vier mal höhere Aktivität. Dies lässt den Schluss zu, dass die oftmals transiente Phosphorylierung eines Signalproteins nur geringe Bedeutung in der Signalvermittlung besitzt. Jedoch existieren auch hier im Zusammenspiel der Kinasen und Phosphatasen antagonistische sowie kooperative Wirkungsprinzipien. Antagonismus bedeutet die Dephosphorylierung einer zuvor aktiven Rezeptor-Tyrosinkinase oder eines Effektorproteins³⁵⁰. Positive Kooperation wäre die Dephosphorylierung eines durch Tyr-Phosphorylierung inaktivierten Enzyms. Beispiel ist hier die zytoplasmatische Src-Tyrosinkinase, die durch Phosphorylierung ihrer AS Tyr527 in ihrer Kinaseaktivität inhibiert wird und durch den synergistischen Angriff an der phosphorylierten AS reaktiviert wird⁴⁸⁹. Die Klassifizierung der Tyrosin-Phosphatasen erfolgt nach *Fischer et al.* zum einen in die der rezeptorähnlichen Protein-Tyrosinphosphatasen und zum anderen in die zytoplasmatischen Protein-Tyrosinphosphatasen⁴⁹⁰.

Der Hydrolyse-Mechanismus der Tyrosinphosphatasen an Phosphotyrosinresten erfolgt durch Angriff der Phosphatase am katalytischen Zentrum des Substratproteins (= nucleophiles Cystein-Thiolat stabilisiert durch positiv geladene Argininreste). Der Tyr-Rest wird durch das Thiolat verdrängt und an die Phosphatase bindet sich über das Cystein das zweifach negativ geladene Phosphatmolekül. Die Dissoziation des Tyrosins aus dem Tyr-Phosphat wird durch Abgabe eines Protons aus einem katalytisch essentiellen Asparatrest der Phosphatase an das Tyrosin-Phenolat erleichtert. Durch den nachfolgenden nucleophilen Angriff eines Wassermoleküls an das intermediär gebildete Cystein-Phosphat wird schließlich Phosphat freigesetzt^{491,492}.

2.7. Signalübertragung durch Ras-Proteine

Die Ras-Proteine (p²¹Ras-Proteine; 21 kDa) sind Schaltstationen in der Verarbeitung von Signalen, die von Rezeptor-Tyrosinkinasen, von Rezeptoren mit assoziierter Tyrosinkinase oder von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren empfangen werden^{308,493}. Sie sind eigentlich eine Superfamilie der kleinen monomeren regulatorischen GTPasen, die in einer inaktiven GDP-Form und in einer aktiven GTP-gebundenen Form vorliegen können (Abb. 6). Von entscheidender Bedeutung für die signalübertragende Funktion des Ras-Proteins ist die Zeitspanne, die das Ras-Protein im aktiven Zustand vorliegt, denn nur in diesem Zustand kann das Signal an das nachgeschaltete Effektormolekül, die Raf-Kinase, weitergegeben werden⁴⁹⁴. Die GTP-bindende Domäne befindet sich im N-Terminus des Proteins, dem anschließend folgt die "effector loop", eine Aminosäurendomäne, die für die Bindung der nachfolgenden Effektor kinase verantwortlich ist. Kristallographische Untersuchungen haben gezeigt, dass durch den Austausch von GDP durch GTP eine Konformationsänderung des Proteins stattfindet, d.h. die sogenannten "switch-I und -II Domänen", die vor dem Austausch die Effektor-Domäne blockierten, machen diese nun frei für eine Bindung zum Substrat⁴⁹⁵.

Der C-Terminus des Ras-Proteins besteht aus der CAAX-Domäne (C = Cystein, A = Alanin, X = beliebige Aminosäure). Diese Domäne ist nach posttranslationaler Modifikation für die Verankerung des Proteins an der Plasmamembran verantwortlich. Nur in der verankerten Form mit der Zellmembran ist das Ras-Protein in der Lage, als Signalüberträger zu fungieren^{496,497}. Die Verankerung erfolgt mit Hilfe von Lipidankern, die durch Farnesyl- oder auch Palmitoylreste am C-terminalen-Ende des Proteins mit der Membran gebildet werden. Die Verankerung macht es möglich, dass das Protein in die Nachbarschaft seines nachfolgenden Effektormoleküls, den Raf-Kinasen, gebracht werden kann⁴⁹⁸.

Das Ras-Gen und das von ihm kodierte Protein wurden zuerst bei Retroviren gefunden. Diese Viren sind in der Lage, in Ratten Tumoren des Sarkomtyps auszulösen, sodass die Nomenklatur des Proteins von **rat sarcoma** stammt. Die eigentlichen vier Ras-Proteine des Säugetiers sind die **H**(arvey)-, **Ki**(rsten)-, **N**(euroblastoma)- und **R**(etroviren)-Ras-Proteine. Ras-Proteine besitzen eine große Bedeutung in der Wachstumsregulation physiologischer wie auch pathologischer Vorgänge. Bis zu 30% aller soliden Tumoren des Menschen weisen Punktmutation des Ras-Gens auf, die vor allem an den Aminosäuren 12, 13 und 61 vorliegen^{22,499}. Der Vergleich des mutierten Ras-Proteins mit seinem Wildtyp zeigt, dass vor allem eine Verlängerung des GTP-gebundenen Zustandes bzw. die erniedrigte

Geschwindigkeit einer GAP-sensitiven GTP-Hydrolyse mit der onkogenen Aktivierung korreliert⁵⁰⁰.

Ras ist ein Zielprotein für den Angriff vieler Oxidantien, wie z.B. H_2O_2 und NO. *Lander et al.* zeigten dies an einer Ratten-Phaeochromozytom Zelllinie durch NO-Begasung⁵⁰¹⁻⁵⁰³. *Aikawa et al.* bestätigten dies an neonatalen Rattenkardiomyozyten durch H_2O_2 ⁵⁰⁴. Beide beobachteten hierbei eine folgende ERKs Phosphorylierung durch die zuvor erzeugte Ras-Aktivierung^{465,466,505}.

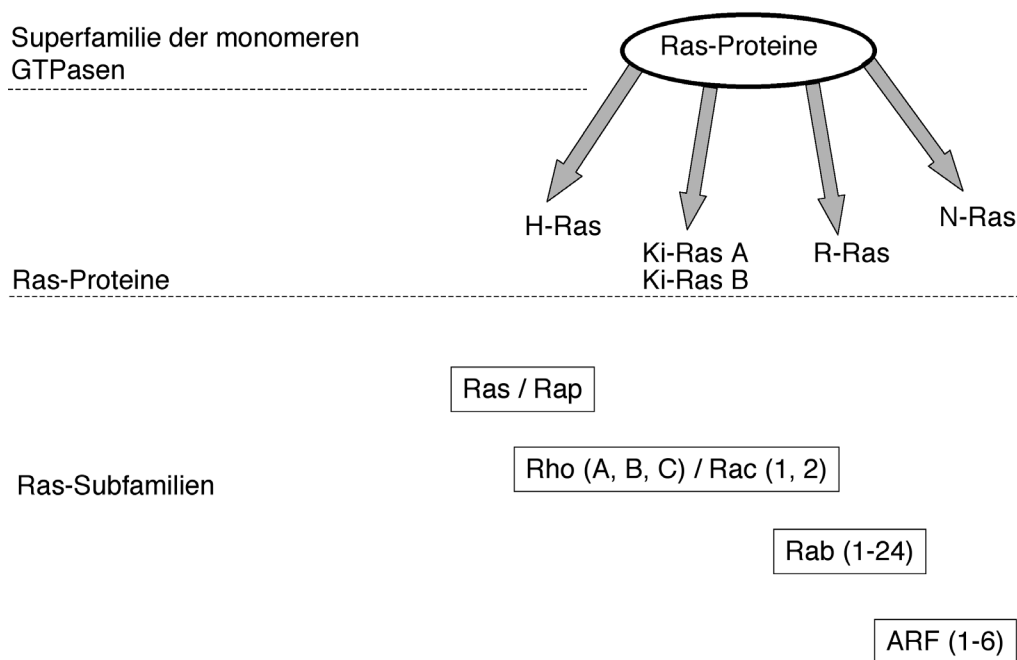


Abb 6: Schematische Übersicht der regulatorischen GTPasen der Ras-Superfamilie der Säugetiere. Ras: rat sarcoma; **H**(arvey)-, **Ki**(rsten)-, **N**(euroblastoma)- und **R**(etroviren)-Ras-Proteine; Rho/Rac: Rab: small GTP-binding proteins; ARF: ADP-ribosylation factor.

2.7.1. GTPase-aktivierende Proteine (GAP)

Sie besitzen die Aufgabe einer negativen Regulation der Ras-Proteine bzw. der Ras-verwandten Ras-Subfamilien-Proteine. Sie beschleunigen (10^5 -fach) die intrinsische GTPase-Aktivität der Ras-Proteine. Durch ihren Eingriff in die katalytische GTP-Hydrolyse, wird der aktive GTP-Zustand des Ras-Proteins in den inaktiven GDP-Zustand überführt. Somit kann durch den Eingriff der GAP die Intensität der Ras-Protein-Signalübertragung reduziert werden. Beispiele der Säugetier GAPs sind das p120-GAP, was bereits als SH2, SH3 und PH-Domänen tragendes Effektormolekül der Rezeptor-Tyrosinkinase beschrieben wurde. Weitere GAP sind das Neurofibromin (NF1) und GAP1^m^{506,507}.

2.7.2. Guaninnucleotid-Austauschfaktoren (GEF)

Die Guaninnucleotid-Austauschfaktoren sind die Gegenspieler der GAPs. Sie sind positive Regulatoren der Ras-Proteine und überführen das Ras-Protein durch beschleunigte Dissoziation des GDPs vom inaktiven GDP-Zustand in den aktiven GTP-Zustand. Dieser durch GEFs katalysierte Vorgang konnte wiederum bei den Ras-Subfamilien Rab, Rho und Rac durch ein inhibierendes Protein (GDI, guaninnucleotide-dissociation-inhibitor) verhindert werden ^{300,301}.

Die Bedeutung der GEFs wurde zuerst in der Hefe der Spezies *Saccharomyces cerevisiae* untersucht. Ein Austauschfaktor, der unmittelbar dem Ras-Protein vorgeschaltet ist, ist hier das CDC25 Protein ^{23,508}. Versuche durch Einbau eines rekombinanten CDC25-Proteins in die Hefe, zeigte eine Beschleunigung des Nukleotidaustausches um den Faktor 1000. Genetische Untersuchungen am Fadenwurm und der Fruchtfliege zeigten, dass nicht allein die Austauschfaktoren, sondern nur der Komplex aus Austauschfaktor und Adaptorprotein die Verbindung zwischen aktivierter Rezeptor-Tyrosinkinase und dem Ras-Protein herstellen kann. Adaptorprotein ist das Grb-2-Protein, Austauschfaktor ist z.B. das SOS-Protein (**son of Sevenless**, sevenless-Gen in der Fruchtfliege; m-SOS = **m**ammalian-SOS) und je nach Subfamilie auch Dbl-, MSS4- und RCC1-Protein ^{509,510}.

Der Komplex aus Grb-2 und mSOS entsteht durch die Bindung der SH3-Domäne des Grb-2 und einer prolinreichen Aminosäuresequenz des mSOS. Der Grb-2-mSOS-Komplex kann auf zwei verschiedene Wege in die Ras-Signalübertragung involviert sein. Zum einen wird der Grb-2-mSOS-Komplex unmittelbar zwischen den Rezeptor und das Ras-Protein geschaltet, wobei die SH2-Domäne des Grb-2 an Phosphotyrosinreste des aktivierten Rezeptors bindet. Das zuvor zytoplasmatisch lokalisierte mSOS-Protein kann nun durch die Einbindung in den Komplex und durch Membranlokalisierung eine Wechselwirkung mit dem ebenfalls membranassoziierten Ras-Protein eingehen und induziert in ihm einen Nukleotidaustausch ^{439,440}.

Ein anderer Weg der Verbindung von Komplex und Ras-Protein ist die Nutzung eines weiteren Adaptorproteins, wie das Shc-Protein. Das Shc-Protein besitzt eine PTB-Domäne, über die es an die autophosphorylierte Rezeptor-Tyrosinasen binden kann. Das Shc-Protein wird dabei selbst phosphoryliert und erhält einen Phosphotyrosinrest, der eine Anheftungsstelle für die SH2-Domäne des Grb-2-Proteins darstellen kann. Es entsteht eine Zusammenlagerung in Assoziation an die Zellmembran aus den in Abb. 7 dargestellten Einzelbestandteilen.

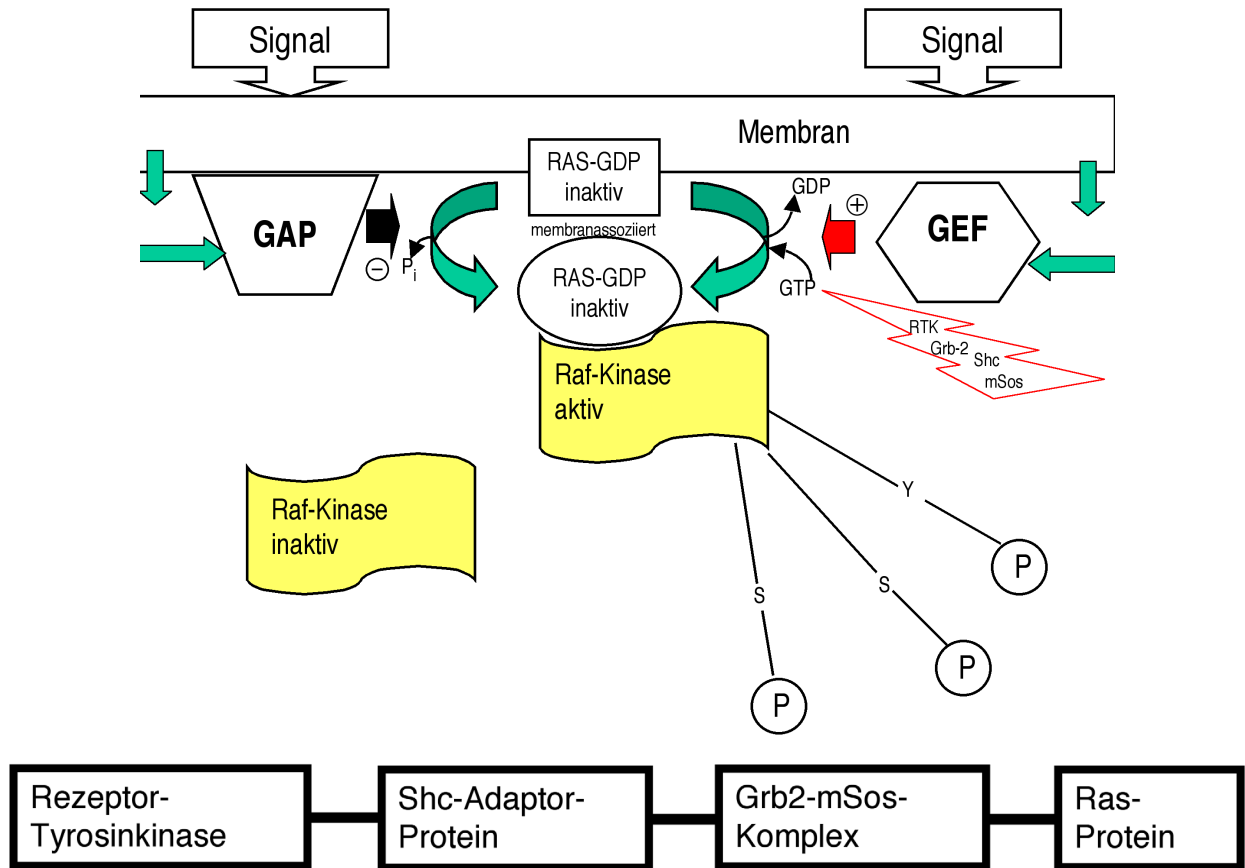


Abb. 7: Lineare Modelldarstellung des Aktivierungsablaufes des Ras-Proteins. Die Abbildung veranschaulicht in stark vereinfachter Weise die Beteiligung des Guanin-nukleotid-Austauschfaktors Grb-mSos, des Shc-Adaptorproteins, der Guanin-nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) und der GTPase-aktivierenden Proteine (GAPs) an der Signalübertragung durch das Ras-Protein.

2.8. Raf-Kinasen

Daum *et al.* charakterisierten die Raf-Kinase durch Untersuchungen des viralen Onkogens v-raf. Das Gen kodiert für eine Ser/Thr-spezifische Proteinkinase und unterscheidet sich von dem zellulären Gegenstück, dem c-raf-Gen durch Deletion eines längeren N-terminalen Abschnittes. Dieser deletierte Abschnitt kodiert für eine autoregulatorische Domäne (200-300 AS) der Ser/Thr-Proteinkinase, sodass durch den Verlust im Protoonkogen-Ser/Thr-Proteinkinase-Produkt transformierende Eigenschaften der Kinase auftraten⁵¹¹.

Avruch *et al.* zeigten, dass die Raf-Kinase eine Effektorfunktion im Ras-Weg hat und durch ihre unmittelbare Folge an das Ras-Protein eine Anbindung des Ras-Signalübertragungsweges an den der MAPKs schafft. Die Interaktion zwischen den beiden Molekülen, d.h. zwischen dem Ras-Protein und der Raf-Kinase kann nur von der aktivierten GTP-gebundenen Form des Ras-Proteins durchgeführt werden^{512,513}.

Säugetiere besitzen mindestens drei verschiedene Raf-Kinasen, es sind die A-Raf-, B-Raf- und c-Raf-1-Kinase. c-Raf-1 kommt ubiquitär vor, wogegen A-Raf eine restriktive Gewebsexpression in Steroid-abhängigen Geweben (z.B. Urogenital-Gewebe) ⁵¹⁴ aufweist und B-Raf vor allem in neuronalem Gewebe vorkommt ⁵¹⁵. Sie besitzen alle konservierte Proteindomänen CR1-CR3, wobei die ersten beiden am N-terminalen Ende liegen (CR1: Aminosäure 51-194; CR2: AS 254-269) und die CR3-Domäne (AS: 355-687) am C-terminalen eingefügt ist. Die Domäne CR1 beinhaltet zum einen die Ras-Bindungsdomäne (RBD = Ras-binding domain, Aminosäure 51-131) und zum anderen einen Cystein-reichen Abschnitt = Zink-Bindungsmotiv (Aminosäuren 139-184) ^{513,516}. CR2 hat die Funktion des regulativ aktivierenden Strukturabschnittes der Raf-Kinase. Die CR3-Domäne stellt die katalytische Domäne dar und bindet ATP und das Substrat. Das Ras-Protein bedingt eine Translokation der Raf-Kinase zur Zellmembran und dadurch eine konstitutive Aktivierung der Kinase. Eine Farnesylierung des C-terminalen Endes oder die Myristylierung des N-terminalen Endes bedingt eine membranassoziierte Lokalisation der Raf-Kinase. Es sind jedoch weitere Cofaktoren notwendig, um eine vollständige Aktivierung der Kinase zu erreichen. Hierzu zählen die Phosphorylierung von Ser43, Ser338, Ser259, Tyr340, Tyr341, die Autophosphorylierung der Raf-Kinase an Thr268, Phosphorylierungen der Raf-Kinase an Ser499 durch Proteinkinase C ⁵¹⁷⁻⁵²⁰ und an den beiden Tyr340/341-Resten durch Src-Kinasen sind ebenfalls beobachtet worden. Nach der Aktivierung der Raf-Kinase kommt es zur Oligomerisierung der Kinase und einer Komplexbildung von Ras-Raf und den beiden Hitze-Schock-Proteinen Cdc37 und Hsp90 im Verhältnis 1:1:1:1. ^{516,521-526}

Eine Inhibierung der Raf-1 Kinase konnte durch Phosphorylierung der Ser43 oder Ser621 durch eine cAMP-abhängige Proteinkinase gezeigt werden. Dies stellt einen weiteren Beweis dafür dar, dass cAMP einen antagonistischen Effekt auf den durch G-Protein-gekoppelten Rezeptor-Ras-Raf-MKK-ERK-Signalweg des Zellwachstums ausübt ⁵²⁷⁻⁵³⁰. Eine weitere indirekte Inhibierung von Raf konnten *Kornfeld et al.* in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* durch die KSR-Proteinkinase (**k**inase **s**uppressor of **R**AS) erzeugen ^{531,532}. Eine verzögerte Aktivierung der Raf-1 Kinase zeigten *Cross et al.* und *Huang et al.* durch Inhibierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase. Sie vermuteten, dass die Lipide und Lipidmetaboliten, welche von der Phosphatidylinositol-3-Kinase katalytische erzeugt werden, in der Regulation der Raf-1 Kinase eine inhibierende Rolle spielen ⁵³³⁻⁵³⁵.

Eine direkte Stimulation von Raf-1, ohne Aktivierung des vorgeschalteten Ras-Proteins erzeugten Wang *et al.* durch BAG 1, einem proapoptotischen Protein des Bcl-2-Signalweges. Somit konnte gezeigt werden, dass Bcl-2 sowie das proapoptotische Homolog von Bcl-2, BAD, Substrate von Raf-1 sind und Raf-1 in den Vorgang der Apoptose involviert ist ⁵³⁶⁻⁵⁴⁰.

Eine direkte Vermittlung des Signals vom Ras-Protein an die MAPK-Kaskade ohne Einbeziehung der Raf-Kinase geschieht durch die Mitogen-aktivierte-Proteinkinase-Kinase-Kinase (MKKK), eine Kinase, die zwei Stufen vor die extrazellulär-regulierten-Proteinkinasen (ERK) geschaltet ist ^{440,498,499}. Van Bieson *et al.* und Hawes *et al.* zeigten eine PKC-unabhängige Aktivierung durch die G $\beta\gamma$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins über den Ras-Raf-MEK und ERK-Weg und gegensätzlich dazu einen PKC-abhängigen Weg über die G α -Untereinheit, der die G $\beta\gamma$ -Untereinheit und das Ras-Protein nicht benötigte ^{541,542}.

2.9. Mos-Kinase

Die Mos-Kinase, eine Ser/Thr Protein-Kinase, ist vor allem am Progesteron-regulierten Vorgang der meiotischen Oozytenteilung (Maturation) von Wirbeltieren beteiligt ^{528,543-545}. Die meiotische Zellteilung kann durch Injektion der mRNA von Mos oder durch Applikation des reinen Proteins beschleunigt werden, wobei diese fördernde Funktion von Mos die parallele Aktivität von MKK, ERK und eines spezifischen Faktors MPF (**m**aturation-**p**romoting-**f**actor) bedarf. Diese Kinasen und Faktoren weisen wiederum eine maximale Aktivität in der Metaphase I und II auf ⁵⁴⁶⁻⁵⁴⁸. Ihre spezifisch hohe Expression in Geschlechtszellen wird durch DNA-Bindungselemente des somatischen Repressors innerhalb des Mos-Promotors reguliert. Xu *et al.*, Leibovitch *et al.* und Gao *et al.* stellten außerdem eine Expression in somatischen Zellen fest, die jedoch um vieles geringer war als in den Geschlechtszellen ⁵⁴⁹⁻⁵⁵¹. Muslin *et al.* und Fabian *et al.* untersuchten den Vorgang der Mos-abhängigen germinalen Meiose unter Verwendung dominant negativer Raf-Mutanten, um festzustellen, ob Raf auch in der Mos-Signalvermittlung beteiligt ist. Sie zeigten, dass Raf und Mos ein konvergierendes Ineinandergreifen der MKK-Aktivierung bewirken und beide Kinasen benötigt werden, um Signale an MKK weiterzuleiten ^{528,552}. *In vitro* phosphoryliert Mos die Phosphorylierungsstellen Ser218 und Ser222 der Proteinkinase MKK1.

Mos wird selbst an Ser3 durch ERKs phosphoryliert und daher durch eine positive Rückkopplung ihrer nachgeschalteten Kinase reguliert ⁵⁵³.

3. Signaltransduktion der MAPKs-Kaskaden

Die MAPKs stellen eine Superfamilie von Prolin-abhängigen Serin/Threonin-Proteinkinasen dar, die sich in der Signaltransduktion eukaryotischer Zellen von der Plasmamembran zu ihren kern- und zellplasmatischen Zielen einer kaskadenartigen Proteinkinasenphosphorylierung bedienen. Prolin-abhängig (verwiesen) bedeutet, dass die MAPKs nur in einem Sequenzabschnitt die Aminosäuren Serin und Threonin ihres Substrates phosphorylieren, sofern sich dieser in unmittelbarer Nähe eines prolinreichen Sequenzabschnittes des Proteins befindet. Die MAPKs-Familie besteht aus mindestens drei Proteinkinasesubfamilien: die ERKs (extrazellulär-Signal-regulierte Proteinkinasen), SAPKs/JNKs (Stress-aktivierte Proteinkinasen / c-Jun-NH₂-terminale Proteinkinasen) und p38-MAPKs⁵⁵⁴⁻⁵⁵⁶. Diese drei Kaskaden stellen parallele Bahnen dar, die unterschiedliche Substratspezifitäten besitzen und durch eindeutige, spezifische Auslöseimpulse geregelt werden. Eine Vernetzung der drei Kaskaden kann jedoch an den unterschiedlichsten Stellen festgestellt werden, sodass ein Zusammenspiel der Proteinkinasen in der Weiterleitung von Signalen niemals ausgeschlossen werden kann. Die MAPKs können durch extrazellulär angreifende Konditionierungen verschiedenster Rezeptoren oder Ionenkanäle in ihrer Signalkette in Gang gesetzt werden, wobei die Zelle letztendlich mit einer definierten biochemischen Antwort reagiert^{557,558}. Die Natur der extrazellulären Signale kann hierbei sehr vielfältig sein und umfasst extrazelluläre Signalmoleküle, wie niedermolekulare Botenstoffe oder Proteine sowie sensorische Signale. Im einzelnen können dies ionisierende oder ultraviolette Strahlungen, hyperosmotischer Druck, Hitze oder Kälte, Ischämie/Reperfusion, Wachstumsfaktoren, Hormone (vasoaktive Peptide = Angiotensin II, Endothelin-1), Zytokine, Entzündungsfaktoren und viele andere Impulse sein. Pharmakologische Substanzen können ebenfalls Botenstoffe der inter- und intrazellulären Kommunikation sein und hierbei körpereigene Signale erzeugen oder ersetzen⁵⁵⁹⁻⁵⁶².

Die Entdeckung des MAP-Kinasen-Signalweges zeigte ein flexibles und leistungsfähiges Prinzip der amplifizierten, differenzierten und regulativen Signalübertragung durch sequentiell hintereinander geschaltete Proteinkinasen auf. Vom Ras-Protein, noch vorwiegend membranassoziiert, wird das Signal durch die Proteinkinasen ins Zellinnere weitergeleitet. Erste Studien der MAPKs-Signaltransduktion wurden an Pheromon-gesteuerten Paarungsvorgängen der Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* untersucht. *Errede* und *Levin et al.*, wie auch viele andere Wissenschaftler⁵⁶³⁻⁵⁷¹ zeigten, dass die enzymatische Aktivität der MAPKs mit der von bereits bekannten Wachstumsfaktoren-stimulierten ribosomalen S6-Kinasen zu vergleichen ist⁵⁶⁰. Es

konnten fünf separat regulierte MAP-Kinasen-Wege in der Hefespezies *Saccharomyces cerevisiae* und drei bei *Schizosaccharomyces pombo* unterschieden werden. In Säugetierzellen konnten ubiquitär in sämtlichen Organen und Zellsystemen, in mikromolarer Konzentration, drei Proteinkinase-Kaskaden mit MAPKs-Aktivität aufgezeigt werden⁵⁷². Funktionale MAPKs-Module, eine Beschreibung, die als Funktionseinheit von hintereinander geschalteten Proteinkinasen gebraucht wird, wurde ebenfalls in Fröschen, Fruchtfliegen, Nematoden, Schnecken, Schimmelpilzen und Pflanzen entdeckt⁵⁷³. Durch das Unterbleiben einer Vernetzung der fünf bzw. drei Signalkaskaden der Hefenspezies konnten exakte Wege beschrieben werden, die von extrazellulären Stimuli in einer definitiven genetischen Antwort endeten⁵⁷⁴⁻⁵⁷⁶.

Die MAPKs-Signalwege der Säugetiere zeigten im Vergleich dazu eine Vielzahl von Interaktionen zwischen den verschiedenen Ebenen der drei MAPKs-Signalkaskaden.

Prinzipiell untergliedert man die Kaskade ausgehend von der Signalweiterleitung der Ras-Protein-Signalvermittlung, der Proteinkinase A und Proteinkinase C, in weitere drei Ebenen. Die erste der drei ist die Ebene der MAPKKK (MKKK), die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen Kinasen Kinasen, die die Raf-Kinase Familie, die c-Mos-Kinasen und die multilinearen Proteinkinasen (MLKs) miteinschließen.^{535,572} Danach folgt die Ebene der MAPKK (MKK), der MAP-Kinasen-Kinasen, mit einer Anzahl von MKK-1-7. Sie benötigen ebenfalls eine duale Phosphorylierung durch die MKKK an ihren Ser/Thr- und Tyr-Resten. Danach folgt die Ebene der MAPKs, wo man drei MAPK-Subfamilien unterscheidet. Es sind die ERKs, die JNKs/SAPKs und die p38-MAPKs. Die MAPKs werden durch die MKK an ihrem "activation lip" durch die zweifache Phosphorylierung ihrer Konsensussequenz Thr(P)-X-Tyr(P) aktiviert^{577-580 577-580} (Abb. 8).

Eine Vermittlung von IP konnte bei verschiedenen membranständigen Strukturen nachgewiesen werden und das zunehmende Verständnis der Präkonditionierung erlaubte extrazelluläre Signale, deren Rezeptoren, Second messenger und Effektoren genauer zu spezifizieren. Alle Strukturen vermögen in der frühen Phase des *Preconditioning* über die relativ schnelle Aktivierung intrazellulärer Kinasen zu wirken^{373,374,554,581-585}. Die folgenden Phosphorylierungsschritte der MAPK-Signalezyme sind daher Vermittlungswege des IP und im folgenden näher dargestellt.

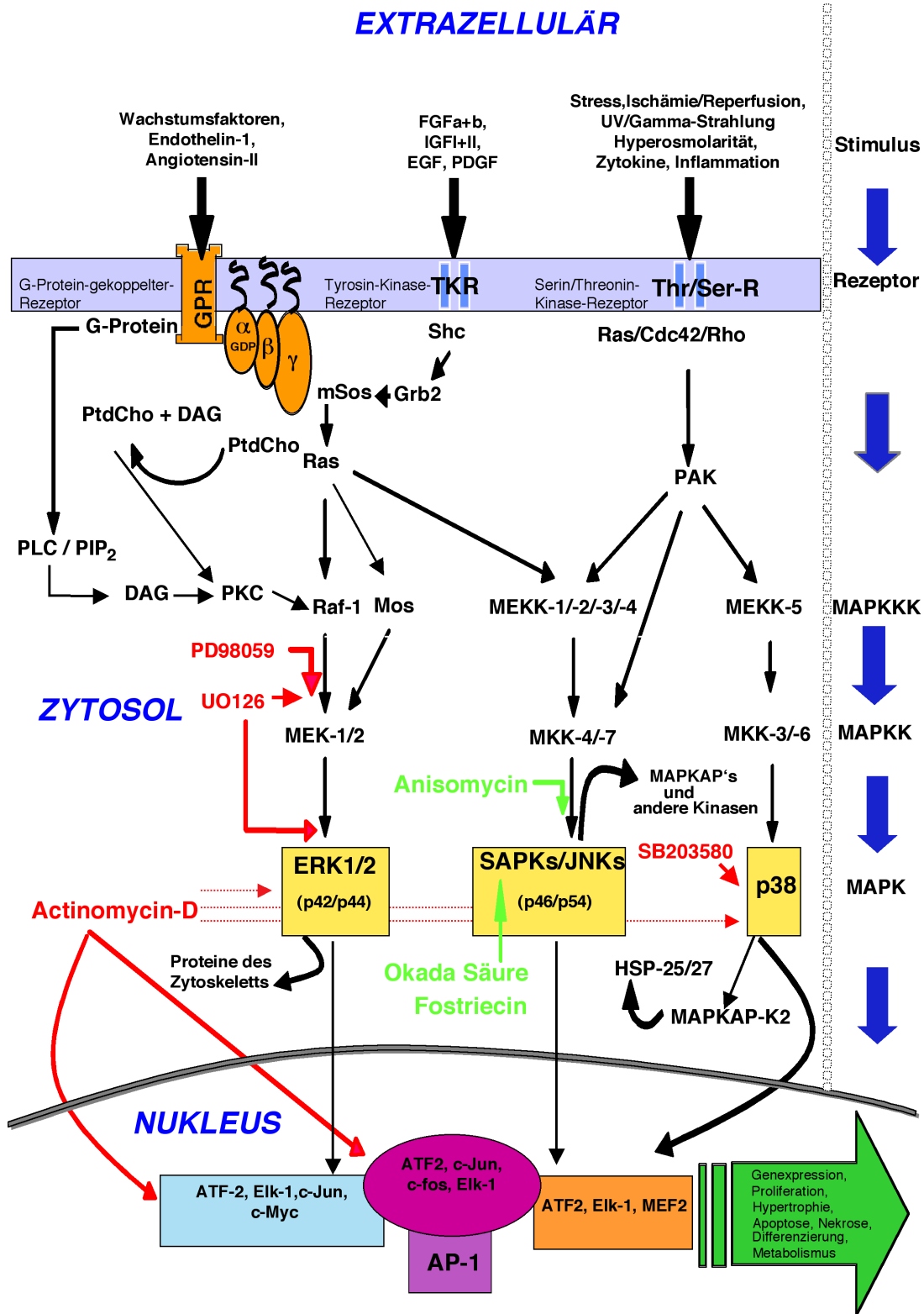


Abb. 8: Darstellung der kaskadenartigen Aktivierungswege der MAPKs (ERK-1/2, SAPKs/JNKs und p38) von extrazellulär über das Zytoplasma in den Kern.

3.1. Der ERK-1/2 Signalweg

Die ERK-1/2 und ihre vorgeschalteten regulativen Protein-Kinasen, MKK-1/2 (MEK-1/2) werden vor allem durch Wachstums- und Differenzierungsfaktoren stimuliert. Diese Signalmoleküle verschaffen sich, wie bereits erläutert, den Eintritt in die Zelle über die Vermittlung von heterotrimeren G-Protein gekoppelten Rezeptoren, Rezeptor Tyrosin Kinasen und Zytokinrezeptoren⁵⁶³. *Boulton* und *Cobb et al.* beschrieben unterschiedlich starke Expressionen der Kinasen in verschiedenen Geweben. So konnten sie eine stärkere Expression im Gehirn gegenüber Lunge, Darm und Herz feststellen^{586,587}. Immer noch ungeklärt ist das Vorkommen zweier Kinasen auf der Ebene der MAPKs wie auch der MAPKKs (MKKs). Die ERK-1/2 besitzen untereinander 90%ige Sequenzhomologie und es konnten noch keine Signale gefunden werden, die spezifisch nur eines der beiden Enzyme aktiviert^{588,589}. Des weiteren kann MKK-1 sowohl ERK-1 wie auch ERK-2 phosphorylieren und gleiches konnte für MKK-2 festgestellt werden, d.h. der unidirektionelle Weg ist hier nicht zu beobachten.

3.1.1. Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen-Kinasen-1/2 (MEK-1/2)

Beide MKK-1/2-Enzyme besitzen ein Molekulargewicht von 44-kDa und weisen eine 80%ige Sequenzhomologie auf^{588,590}. Sie stellen eine besondere Klasse von Proteinkinasen dar, da sie eine zweifache Spezifität bezüglich der Natur der Akzeptor-aminosäure in der Phosphorylierungsstelle des Proteinsubstrats besitzen. Die MKKs aktivieren die nachgeschalteten MAPKs über Phosphorylierung an einem Tyr- sowie einem Thr-Rest in der obengenannten Sequenz Thr-X-Tyr. Die MKKs werden daher auch "dual specificity Proteinkinasen" genannt und unterscheiden sich deutlich von den bisher genannten Proteinkinasen, die entweder Tyr- oder Ser/Thr-spezifisch waren. Ihre eigene Aktivierung erfolgt durch Phosphorylierung der Konsensussequenz Ser218(P)-Met-Ala-Asn-Ser222(P) an beiden Serin Aminosäuren⁵⁹¹⁻⁵⁹⁴. Der N-Terminus der Kinasen weist die Bindungsstelle für ATP auf und besitzt die Funktion des Stabilitätsaufbaus des Enzyms (Abb. 9). Eine Aminosäuresequenz von ca. 40 Aminosäuren (AS: 261-307), die sich zwischen den Subdomänen neun und zehn des Proteins befindet, ist sehr reich an Prolin, sodass hierdurch eine potentielle Interaktion zu SH3-Domänen aufgebaut werden kann und somit Kontakt zu den Raf-Kinasen erfolgt⁵⁹⁵⁻⁵⁹⁹. *Catling et al.* zeigten 1996 durch *in vivo* Deletion dieser Sequenz in den Mutanten ein Fehlen des Kontaktes zum Substrat, d.h. das Ausbleiben der Phosphorylierung der ERKs, wobei *in vitro* eine Phosphorylierung stattfand⁶⁰⁰. Autophosphorylierungsstellen besitzt MKK-1 an den Aminosäuren Ser298 und Thr292, MKK-2 an den Aminosäuren Thr286 und Thr292. Diese Autophosphorylierung vermittelt eine MKK/Raf-1 Interaktion, eine rückkoppelnde Regulation der ERKs auf die MKKs oder auch eine Kreuzregulation der MKKs mit dem PKA-abhängigen Signalweg⁶⁰¹⁻⁶⁰⁷.

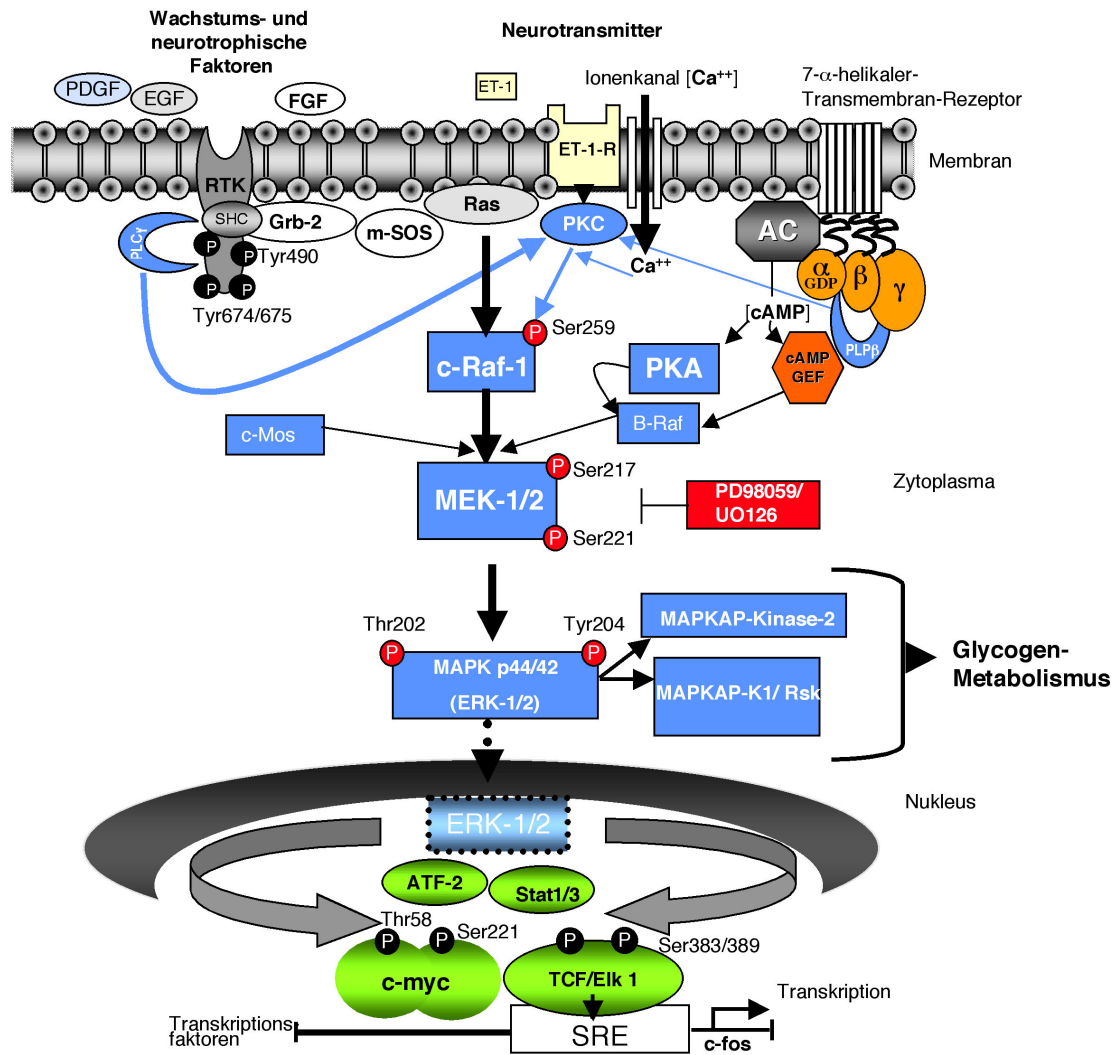


Abb. 9: Übersicht über die ERKs-Signalwege (extrazellulär-Signal-regulierte Proteinkinasen), die im Zusammenhang mit der Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK), Zytokin-Rezeptoren (z.B. ET-1-R: Endothelin-1 Rezeptor) und einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor stehen. PDGF: Platelet-derived growth factor; EGF: Epidermal growth factor; FGF: Fibroblast growth factor; TNF α : Tumor-Nekrose-Faktor α ; IL-1: Interleukin-1; α , β , γ Untereinheiten des G-Protein Rezeptors; P: Phosphorylierungsstelle; AC: Adenylatzyclase; PLP: Phospho-Lipase; m-SOS son of Sevenless, sevenless-Gen in der Fruchtfliege, = mammalian-SOS, Grb-2-Protein: Growth factor receptor binding protein; SHC: Src-Homolog; Ras-GEF: rat sarcoma-guanine nucleotide exchange factor; c-Mos: cellular moloney murine sarcoma viral oncogene homolog; Rac1: Ras-related C3 botulinum toxin substrate (small GTP-binding protein); Raf-1: murine leukemia viral oncogene homolog; PKC: Proteinkinase C; PKA: Proteinkinase A; MAPKAP-K1/Rsk: MAPK-aktivierte Proteinkinase/ribosomale S6 Kinase; MAPKAP-K2: Mitogen-aktivierte Proteinkinase aktivierte Proteinkinase-2; MEK-1/2: Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase 1/2, PD98059 und UO126: spezifische Inhibitoren des ERKs Signalweges; ATF-2: activating transcription factor-2; AP-1: Adaptor-related protein complex; SRE: serum response element; CREB: c-AMP response element-binding protein; c-myc: cellular myelocytomatosis viral oncogene homolog; Stat1/3: signal transducer and activator of transcription; Ser: Serin; Thr: Threonin; Tyr: Tyrosin.

3.1.2. Die extrazellulär-Signal-regulierten Proteinkinasen 1/2 (ERK-1/2)

ERK-1/2 sind Enzyme mit einem Molekulargewicht von 44- bzw. 42 kDa. Beide werden in ihrem "activation lip" an den Aminosäuren Thr183-Glu-Tyr185 phosphoryliert und somit aktiviert. Die Phosphorylierung beider Aminosäuren ist notwendig, um vollständige Aktivität zu erreichen. *Robinson et al.* bewiesen durch Punktmutation, d.h. Substitution der Aminosäure Tyrosin oder Threonin variabel durch eine andere Aminosäure, dass nur eine 10%ige Restaktivität des Enzyms gegenüber dem Wildtyp Enzym zurückblieb. Außerdem konnten sie zeigen, dass Tyrosin zuerst phosphoryliert wird. Die Enzyme werden in zehn Subdomänen unterteilt, wobei beide Enzyme die letzten vier Domänen im C-Terminus einschliessen (AS 247-266)^{291,608-614}. Ebenso zeigen beide den gleichen Aminosäuresequenzeinschub von 25 Aminosäuren zwischen Domäne neun und zehn. Der erwähnte "activation lip" liegt zwischen Subdomäne sieben und acht α - und β -helikale Faltblattstrukturen eingeschoben zwischen den Helices der Subdomänen unterscheiden die ERK-1/2 von der Struktur anderer Proteinkinasen.

3.1.2.1. Die extrazellulär-Signal-regulierten Proteinkinase-5 (ERK-5)

Im Jahr 1995 konnten *Zhou et al.* und *Lee et al.* unabhängig voneinander eine dritte extrazellulär-Signal-regulierte Kinase isolieren. In *Saccharomyces cerevisiae* ist es die SMK1 und in *Saccharomyces pombo* entspricht es der Pmk1, beides Kinasen, die den Vorgang der Zellwandbiosynthese mitregulieren. Das Säugetierhomolog ist die ERK 5 oder auch BMK 1 (**big MAP kinase**) genannt, die mit einem Gewicht von 90 kDa die größte MAPK darstellt. Der Amino-terminalen-NH₂-Domäne der ERK-5 folgt eine Abfolge von prolinreichen Aminosäuresequenzen, die somit Bindungsmöglichkeiten zu SH3-Domänen bieten. Auch konnte eine MKK-5 identifiziert werden, die Sequenzhomologie von 45% zur MKK-1 aufweist. Beide Kinasen, ERK 5 und MKK-5 weisen außerhalb ihrer Kernkonsensussequenz Aminosäuresequenzen auf, die für zytoskeletale Bindungen verantwortlich sind. Auch befindet sich MKK-5 bei der Zellfraktionsisolierung in der partikulären Fraktion. Bisher sind jedoch noch keine Zusammenhänge gefunden worden, dass ERK 5 durch MKK-5 phosphoryliert wird und auch die Funktion von ERK-5 konnte nicht eindeutig geklärt werden^{391,615}. *Abe et al.* erreichten 1996 eine Aktivierung von ERK-5 in glatten Muskelzellen durch Hydrogenperoxide und Sorbitol (osmotischen Schock auslösend). Eine Aktivierung der ERK-5 ist dagegen nicht durch mitogene Stimuli wie Phorbol ester, vasoaktive Peptide oder inflammatorische Zytokine (TNF) zu erreichen⁶¹⁶⁻⁶²⁰.

3.1.2.2. Intrazelluläre Regulatoren des ERK-1/2-Signalweges

3.1.2.2.1. Die Proteinkinase C (PKC)

Der Weg der ERK-Aktivierung gliedert sich zum einen in der Ebene des Signal-Eintritts in drei verschiedene Rezeptoren und anschließend in die Signalwege der MKKK entweder über PKC, PKA, Ras-Raf oder verschiedene intrazelluläre Tyrosinkinase auf. Man unterscheidet vor allem einen PKC-abhängigen von einem PKC-unabhängigen Weg der ERK-Aktivierung. Untersuchungen von *Ueda et al.* und *Hundle et al.* zeigten, dass der charakteristische Aktivator der PKC, Phorbol-12-myristat-13-acetat, auch eine Aktivierung der ERKs in nahezu allen Zellarten bewirkt^{621,622}. Bereits 1989 zeigten *Hoshi et al.* in Lymphozyten eine agonistische Stimulation der ERKs durch Phorbol-12-myristat-13-acetat-Gabe und eine Inhibierung der PKC und der ERKs nach extensiver PMA-Aussetzung⁵⁶⁹⁻⁵⁷¹. Hinzukommend ist die Inhibierung aktivierter ERKs durch PKC-Inhibitoren (Bisindolylmaleimide I, Lactacystin) und dominant negativer PKC-Mutanten. Nachfolgend wurden diese Untersuchungen jedoch auf die Notwendigkeit einer proximalen Ras-Vermittlung untersucht und es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von PKC und ERKs durch Phorbol-12-myristat-13-acetat nur in Verbindung mit der Aktivierung der PKC-nachgeschalteten und ERKs-vorgeschalteten Raf-Kinase ablaufen konnte⁶²³. Dies bedeutet, dass eine Ras-Raf-Aktivierung, welche durch eine Pyk2-Tyrosin Kinase erfolgt, einen PKC-unabhängigen Weg der PMA-Stimulierbarkeit der ERKs aufzeigt. Ein weiterer Beweis dieser Hypothese war die Aufhebung der PMA-abhängigen ERKs-Aktivierung durch Tyrosinkinase-Inhibitoren.

3.1.2.2.2. Die Raf-Kinasen

Die Raf-Kinase enthält, wie auch die PKC, in ihrem N-terminalen Ende einen Cystein-reichen Abschnitt, ein sogenanntes Zink-Bindungsmotiv. Untersuchungen von *Luo et al.* zeigten in Raf-1 Chimeren, die das homologe Zink-Bindungsmotiv der PKC substituiert hatten, keine Wirkung durch PMA. Dies bedeutet, dass das Zink-Bindungsmotiv der Raf-Kinase die entscheidende Rolle in der stimulierenden Reaktion der Raf bzw. ERKs durch PMA einnimmt. Weitere Untersuchungen zeigten wiederum auch eine Ras-unabhängige Aktivierung von Raf-1 und eine direkte Aktivierung von MKK/ERK durch die Isoformen α , β I, γ , δ und ϵ der PKC^{201,202,374,516,624-628}.

In der Beeinflussung der MAPKs-Aktivität durch Stickstoffmonoxid (NO) kann ebenfalls zwischen einer PKC-abhängigen sowie einer distalen PKC-unabhängigen

Signalvermittlung differenziert werden. Der PKC-abhängige Weg verläuft über eine beginnende Nitrosylierung an einer Thiolgruppe der Protein-Kinase C und folgenden Konformationsveränderung. Der PKC-unabhängige Weg erfolgt über die Addition einer Farnesylgruppe am C-Terminus der kleinen G-Proteine. Diese posttranslationale Modifikation der kleinen G-Proteine (Rac 1, Cdc42) wird durch das Enzym Farnesyl-Transferase katalysiert, die wiederum durch NO aktiviert wird⁶²⁹. Bedingt durch die strukturelle Modifikation erfahren die kleinen G-Proteine eine Lokalisationsveränderung innerhalb der Zelle vom Zytosol an die Plasmamembran und gleichsam den Übergang in ihre aktivierte Form⁶³⁰. Diese Einbeziehung der kleinen G-Proteine in die NO-vermittelte Kardioprotektion wurde von *Rakhit, Saurin* und Kollegen an isolierten neonatalen Kardiomyozyten zum einen durch den Einsatz des „small G-Protein“-Inhibitors (= Farnesyl-Transferase Inhibitors) α -Hydroxyfarnesylphosphorsäure und zum anderen durch den NO-Donor S-Nitroso-N-Acetyl-L-penicillamine untersucht. Die Behandlung der Kardiomyozyten mit dem NO-Donor erzielte Kardioprotektion, die wiederum durch den Inhibitor der kleinen G-Proteine vollständig aufgehoben werden konnte^{102,103}. Auch *Wang et al.* bewiesen den indirekten Weg der MAPK-Modulation durch NO, indem sie in kardialen Fibroblasten durch eine NO-bedingte Suppression des Angiotensin-II eine ERKs-Aktivierung erzeugen konnten⁶³¹.

Andere Untersuchungen konzentrierten sich auf die veränderte Zytokinregulation (INF γ und IL-1 β) durch iNOS und die Abhängigkeit der MAPKs-Aktivität durch NO-veränderte Zytokinsignale⁶³²⁻⁶³⁴.

3.1.2.2.3. Die Jak-Kinasen

Eine weitere Regulierbarkeit des MKK/ERK-Weges ist durch die Kinasen der Janus-Familie der Tyrosinkinase (Jak) möglich. Vor allem auf dem Signalweg der Zytokinvermittlung haben *Winston et al.*⁴⁶⁵ durch den Einsatz interferierender dominant negativer Jak2 Mutanten die Il-6 bedingte Stimulierbarkeit von ERK-2 blockiert. Auch wurde die Stat-Protein Phosphorylierung in der Kreuzreaktion von Jaks und ERKs untersucht. Hier zeigten *Wen et al.* und *Zheng et al.*, dass die Phosphorylierung der Ser727 Aminosäure, welche zum Erlangen der Stabilität des Stat-Dimers notwendig ist, durch ERKs vermittelt wird. Ebenso erfolgten die nukleäre Translokation, die vollständige transkriptionelle Aktivität von Stat 1 und 3 sowie die Komplexbildung der Stat-DNA durch eine ERKs-vermittelte Phosphorylierung⁶³⁵⁻⁶³⁷.

3.1.2.2.4. Die PI3-Kinasen

Die Beteiligung der Phosphatidyl-3-Kinase (PI3-K) im Signalweg von MKK/ERK konnte zum einen durch *Powis et al.* und *Vlahos et al.* durch den Einsatz pharmakologischer Inhibitoren der PI3-Kinase unter Beweis gestellt werden. Wortmannin und LY294002, beides Inhibitoren der PI3-K, vermindern die ERKs Aktivität, in der sonst gesteigerten Intensität nach Insulin-, Vasopressin- und PDGF-Aussetzung^{542,638-642}. Dagegen haben *Frevert* und *Kahn* 1997 durch Verwendung dieser beiden Inhibitoren bei einer Dosierung, welche noch keine Inhibierung der PI3-Kinase verursacht, bereits Blockierung der ERKs-Aktivität beobachten können, sodass auch auf eine PI3-Kinasen-Unabhängigkeit der ERK-Signalvermittlung geschlossen werden konnte⁶⁴³. Versuche, die die Abhängigkeit der ERKs von der PI3-Kinase bestätigten, waren die Inhibition von ERKs in dominant negativen PI3-Kinase-Mutanten und die Aktivierung in konstitutiv PI3-Kinase-aktiven Mutanten^{644,645}. Es konnte demonstriert werden, dass die PI3-K mit dem Ras-Protein über ihre katalytische p110-Untereinheit interagiert, was zu einer PI3-K-Aktivitätserhöhung führt^{25,537,539,646-650}.

3.1.3. Substrate der ERK-1/2-Kaskade

Die Substrate der MAP-Kinasen-Wege sind sehr vielfältig und umfassen im Zytosol lokalisierte Proteine und nukleäre Transkriptionsfaktoren, durch deren Phosphorylierung die Expression verschiedenster Gene aktiviert werden. Im ERKs-Weg sind die Phospholipase A2, die MAPKAP-K1/Rsk (MAPK-activated Proteinkinase/ribosomal S6 kinase)⁵⁶⁸, die MNKs (MAPKs interacting kinases)⁶⁵¹, die MSKs (mitogen- and stress-activated Proteinkinases)^{652,653} sowie der Transkriptionsfaktor Elk-1^{654,655}, die am besten charakterisierten Substrate der Kinasen.

3.1.3.1. Phospholipase A2

Phosphorylierung eines Ser-Restes der Phospholipase A2 durch die ERKs führt zur Aktivierung ihrer Lipasereaktivität. Die Folge ist eine erhöhte Freisetzung von Arachidonsäure und Lysophospholipiden, die entweder unmittelbar als Signalmoleküle wirksam werden oder Vorstufen sekundärer Botenstoffmoleküle darstellen.

3.1.3.2. MAPKAP-K1/Rsk

Die MAPKAP-K1/Rsk ist nicht die eigentliche zytosolische p70 S6 Kinase, die allein durch Insulin aktiviert wird, sie wird vielmehr durch die nachgeschaltete Position

an den ERKs-Weg gleichsam durch eine Vielzahl von Stimuli aktiviert. Von den MAPKAP-K1/Rsk konnten drei Isoformen isoliert werden. MAPKAP-K1a/Rsk1, MAPKAP-K1b/Rsk2 und MAPKAP-K1c/Rsk3. Die Aktivierung von MAPKAP-K1/Rsk durch ERK-1/2 ist komplex. Zuerst erfolgt eine Anlagerung von ERK-1/2 an einer sogenannten "docking side" einem Polypeptid (bestehend aus 43 AS) des katalytischen C-Terminus der Kinase. Nach der Anlagerung findet durch Phosphorylierung der Aminosäure Thr573 eine erste Aktivierung der Kinase statt. Danach wird am N-terminalen Ende Ser363 phosphoryliert, worauf eine trans-Autophosphorylierung der zwischen-Termini-lokaliserten Aminosäure Ser380, durch den C-Terminus folgt. Eine weitere Phosphorylierung in *cis*-Position der Kinase (Ser221) kann entweder durch Autophosphorylierung oder durch die Ser/Thr Kinase PDK-1 (3'-phosphoinositide-dependent-kinase-1) erfolgen. Ist die MAPKAP-K1/Rsk in ihren aktiven Zustand überführt, so ist es die N-terminale Domäne, die für die Phosphorylierung der ihr nachgeschalteten Substrate verantwortlich ist. Ihre Funktion ist unter anderem die Regulation des Glycogenmetabolismus durch Phosphorylierung der G-Untereinheit einer Phosphatase-1, die wiederum die Glycogen-Synthetase dephosphoryliert und in ihren aktiven Zustand überführt.^{566,568,587,656-659} Eine x-chromosomale (Xp 22.2) Erbkrankheit, welche durch eine Deletion des Gens der MAPKAP-K1/Rsk charakterisiert wurde, wird als Coffin-Lowry Syndrom bezeichnet.

Neben der Phosphorylierung verschiedener zytosolischer Kinasen durch MAPKAP-K1/Rsk ist auch die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB (cAMP response-element binding protein oder auch als ATF-2 = activating transcription factor-2 bezeichnet) beschrieben. Die Inaktivierung von MAPKAP-K1/Rsk geschieht ebenfalls durch Ser/Thr-spezifische Phosphatasen. Ein Hinweis, dass MAPKAP-K1/Rsk ein Substrat des ERK-1/2 ist, gibt die Rangfolge der Kinasen-Aktivierung. Die ERK-1/2 werden vor MAPKAP-K1/Rsk aktiviert und wiederum können vollständig inaktivierte MAPKAP-K1/Rsk durch ERK-1/2 reaktiviert werden.

3.1.3.3. Transkriptionsfaktoren

Die ERKs wurden als Kinasen klassifiziert, die hauptsächlich im Zytosol lokalisiert sind. In diesem Zusammenhang kommt jedoch die Frage auf, wie die Phosphorylierung von nukleären Proteinen, wie z.B. den Transkriptionsfaktoren, durch MAPKs möglich ist. Immunzytochemische Untersuchungen erbrachten die Erkenntnis, dass eine Translokation der Kinasen in den Nukleus stattfinden muss. Dieses Phänomen des "nucleocytoplasmic shuttling" ist reversibel und das Versiegen des Signalstimulus terminiert diesen Vorgang.^{660,661} *Pousségur* und

Kollegen zeigten, dass auch eine Sequestration der ERKs im Zytosol durch Coexpression einer katalytisch inaktiven Form der MAPK-Phosphatase MKP3 keine Verminderung der Phosphorylierung einer zytosolisch konstruierten Elk-1 Mutante verursachte, jedoch eine ERKs bedingte Gentranskription und der Eintritt in die meiotische S-Phase der Zelle in diesen Experimenten ausblieb. Der molekulare Mechanismus dieser Kinasen-Translokation ist nicht eindeutig geklärt⁶⁶². *Fukuda et al.* vermuteten, dass inaktive ERKs vorerst im Zytosol, an MEK-1 gebunden, zurückgehalten werden. Erst nach einer MEK-1 katalysierten ERKs-Phosphorylierung ist eine Dissoziation von ERKs aus dem Komplex möglich und die zur Aktivierung notwendige Dimerisierung kann stattfinden. MEK-1 selbst besitzt eine dauerhafte zytosolische Lokalisation, die durch eine Konsensussequenz bestehend aus den Aminosäure 33-44 ("consensus nuclear export signal") begründet ist. Sie verhindert einen Eintritt durch die Kernmembranpore⁶⁶³. Untersuchungen von *Cobb et al.* bewiesen, dass die Translokation der ERKs zum einen von der Phosphorylierung und zum anderen von der dimeren Form abhängig ist. Ersetzt man in Phosphoakzeptor-mutierten Fibroblasten Thr185 durch Ala und Tyr187 durch Phe, wird eine komplette Inhibition der nukleären Translokation von ERKs verursacht.^{611,613,614}

Im Prozess der Transkription können die Elementarschritte der Initiation, Elongation und Termination unterschieden werden. Neben der spezifischen RNA-Polymerase erfordert die Transkription noch die Mitwirkung zahlreicher Proteine, die allgemein als Transkriptionsfaktoren bezeichnet werden. Entsprechend der Beteiligung des Faktors auf einer bestimmten Ebene der Transkription erhält er seine nähere Bezeichnung. Die Aktivierung von Elk-1 (Ser383, Ser389) erfolgt durch die Phosphorylierung der nukleär translozierten ERK-1/2. Sie binden an die "docking side", die sogenannte D-Domäne des Transkriptionsfaktors (AS: 312-334). Die Phosphorylierung erzeugt eine Konformationsveränderung, die eine Bindung des Transkriptionsfaktors, zusammen mit dem Serum-Response-Faktor (SRF), an das Serum-Response-Element (SRE) induziert. SRE ist eine regulatorische Sequenz des c-fos Promotors, die in vielen höheren Eukaryoten zu finden ist⁶⁶⁴⁻⁶⁶⁸. Zusammen binden SRF und SRE an das Polypeptid TCF (ternary complex factor), einem Ets-Domänen tragenden Transkriptionsfaktor.^{669,670} Es folgt eine erhöhte Expression von c-fos, der zusammen mit dem Transkriptionsfaktor c-Jun ein Dimer des Transkriptionsfaktorkomplex AP-1 bildet⁶⁷¹⁻⁶⁷³.

Die Beteiligung des Transkriptionsfaktors Elk-1 konnte im kardialen Bereich in den pathologischen Veränderungen der Hypertrophie und Ischämie nach ERK-1/2 Aktivierung festgestellt werden⁶⁷⁴⁻⁶⁷⁸. Hierbei stimuliert Elk-1 durch Bindung an Promotor-nahe DNA-Abschnitte die Transkription von Genen, die cis-regulato-

rische, cAMP sensitive DNA-Elemente tragen. Der genaue Mechanismus der Elk-1-stimulierten Transkription ist noch nicht bekannt, doch die Bestimmung der translatierten Proteine erbrachte vor allem das „early gene protein“ c-Fos.⁶⁷⁹ Eine Aktivierung von Elk-1 konnte ebenfalls durch die SAPKs/JNKs beobachtet werden und zeigte somit ein weiteres Mal die Vernetzung der Signalwege der MAPKs auf^{654,680}.

3.2. Der Stress-aktivierte MAPKs-Signalweg (JNKs/SAPKs und p38 MAPKs)

Die Kaskaden der Stress-aktivierten MAPKs sind vor allem in die Zellantwort der Stimuli:

- Apoptose-induzierende Stimuli^{639,681-694}
- Inflammation (proinflammatorische Zytokine der TNF-Familie, wie TNF- α , Interleukin-1, CD40-, CD27- und Fas-Liganden, Aktivatoren des NF- κ B)⁶⁹⁵⁻⁶⁹⁹
- UV- und ionisierende-Strahlenirritation^{329,445,700,701}
- Hyperosmolarität, Hitze⁷⁰²⁻⁷⁰⁶
- Translationsinhibitoren (wie zum Beispiel Cycloheximid, Anisomycin)^{383,581,696,704,707}
- freie Radikale (ROS = reactive oxygen species)^{98,310,503,681,708-710}
- mechanischer "shear" Stress^{555,557,579,711,712}
- DNA zerstörende Chemikalien (z.B Topoisomerase Inhibitoren, alkylierende Substanzen)^{24,713-722}

sowie andere Stresssituationen involviert. In Hefen erfolgt die Aktivierung von HOG1, dem Homolog zu p38-MAPK, bei Hyperosmolarität durch die spezifischen Osmorezeptoren SLN1 und SHO1. Eine mechanische Membrandistorsion aktiviert dabei die beiden Rezeptoren⁷²³. Physikalische Einflüsse, wie UV-Strahlung bewirken bei EGF-, TNF α - oder IL-Rezeptoren eine gedrängte Formation der Rezeptorstruktur. Dies fungiert als Signal der Rezeptor-Dimerisierung. Eine weitere Möglichkeit des Signaleintritts von mutagen wirkenden Stoffen, wie z.B. der verwendeten Chemotherapeutika in der Krebsbehandlung, ist die Auslösung einer DNA-Schädigung⁷²⁴. Der Grad der JNKs/SAPKs-Aktivierung durch UV-B oder UV-C-Strahlung wurde nach der Anzahl der aufgetretenen DNA-Schädigung

bestimmt. Überraschend war hier die mögliche Aktivierung von Stress-aktivierten Proteinkinasen ausschließlich in isolierten Zellen^{725,726}.

3.2.1. Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen der JNKs/SAPKs und p38-MAPKs (MKKs)

Bei den vorgeschalteten Proteinkinasen der Stress-aktivierten Proteinkinasen, den MKKs, konnten vier verschiedene selektiert werden. Es handelt sich hierbei um MKK-3 und MKK-6, die die p38-MAPKs phosphorylieren⁷²⁷⁻⁷³¹ und MKK-4 und 7, die auch als JNKK1 / SEK1 und JNKK2 / SEK2 bezeichnet werden. MKK-4 und 7 regulieren JNKs / SAPKs durch Phosphorylierung an Thr183 und Tyr185^{728,732-735}. Sie bewegen sich in der Größenordnung von 35 bis 45 kDa und besitzen nicht, die bei den MKK-1/2 beschriebene prolinreiche Sequenz, die zwischen den Subdomänen neun und zehn eingeschoben liegt. MKK-6 besitzt *in vivo* wie auch *in vitro* die Fähigkeit, alle Isoformen von p38-MAPK zu aktivieren, wogegen MKK-3 nur p38-MAPK α/β zu aktivieren vermag.

Für MKK-4 konnte *in vitro* ein Phosphorylierungspotenzial für p38-MAPKs und ERKs beobachtet werden^{736,737}. Dem Verhalten ihrer nachgeschalteten Substratkinasen entsprechend, werden sie durch die gleichen Stimuli aktiviert, doch kann man eine deutliche Differenzierung zwischen den MKK-4/7- und MKK-3/6-Stimuli machen. MKK-4/7 wird vor allem durch inflammatorische Zytokine (TNF, IL-1), ionisierende Strahlung und Chemotherapeutika (Anisomycin, Cisplatin, Adriamycin, Vinblastin, Etoposid, u.a.) aktiviert. MKK-3 und 6 hingegen werden bevorzugt durch hyperosmotische Schocksituationen stimuliert^{730,738,739}. Die Aktivierungsstellen dieser Enzyme sind im Vergleich zu MKK-1, an der Aminosäure Ser218 ebenfalls ein Serin, an Ser222 jedoch ein Threonin. Duale Phosphorylierung durch Stress-aktivierte MAP Kinasen Kinasen Kinasen (MEKK oder MKKK) ist notwendig, um Aktivierung zu erzielen⁷⁴⁰⁻⁷⁴². Die "activation loops" sind bei allen MKKKs in der Subdomäne 8 der Kinase lokalisiert. Die MKKKs der Stress-aktivierten Proteinkinasen sind die Säugetierhomologe der Hefekinasen (*S. cerevisiae*) STE11p und STE20p^{743,744}. Weiterhin existieren die "apoptosis-signal-regulating kinase-1" (ASK 1), die TGF- β -activated kinase-1 (TAK 1) sowie die "mixed lineage kinases" (MLKs) und die "thousand and one" Kinase (TAO 1/2). MKK-4 und 7 werden von den MKKKs, MLK-2 und MLK3 phosphoryliert und aktiviert^{556,745-747}. Im Herzen werden MKK-3, -4 und -6 vor allem durch ASK-1 aktiviert.

Tab. 1. Tabellarische Übersicht der MEKK (Mitogen-aktivierten Proteinkinase Kinase Kinase) und ihrer Substrate der MKKs (Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase). ASK: apoptosis-signal-regulating kinase; MLK: multilineare Proteinkinase (mixed lineage kinases); TAO: thousand and one Proteinkinase.

Bezeichnung der MKKKs (MAPKKKs oder MEKKs)	Substrat / Effektoren der MKKKs
MEKK1	MKK4, MKK7
MEKK2	MKK4, MEK1
MEKK3	MKK4, MEK1, MKK3, MKK6
MEKK4	MKK4, MKK4, MKK6
ASK1	MKK4, MKK4, MKK6
TAK1	MKK4, MKK4, MKK6
MLK2	MKK4, MKK7
MLK3	MKK4, MKK7
TAO1/2	MKK3

3.2.2. Die c-Jun-NH₂-terminalen Proteinkinase (JNKs)

Die Art der JNKs/SAPKs-Stimuli unterscheiden sich grundsätzlich von der des MKK-1/2/ERKs-Weges, doch können auch Wachstumsfaktoren, Transformations- und Differenzierungsstimuli eine Aktivierung der Stress-aktivierten MAPKs hervorrufen^{697,700,748-750}. Die Entdeckung der Stress-aktivierten MAPKs geschah nach der von ERKs. Durch Injektion des Protein-Synthese-Inhibitors Cycloheximid in Ratten entdeckte *Kyriakis et al.* zufällig neben der Aktivierung der p70 S6 Kinase auch die Aktivierung einer Ser/Thr Kinase, die vorerst MAP2 (microtubule-associated protein-2) genannt wurde⁵⁵⁸. Nach näheren Untersuchungen und der Isolierung größerer Mengen des Proteins benannte man die Kinase nach ihrem Molekulargewicht p54-MAP2 Kinase. Um eine einheitliche Nomenklatur der MAPKs zu verwirklichen, beschränkte man sich, wie bei den ERKs, auf die Benennung der Kinase nach den einwirkenden Stimuli. Man bezeichnete sie ab sofort als Stress-aktivierte Protein-Kinasen, aber auch nach ihrem Hauptsubstrat c-Jun, welches am NH₂-amino-terminalen Ende phosphoryliert wird, als c-Jun-NH₂-terminale Kinase. Wie bereits bei den ERKs konnte weder die alleinige Deaktivierung durch Tyrosin- oder Ser/Thr-Phosphatasen eine Verminderung der SAPKs/JNKs-Aktivität bewirken. Dies erbrachte die Erkenntnis, dass eine kokombinierte Phosphorylierung von Tyr- als auch Ser/Thr-Resten zur vollständigen Aktivierung der Kinase notwendig ist⁷⁵¹⁻⁷⁵⁴ (Abb. 10).

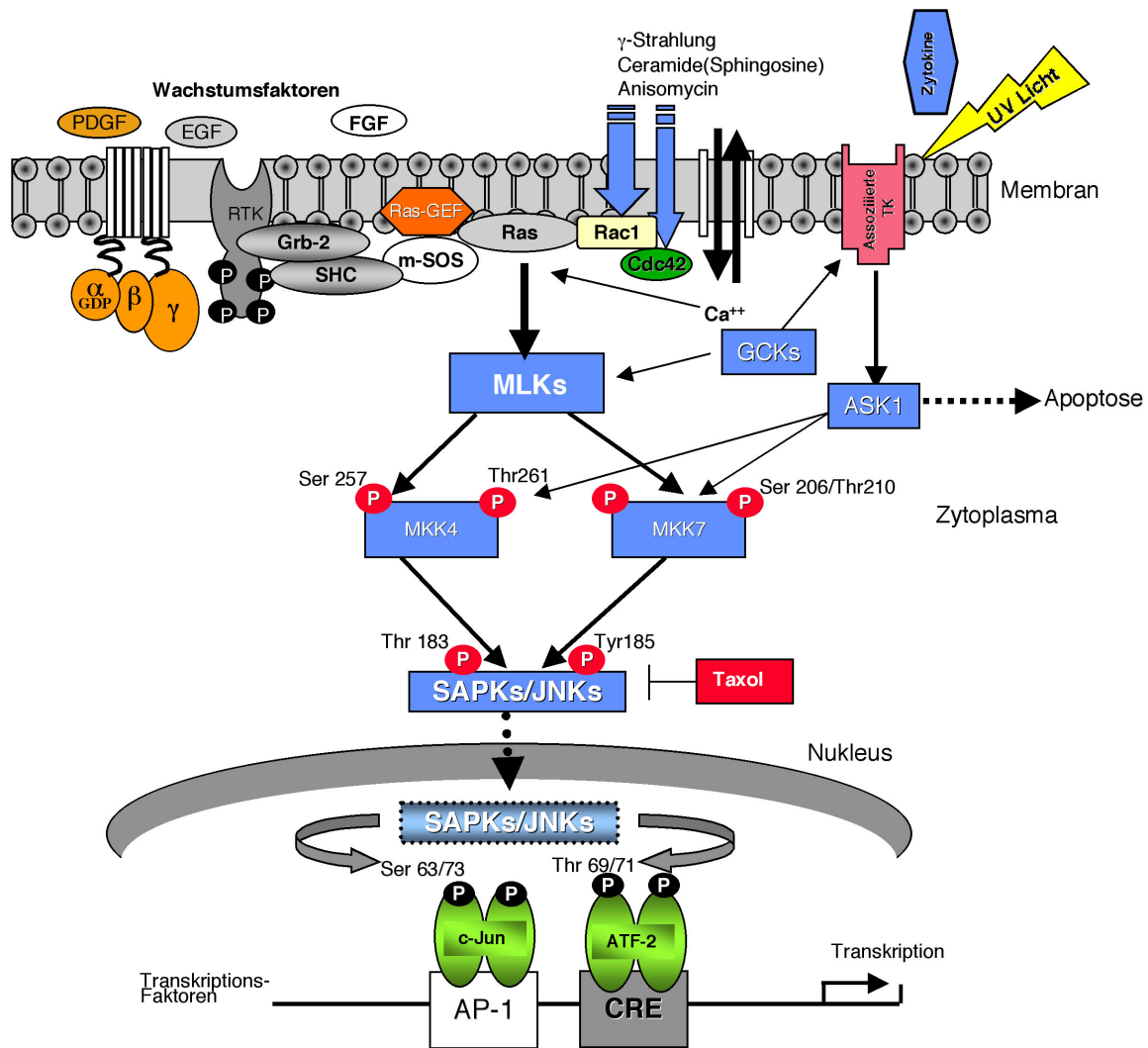


Abb. 10: Schematische Zusammenfassung der intrazellulären Signaltransduktionswege der Stress-aktivierten c-Jun-NH₂-Proteinkinase (SAPKs/JNKs) nach Aktivierung durch Wachstumsfaktoren-Rezeptoren (Rezeptor-Tyrosinkinase; RTK), G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und assoziierte Tyrosinkinase-Rezeptoren (TK). PDGF: Platelet-derived growth factor; EGF: Epidermal growth factor; FGF: Fibroblast growth factor; TNF α : Tumor-Nekrose Faktor α ; IL-1: Interleukin-1; α , β , γ : Untereinheiten des G-Protein Rezeptors; P: Phosphorylierungsstelle; m-SOS: mammalian son of Sevenless, sevenless-Gen in der Fruchtfliege; Grb-2-Protein: Growth factor receptor binding protein; SHC: Src-Homolog; Ras-GEF: rat sarcoma-guanine nucleotide exchange factor; Rac1: Ras-related C3 botulinum toxin substrate (small GTP-binding protein); Cdc42: cell division cycle 42 (GTP binding protein), MLKs: mixed lineage kinases; GSKs: Glucokinases; ASK-1: apoptosis-signal-regulating kinase-1; MKK-4/MKK-7: Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase 4 und 7, Taxol: unspezifischer Inhibitor des SAPKs/JNKs Signalweges; c-Jun: cellular sarcoma virus 17 oncogene homolog; ATF-2: activating transcription factor-2; AP-1: Adaptor-related protein complex; CREB: c-AMP response element-binding protein related; Ser: Serin; Thr: Threonin; Tyr: Tyrosin.

Aufgrund der Unterschiede der Stimuluscharaktere sowie der nicht übereinstimmenden Substratspezifitäten der ERKs und SAPKs/JNKs, wurde eine neue Subfamilie der MAPKs deklariert. Die SAPKs/JNKs waren nicht in der Lage, MAPKAP-K1/Rsk zu aktivieren, dagegen konnte eine Phosphorylierung von c-Jun an den Serinresten 63/73 beobachtet werden. Drei Isoformen konnten bei den JNKs unterschieden werden. Es sind JNK-1, JNK-2 und JNK 3, die übereinstimmend mit den Isoformen SAPK- α , - β , und - γ sind. Die Kodierung erfolgt durch die drei Gene SAPK- α /JNK-1, SAPK- β /JNK-2 und SAPK- γ /JNK-3. Alternatives mRNA-Splicen des C-Terminus der Kinasen erbrachte die Diversifikation von weiteren zehn Isoformen. Vier Formen der JNK-1, vier der JNK-2 und zwei der JNK 3, die im Molekulargewicht zwischen 45 und 57 kDa liegen, konnten bestimmt werden ⁷⁵⁵. Wie auch die ERKs besitzen die SAPKs/JNKs in der Sodomäne acht der Kinase die katalytische Domäne mit der Phosphoakzeptorsequenz Thr-X-Tyr, wobei X im Gegensatz zu ERKs die Aminosäure Prolin und nicht Glutamin darstellt ^{558,694,756}.

3.2.3. Die p38-Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (p38-MAPKs)

Die p38-MAPKs, das Säugetier-Homolog der osmosensitiven HOG1 Kinase der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (52%ige Aminosäuresequenzhomologie) wurde zuerst als Protein isoliert, das durch Einwirkung des bakteriellen Endotoxins - Lipopolysaccharid- aktiviert werden konnte. Gleichzeitig besass es die Fähigkeit, das Protein MAPKAP-Kinase-2 sowie hitzestabile Proteine (HSP 25/27) mit dem Molekulargewicht 25 und 27 kDa zu aktivieren ^{748,757,758 376,702,758-764} (Abb. 11). Vier Isoformen der p38-MAPKs sind bekannt α , β , und δ , die auch als Stress-aktivierte Proteinkinasen MPK2/SAPK2a, SAPK2b, ERK6/SAPK3 und SAPK-4 bezeichnet werden. Wie auch die vorherigen MAPKs besitzen die p38-Proteinkinasen das Phosphorylierungsmotiv der Thr-X-Tyr-Konsensussequenz, wobei die beliebige Aminosäure X bei den p38-MAPKs durch die Aminosäure Glycin eingenommen wird.

Die Länge des gesamten "activation lip" ist unterschiedlich zwischen den drei MAPKs-Subfamilien. Die ERKs besitzen eine Länge von 25 Aminosäuren, die JNKs / SAPKs nur 21 und die p38-MAPKs sogar nur 19 Aminosäuren. Sie liegt jedoch bei allen zwischen den Subdomänen 7 und 8. ^{765,766}. Die Sequenz, welche C-terminal P+1 des Phosphorylierungsrestes folgt, ist bei allen drei wiederum gleich, es ist konsequent ihres übereinstimmenden Erkennungsmotivs eine Ser/Thr-Pro-reiche Sequenz ⁶¹⁰.

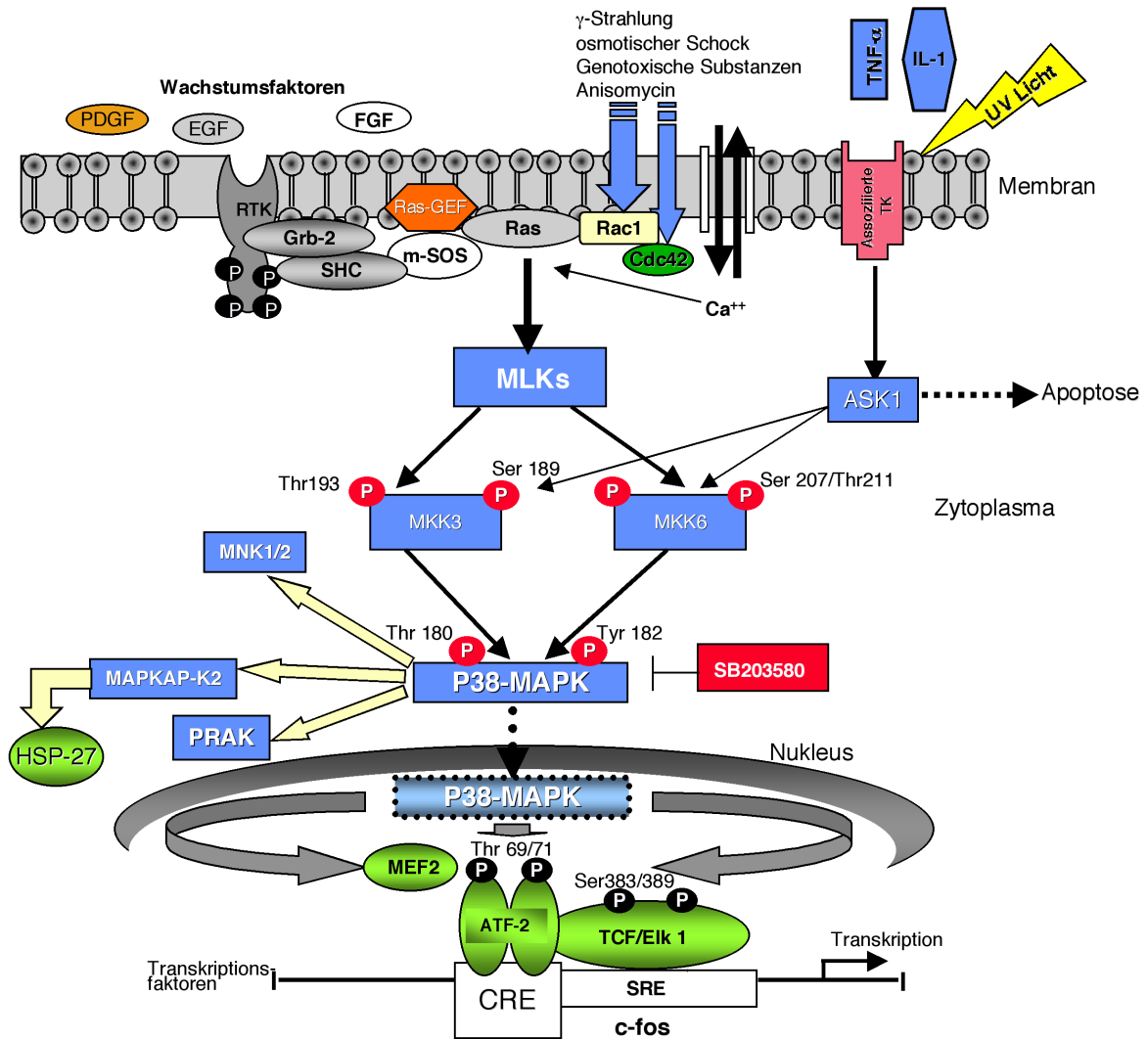


Abb. 11: Schematische Übersicht der Signalkaskade der p38-MAPKs nach Aktivierung durch Wachstumsfaktoren-Rezeptoren (Rezeptor-Tyrosinkinase; RTK), G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und assoziierte Tyrosinkinase-Rezeptoren (TK). PDGF: Platelet-derived growth factor; EGF: Epidermal growth factor; FGF: Fibroblast growth factor; TNF α : Tumor-Nekrose Faktor α ; IL-1: Interleukin-1; α , β , γ : Untereinheiten des G-Protein Rezeptors; P: Phosphorylierungsstelle; m-SOS: mammalian-son of Sevenless, sevenless-Gen in der Fruchtfliege; Grb-2-Protein: Growth factor receptor binding protein; SHC: Src-Homolog; Ras-GEF: rat sarcoma-guanine nucleotide exchange factor; Rac1: Ras-related C3 botulinum toxin substrate (small GTP-binding protein); Cdc42: cell division cycle 42 (GTP binding protein); MLKs: mixed lineage kinases; GCKs: Glucokinases; ASK-1: apoptosis-signal-regulating kinase-1; MKK-3/MKK-5: Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase 3 und 5; MAPKAP-K2: Mitogen-aktivierte Proteinkinase aktivierte Proteinkinase; MNK 1/2: mitogen-activated Proteinkinase-interacting serine/threonine kinase; PRAK: p38-regulated/activated kinase; SB203580: spezifischer Inhibitor des p38-MAPKs Signalweges; TCF/Elk 1: transcription factor/ETS-domain protein, HSP-27: heat shock protein mit dem Molekulargewicht von 27 kDa; ATF-2: activating transcription factor-2; MEF-2: MADS (yeast mating type-specific transcription factor MCM1) box transcription enhancer factor; SRE: serum response element; CREB: c-AMP response element-binding protein related; c-fos: FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog; Ser: Serin; Thr: Threonin; Tyr: Tyrosin.

Adamas et al. untersuchten an p38-MAPK $-/-$ knockout Mäusen (Genlocus Chromosom 6p21.3-p21.2) die physiologische Entwicklung von Embryonen. Einige der Embryonen verstarben am Tag 11,5-12,5 der Trächtigkeit. Die Ursache des Todes lag zum einen in einer verminderten Herzgröße sowie Missbildungen der Blutgefäße im Kopfbereich, jedoch vor allem in der insuffizienten Plazentation ab der Trächtigkeitsmitte. Die Embryonen, welche lebend ausgetragen wurden, kamen in einem reifen Entwicklungszustand zur Welt und zeigten normalen Habitus und Organmorphologie. Alle Embryonen wiesen jedoch eine aplastische Form der Anämie auf, die aufgrund verminderter Erythropoese durch fehlende Expression des Erythropoetin-Genes zum Tragen kam. Wiederum erbrachten Versuche an p38-MAPK-defizienten hämatopoetischen Stammzellen eine p38-MAPK-unabhängige Signalvermittlung, ausgehend vom Erythropoetin-Rezeptor⁷⁶⁷. Daher zogen die Autoren den Rückschluss, dass bereits zum Zeitpunkt des Reifungsprozesses der Erythropoese, d.h. zum Zeitpunkt der Stammzellevolution eine p38-MAPK Vermittlung existieren muss⁷⁶⁸.

Von großem Interesse war die Erkenntnis der Bindungs-Eigenschaft der p38-MAPK-Isoformen α und β an Pyridinyl-Imidazolen, welche zur Substanz-Klasse der antiinflammatorischen Pharmaka gehören. Man bezeichnet sie auch als **cytokine-suppressive anti-inflammatory drugs (CSAIDs)**⁷⁶⁹⁻⁷⁷³. Dass die Isoformen γ und δ nicht an das CSAIDs SB203580 binden, liegt daran, dass sie anstatt der Aminosäure Thr106 in der ATP-Bindungsdomäne der α -Isoform, Methionin besitzen. Jedoch nur Threonin in dieser Position interagiert mit dem Fluor-Atom des SB203580 Moleküls⁷⁷⁴⁻⁷⁷⁷.

3.2.4. Intrazelluläre Regulatoren der Stress-aktivierten Proteinkinasen

3.2.4.1. Die kleinen regulatorischen GTPasen

Entsprechend der Ras-GTP Regulation des MKK/ERK-Signalweges existiert die Familie der Rho-regulierten Kinasen, die kleinen regulatorischen GTPasen (small G-proteins) bei den Stress-aktivierten Proteinkinasen^{629,778-782}. Mit ihren Mitgliedern RhoA, Rac1, Rac2 und Cdc42 gehören sie zur Ras-Superfamilie. Sie sind positive Regulatoren des JNKs/SAPKs und p38-MAPKs-Weges und beteiligen sich an der Zytoskelettorganisation. Rac und Cdc42⁷⁸³⁻⁷⁸⁷ fungieren insbesondere als Regulatoren der Lamellopodien- und Filopodienbildung des Zellmembranstrukturaufbaus. Ebenfalls bedingen sie die Erzeugung von reaktiven Superoxidradikalen in phagozytierenden Zellen, sodass eine schnellere Phagozytose erfolgen kann. Rho ist in der Formierung der Aktinfilamente und der Bildung des kontraktilen Aktinringes bei der Zellteilung beteiligt⁷⁸⁸. Rac 1 und 2 besitzen eine 92%ige Sequenzhomologie. Alle genannten kleinen GTPasen sind Substrate von

vielzähligen Bakterientoxinen. So besitzt z.B das Clostridium botulinum-Toxin⁷⁸⁹ eine deaktivierende Potenz auf RhoA, indem die C3-ADP-Ribosyltransferase, die für die aktivierende Phosphorylierung von RhoA verantwortlich ist, blockiert wird. Weitere inhibierende Toxine sind die Zytotoxine von Clostridium difficile, indem durch Glykosylierung des Thr37 der RhoGTPase die Bindung zum Effektormolekül verhindert wird. Die Toxine von Pseudomonas aeruginosa, Salmonella und Yersinia Subspezies fungieren als Exoenzyme und verdrängen das Rho-Protein von seiner Bindung zum nachfolgenden Substrat, d.h. sie wirken als GAP-like "injected" toxins. Ebenfalls existieren "small GTPases" aktivierende Substanzen. Zu ihnen gehören das zytotoxisch nekrotisierende Toxin (CNF), gebildet von Escherichia coli sowie das Dermonekrotoxin (DNT) von Bordetella Subspezies. Diese Toxine besitzen entweder eine Desamidase oder eine Transglutaminase im C-Terminus, wodurch die intrinsische GAP-stimulierte GTP-Hydrolyse blockiert wird und die GTPasen dauerhaft aktiviert bleiben⁷⁹⁰⁻⁷⁹⁷.

3.2.4.2. Die PAKs und die MLKs

Die vermittelnde Funktion der kleinen GTPasen zwischen Rezeptor und MKKKs ist nicht eindeutig gesichert. Die Interaktion mit den PAKs (**p**21Ras-**a**ctivated **k**inases) und direkt mit den Ras-Proteinen, was zur Translokation von Ras an die innere Plasmamembran führt, ist nachgewiesen. PAKs sind Enzyme, die Homologien zu den Hefe-STE20-Kinasen besitzen und ein Gewicht von 60-70 kDa haben. PAKs aktivieren *in vivo* wie auch *in vitro* JNKs/SAPKs und p38-MAPKs und werden selbst durch GTP-Rac und GTP-Cdc42, jedoch nicht durch Rho-GTPasen zur Aktivierung und Autophosphorylierung stimuliert. Es können vier Formen unterschieden werden, PAK 1, PAK 2, PAK 3/ β PAK und γ PAK^{602,798,799}. Das humane PAK 1-Gen kodiert für ein Polypeptid, bestehend aus 545 Aminosäuren. Es konnte eine 98%ige Homologie zur Ratten-PAK 1 und eine 52%ige zur Hefe-STE20-Kinase festgestellt werden. PAKs werden ubiquitär im Körper exprimiert, vermehrt wurden sie aus Skelettmuskulatur, dem Herzen, der Leber, den Ovarien, dem Thymus und der Milz isoliert^{800,801}.

Die Verbindung von PAKs zu JNKs/SAPKs erfolgt über die MKKs oder MLKs. Versuche von *Teramoto et al.* mit dominant negativen MLK 3-Mutanten zeigten eine Inhibierung des Signalschrittes von PAKs zu JNKs^{310,311}. Weitere Interaktionen der PAKs-Proteine erfolgen mit der Phospholipase C γ und bei PAK 1 und 3 auch über die Adaptorproteine Ncks, im Speziellen über deren SH3-Domäne und dem prolinreichen N-Terminus^{802,803}. Ein Zielsubstrat der PAKs ist die Myosin-Light-Chain-Kinase. Ihr Phosphorylierungsstatus erhöhte sich signifikant in neonatalen Hamster-Nieren-21-Zellen, die konstitutiv aktivierte PAKs exprimierten⁸⁰⁴.

3.2.4.3. Die Proteinkinase N

RhoA ist nicht in den PAK-Signalweg involviert, anstatt dessen existiert hier eine Interaktion mit der **Proteinkinase N** (PKN). Diese Kinase besitzt ein Gewicht von 120 kDa und entspricht im Aufbau weitestgehend der PKC plus einem am N-Terminus befindlichen Leucin-reichen Motifs, das im Reißverschlussverfahren (leucine-zipper-motif) in den N-Terminus eingefügt ist⁸⁰⁵⁻⁸⁰⁷. Durch die Bindung mit RhoA erfährt die PKN eine Aktivierung und Translokation nach einem Stress-Stimulus vom Zytosol in den Nukleus. Dieser Vorgang ist die Voraussetzung für die Rho-bedingte Aktivierung von JNKs/SAPKs und p38-MAPKs.

3.2.4.4. Die ROKs

Versuche, die beiden Funktionen der kleinen GTPasen in den Aufbau des Zytoskeletts und in die Aktivierung der Stress-aktivierten Proteinkinasen zu differenzieren, erbrachte die Erkenntnis eines ungekoppelten Weges der beiden Aktionen. *Lamarch et al.* und *Joneson et al.* untersuchten dabei die ROKs, **RhoA-binding kinases a** und **b**. Dies sind Kinasen, die von allen drei Arten der kleinen GTPasen als Substrat genutzt werden und nur bei der Zytoskelettförmung der GTPasen agieren. Mutationen der ROKs erbrachten keine Beeinflussung des Rho, Rac und Cdc42-vermittelten Signalweges der Stress-aktivierten Proteinkinasen^{494,783,808}.

3.2.5. Substrate des JNKs und p38-MAPKs-Signalweges

3.2.5.1. Der Transkriptionsfaktor c-Jun

Die Stress-aktivierten JNKs haben hauptsächlich den Transkriptionsfaktor c-Jun als Substrat. Sie binden an die N-terminale δ -Transaktivierungsdomäne des c-Jun-Proteins, die zwischen den Aminosäuren 32 und 52 liegt und einen hydrophoben Charakter besitzt. Die SAPKs/JNKs phosphorylieren die Reste Ser63 und Ser73 des c-Jun, wodurch eine Hochregulierung der Phosphorylierungsintensität des Transkriptionsfaktors und eine erhöhte Transkriptionsaktivität von Genen zu beobachten sind, die durch c-Jun kontrolliert werden^{809,810,811}.

c-Jun bildet zusammen mit c-Fos den voll funktionsfähigen und aktiven Transkriptionsfaktorkomplex AP-1, da es allein nicht an den Promotor-Enhancer binden kann. Diese funktionell bedeutsame Komplexbildung entsteht durch die Anziehung von Leucin-Zipper-Wechselwirkungen der beiden Proteine^{812,813} (Abb. 12).

Es existiert eine kontroverse Diskussion darüber, ob c-Jun und c-Fos und die folgende Expression von Proteinen und Mediatoren, entweder Antreiber der Infarktentstehung (Nekrose- und Apoptoseentstehung) darstellen oder ob die Transkription der beiden Faktoren die Expression von Nekrose- und Apoptosehemmender Proteine und den Aufbau der Kardioprotektion der Zelle bedingen⁸¹⁴.

Colotta et al. beschrieben, dass Lymphozyten mit einem defizienten Wachstumsfaktor eine höhere Überlebenschance besitzen, sofern c-Jun und c-Fos durch Antisense Oligonukleotide blockiert wurden⁸¹⁵. Andererseits führt das Überangebot von c-Fos zu einem Anstieg des apoptotischen Zellunterganges in B-Zellen und eine Erhöhung von c-Jun in Endothelzellen ebenfalls zu vermehrter Apoptose. Diese Ergebnisse konnten mit einer dominant negativen Mutante von c-Jun (TAM67) bestätigt werden, da Endothelzellen mit TAM67, auch nach Aussetzung mit H₂O₂, eines der stärksten apoptotisch wirkenden Agens, keine vermehrte Apoptose zeigten. Daher wurde der Rückschluss gezogen, dass c-Jun eine auslösende Signalwirkung auf den apoptotischen Zelluntergang besitzt. Die JNKs-Kaskade bildet möglicherweise einen schützenden Signalweg gegen den genetisch gesteuerten Zelltod. Dies konnte durch Versuche an neonatalen Myozyten veranschaulicht werden, die nach Behandlung mit Anisomycin, einem JNKs-Aktivator, vermehrte Apoptose zeigten^{555,716,816,817}.

Im Gegensatz dazu gibt es Studien mit c-fos und c-Jun knockout Mäusen, in denen kein vermehrter Zelltod durch Apoptose zu erkennen war, daher ist die Notwendigkeit von c-Jun und c-Fos für Apoptose nicht gegeben. Weitere Studien zeigten, dass die Überlebenszeit von Zellen ohne c-Fos nach UV-Bestrahlung drastisch verkürzt war^{818,819}. Auch Versuche mit Fibroblasten, die aus c-Jun^{-/-} und c-Fos^{-/-} knockout Mäusen stammten, zeigten weniger Apoptose im Vergleich zu Fibrozyten von Wildtyp-Mäusen^{820,821}.

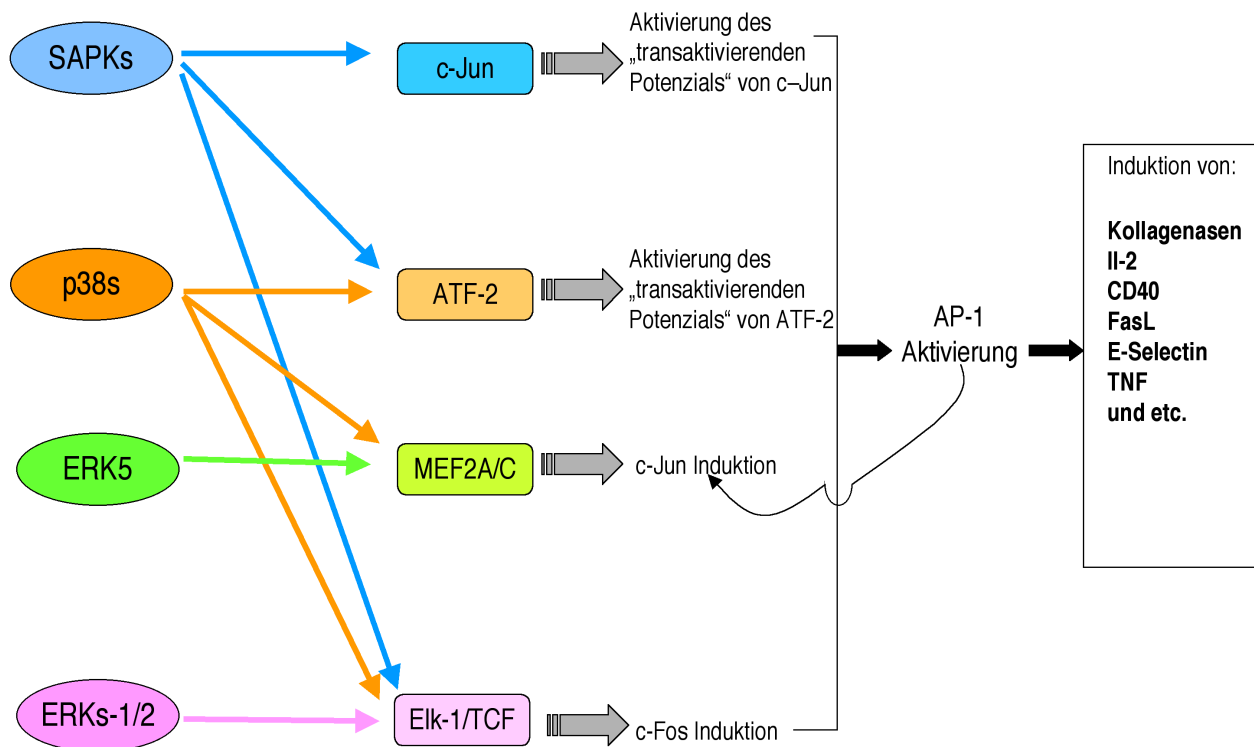


Abb. 12 Schematische Darstellung der Aktivierungswege der Transkriptionsfaktoren der verschiedenen MAPKs. SAPKs: Stress-aktivierte Proteinkinase; p38: MAPKs mit dem Molekulargewicht von 38 kDa; ERK: extrazellulär-Signal-regulierte Proteinkinase; TCF/Elk 1: transcription factor/ETS-domain protein; ATF-2: activating transcription factor-2; MEF-2: MADS (yeast mating type-specific transcription factor MCM1) box transcription enhancer factor; c-fos: FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog; c-Jun: cellular sarcoma virus 17 oncogene homolog; AP-1: activator protein; CD40: cluster of differentiation; FasL: cell surface cytokine receptor Ligand (Apoptosis antigen ligand); E-Selectin: endothelial leukocyte adhesion molecule; IL-2: Interleukin-2; TNF: tumor necrosis factor.

3.2.5.2. Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-aktivierte-Proteinkinase 2 (MAPKAP Kinase-2)

Die MAPKAP Kinase-2 ist das hauptsächliche Substrat der p38-MAPKs. Sie erfährt Aktivierung durch die Phosphorylierung an ihren Aminosäuren Thr25, Thr222 und Ser272⁸²² sowie durch Autophosphorylierung an Thr334. Aktivierung der MAPKAP-Kinase-2 ist nur durch die p38-MAPK-Isoformen α und β möglich. Es besteht keinerlei strukturelle Übereinstimmung zur MAPKA-K1/Rsk, dem Substrat der ERKs. Eine Aktivierung der MAPKAP-Kinase-2 durch ERKs konnte *in vitro* nachgewiesen werden^{823,824}, obwohl keine Aktivierung der MAPKAP-Kinase-2 durch den ERKs-charakteristischen Stimulus Insulin zu beobachten ist. Dies beweist, dass dieses Substrat nicht zu den physiologischen Substraten der ERKs-Kaskade gehört^{730,825}.

Die MAPKAP-Kinase-2 besitzt wiederum die Funktion, das Hitze-Schock Protein 27 (HSP27) an den Aminosäuren Ser15, Ser78 und Ser82 zu phosphorylieren⁷⁰². Unphosphorylierte HSP 27 existieren als hochmolekulare Multimere, die nach erfolgter Phosphorylierung in Mono- und Dimere dissoziieren und eine Umverteilung vom Zytosol, gebunden an das Aktinzytoskelett erfahren. In Peroxid-behandelten humanen Umbilikal-Gefäßendothelzellen konnten *Huot et al.*^{763,826} zeigen, dass diese Umverteilung der phosphorylierten HSP 27-Monomere eine Reorganisation des F-Aktin zu Stressfasern, den Vorläufern der Myofibrillen vermittelt und somit die Zellmotilität fördert⁷⁶¹.

3.2.5.3. p38-regulierte/aktivierte Kinase (PRAK)

Ein weiteres Substrat des p38-MAPK-Weges ist die PRA-Kinase (**p38-regulated/activated kinase**). Es handelt sich hierbei um eine Kaskaden-proximal lokalisierte Serin/Threonin-Kinase mit einem Molekulargewicht von 50 kDa. Der strukturelle Domänenbau der Kinase ähnelt im NH₂- wie auch C-terminalen Bereich dem der MAPKAP-K2⁸²⁷. Ebenso wie die MAPKAP-K2 ist sie ein spezifisches Substrat der α - und β -Isoformen der p38-MAPKs und eine Inhibierung durch CSAIDs ist möglich. Liegt PRAK nach Phosphorylierung der Aminosäure Thr182 an ihrem "activation loop" in aktiver Form vor, so ist sie wiederum in der Lage, HSP 27 zu phosphorylieren und somit zu aktivieren.

3.2.5.4. Die Transkriptionsfaktoren der p38-MAPKs-Kaskade

Zu den Transkriptionsfaktoren des p38-MAPK-Signalweges gehören zum einen NFAT (nuclear factor of activated T cells) und zum anderen ATF-2 und MEF-2, die beide zur Aktivierung des AP-1 führen. NFATs werden nach einer Phosphorylierung an fünf bis sechs Seiten (Aminosäuren 204-215) im Zytosol zurückgehalten. Die Phosphorylierung erzeugt eine Konformationsänderung, die eine Maskierung des nukleären Lokalisationssignals bedingt. Die Phosphorylierung findet unter katalytischer Gegenwart der Casein-Kinase-I α oder der Glycogen-Synthetase-Kinase (GSK)-3 durch p38-MAPK statt. Die Ca²⁺-abhängige Phosphatase Calcineurin dagegen bedingt eine Dephosphorylierung und ermöglicht damit die nukleäre Translokation der NFATs und eine gleichsamer Erhöhung ihrer Bindungsaffinität zur DNA. Die DNA-Bindungsstellen der NFATs sind zumeist in der Nähe der AP-1 Promotorstelle, sodass eine kooperative Bindung und synergistische Transaktivierung einer großen Anzahl von Genen (z.B. IL-2, IL-4, IL-5, ...) die Folge von NFATs und AP-1 Aktivierung ist^{578,828,829} (Abb. 12).

Der Transkriptionsfaktor MEF-2 gehört zur Familie der regulatorischen DNA-bindenden-Proteine der Myogenese^{830,831}, der Entwicklung des Nervensystems⁸³² sowie der kardialen Entwicklung^{767,768}. Insbesondere konnte hier eine Beteiligung an der Entwicklung des rechten Ventrikels gezeigt werden. Es erfolgte eine Untergliederung der "Myocyte-specific enhancer factors" in MEF-2A, B, C und D, die unterschiedliche Gewebspräferenzen aufweisen. Die stärkste Expression aller Faktoren erfolgt in der Skelettmuskulatur, im Gehirn und im Herz. Vor allem MEF-2A und MEF-2C kommen im Herzen vor⁸³³⁻⁸³⁵. MEF-2C wird an den beiden Aminosäuren Thr293 und Thr300 durch p38-MAPKs phosphoryliert, ERK 5 bedingt eine Phosphorylierung an Ser387, sodass man auch hier verschiedene Aktivierungsschritte des Transkriptionsfaktors unterscheiden muss, denn sowohl die zweifache Phosphorylierung durch p38-MAPKs als auch die einfache Phosphorylierung durch ERK 5 ist in diesem Fall ausreichend.

Pollock und Treisman et al. klonierten eine cDNA des MEF2A-Proteins und sahen durch ein erstes Screening humaner Skelettmyozyten des Musculus vastus lateralis eine große Varianz von MEF-2-Bindungssequenzkopien. Die Bindung der MEF-2 DNA-Sequenzen an die Muskelzellen waren vergleichbar der myogenen Helix-loop-Helix Proteine Myogenin oder Myo-D⁸³⁶. Sie bezeichneten die MEF-2-Faktoren daher als Mitglieder der RSRF (related to serum response factor). SRF beschreibt eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die alle eine übereinstimmende Konsensussequenz der DNA-Bindungsdomäne besitzen, zu ihnen gehört auch Elk-1⁶⁷¹⁻⁶⁷³. Der *fos*-Promotor wiederum besitzt ein *cis*-Element, ein "serum response element" (SRE). SRE bindet dann an heterodimere Transkriptionsfaktoren, die die beiden Polypeptide SRF und den "ternary complex factor" (TCF) beeinhaltet. TCF beeinhaltet wiederum die Familie der Ets-Domänen tragenden Transkriptionsfaktoren, zu denen Elk-1 gehört⁶⁷⁹. Somit ist der Kreis der *fos*-Expression geschlossen, in den sowohl SAPKs-, ERKs- und p38-MAPK-vermittelte Aktivierungen mit einfließen⁶⁵⁴.

Untersuchungen von *Adams et al.* zeigten bereits bei der Entwicklung der kardiogenen Zone am Kopfende der Keimscheibe, wo durch Spaltbildung im Mesoderm die hufeisenförmige primäre Perikardhöhle und in ihr aus Splanchnopleura längsorientierte Zellstränge, d.h. Endokardschläuche entstehen, in MEF2A^{-/-} Tieren veränderte Entwicklungsschritte. Mit Abfaltung des Embryos vom Dottersack und als Folge der Längskrümmung, dem Längenwachstum und der Formveränderung können die einzelnen Abschnitte am Herzschlauch immer besser differenziert werden. Unter anderem auch der Ventriculus primitivus, der die Anlage der beiden Herzkammern darstellt. Als erstes Anzeichen der Trennung in eine linke und rechte Kammer wird außen der Sulcus interventricularis sichtbar.

Endokardiale Verdickungen am Canalis atrioventricularis stellen die Vorstufen des Septums dar. Mit zunehmender Ausdehnung der Kammerwand entsteht am Boden des Ventrikels in der Nähe der Herzspitze eine Muskelleiste, die als Septum interventriculare mit konkavem Rand in das Lumen vordringt. Vor allem dieser Vorgang ist bei den MEF-2A defizienten Embryonen nicht zu beobachten. Das Septum verwächst hier nur unzureichend rechts von der Medianebene mit dem hinteren Endokardkissen und das Foramen interventriculare ist stark vergrößert. Das Foramen interventriculare, das normalerweise durch herunterwachsende Leisten des Septum bulbi und durch die Vereinigung der Endokardkissen des Ohrkanals verschlossen wird, bleibt zu einem großen Anteil unverschlossen, sodass eine Öffnung zurückbleibt oder oftmals sogar ein einhöhliges Herz ohne rechten Ventrikel entsteht ⁷⁶⁷.

Die Bildung des AP-1, dem Activator-Protein-1, erfolgt durch ein Zusammenspiel mehrerer Komponenten ^{371,670,693,810}, d.h. mehrerer Transkriptionsfaktoren, die zuvor phosphoryliert werden müssen ⁸³⁷ (Abb. 12). Die Transkriptionsfaktoren c-Jun, c-Fos und ATF-2 besitzen alle Leucin in ihrer Sequenz, wodurch mittels Leucin-Zipper-Verbindungen (c-Jun z.B. AS: 283-311) Dimere, bestehend aus Jun-Jun, Jun-Fos oder Jun-ATF entstehen, die zusammen Bestandteile des Komplexes darstellen. Die SAPKs phosphorylieren c-Jun an den Aminosäuren Ser63 und Ser73. ATF-2 wird durch SAPKs aber auch p38-MAPKs an Thr69 und Ser71 phosphoryliert und somit in den aktiven Zustand überführt ^{754,838}. Jedoch ist die Signaltransduktion insofern zu differenzieren, welcher Stimulus zur Aktivierung der vorgeschalteten Kinase führte. So bewirken z.B. nur die SAPKs eine ATF-2 Aktivierung während der Reperfusionphase einer zuvor ischämischen Niere ⁸³⁹. Dagegen ist die p38-MAPK die vorwiegend aktivierende MAPK von ATF-2 in der Signalantwort einer IL-1 Induktion in Keratinozyten.

AP-1 ist ein wichtiger Transaktivator für eine Vielzahl von "Stress-assoziierten" Genen, zu denen z.B. auch die Gene der Zytokine IL-1 und -2 sowie des TNF zählen. Außerdem wirkt AP-1 als einleitendes Element der Transkription von Proteasen oder von Zell-Adhäsionsmolekülen wie dem E-Selektin, die vor allem in die Zellantwort von Entzündungsprozessen involviert sind ⁸⁴⁰⁻⁸⁴⁴.

4. Myokardiale Ischämie

4.1 Definition und Formen der Ischämie

Myokardiale Ischämie ist ein Zustand verminderter Durchblutung, in dem der reduzierte arterielle Blutfluss das Myokard nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff versorgt, um einen metabolischen Wechsel von aerobem zu anaerobem Stoffwechsel zu verhindern^{845,846}. Man unterscheidet eine regionale bzw. relative Ischämieform von einer absoluten bzw. globalen. Bei einer absoluten Ischämie ist die Blutzufuhr vollständig unterbrochen. Abgesehen von experimentell bedingten Ischämiezuständen ist sie bei herzchirurgischen korrektiven Eingriffen von Bedeutung. Die relative Ischämie unterscheidet sich grundsätzlich von der absoluten darin, dass das regional ischämische Gebiet von einem gut perfundierten, im Falle des Herzens kontrahierenden Gewebe umgeben ist. Bei Organen, wo eine kollaterale Gefäßversorgung gewährleistet, dass das regional ischämische Gebiet zum Teil mitversorgt wird, reicht die relativ vorhandene Blutzufuhr aus (20% der normalen Blutzufuhr), um das Organ im Ruhezustand zu versorgen. Im Zustand besonderer Anstrengung und Funktionsleistung ist die Blutzufuhr jedoch zu wenig. Es entsteht der Zustand einer manifesten Mangelversorgung mit Ausfallserscheinungen und folgender reversibler oder irreversibler Schädigung des Gewebes. Das Myokard besitzt je nach Spezies ein verschieden gut ausgeprägtes Kollateralnetzwerk. Des Weiteren reagiert es auch in der Situation von O₂-Mangel auf Depolarisation mit dem "Alles-oder-Nichts-Gesetz", d.h. die Unfähigkeit des menschlichen Myokards, seinen Energieverbrauch der aktuellen Versorgung anzupassen, nimmt neben der energetischen Erschöpfung und der geringen Kollateralisierung eine der Schlüsselrollen in der Faktorenliste einer folgenden Infarktentstehung ein^{2,847-849}.

4.2. Energetischer Myokardstoffwechsel unter physiologischen Bedingungen

Normalerweise bezieht die Herzmuskelzelle ihre Energie über aerobe Stoffwechselvorgänge⁸⁵⁰. Hierbei werden Glukose und Fettsäuren in den Mitochondrien oxidativ abgebaut und dienen der Synthese von ATP aus ADP und Phosphat⁸⁵¹. Ein „Kreatin-Phosphat-Shuttle“ transportiert in folgenden Schritten ATP in die Peripherie der Zelle, wo es in verschiedensten Vorgängen verbraucht wird^{852,853}.

4.3. Energetischer Myokardstoffwechsel unter ischämischen Bedingungen

Das Stadium zu Beginn einer Ischämie wird als anoxische Phase bezeichnet. Innerhalb von 10-15 Sekunden nach Verschluss eines Gefäßes kommt es zu einer Absenkung des pO_2 im Gewebe. Die Atmung der Mitochondrien wird behindert und die Myozyten beginnen die anaerobe Glykolyse als Hauptlieferant für neue hoch-energetische Phosphate zu nutzen⁸⁵⁴. Als Konsequenz sinkt der zelluläre Glykogenspiegel. In Abwesenheit von Sauerstoff kommt es zu einer Vervierfachung der Milchsäurekonzentration und der intrazelluläre pH-Wert fällt massiv ab. Auch die Kontraktilität stoppt bei Ischämie innerhalb dieser ersten Sekunden⁸⁵⁵. Trotz der Veränderungen sind die Herzmuskelzellen noch immer lebensfähig. Sie befinden sich zu diesem Zeitpunkt in einer sogenannten "Toleranzphase". Wird innerhalb dieser Phase das Gewebe reperfundiert, ist normalerweise kein bleibender Schaden vorhanden und man spricht lediglich von der reversiblen Schädigung einer Zelle^{856,857}.

Unter fortschreitender Verminderung der Myofibrillenkontraktionen sind jedoch unter diesen Bedingungen die Bestände des Herzmuskels an energiereichen Phosphaten, wie Phosphokreatin und ATP vor allem in den Mitochondrien (Sitz der Na^+/K^+ -ATPase, Ca^{2+} -ATPase,..) drastisch vermindert^{850,858}. Akkumulierende ADP-Reste werden vollständig über die Adenylatkinasereaktion zu AMP abgebaut, welches wiederum zu Adenosin und Inosin katabolisiert wird. Adenosin und Inosin treten aus der Zelle aus und verursachen durch Phosphatabspaltung von Adeninnukleotiden und Kreatinphosphaten einen signifikant ansteigenden osmotischen Druck und einen irreversiblen Verlust von Nukleotid-Nukleosid-Strukturen⁸⁵⁹. Dauert die Anoxie länger als 30 min an und ist zu Beginn der Reperfusion, d.h. zum Zeitpunkt der postischämischen Phase in den Mitochondrien zu wenig ADP vorhanden, kann eine Wiederbelebung des Energiehaushaltes der Myokardzelle unmöglich werden⁸⁶⁰.

4.4. Osmolalität während der Ischämie

Das Sistieren des Milchsäureabbaus im Herzmuskel bei O_2 -Mangel und die weitere Anhäufung von metabolischen Endprodukten, wie den freien Fettsäuren und Glycerol, verursachen einen Anstieg des intrazellulären osmotischen Drucks⁸⁶⁰. Auch die Veränderungen des Ionengleichgewichtes durch starken K^+ -Ionen Efflux und konstanter intrazellulärer Na^+ -Konzentration der ersten ischämischen Phase spielt eine entscheidende Rolle in der zellulären Osmolaritätsregulation⁸⁶¹. In der folgenden Ischämiephase bedingt ein vermehrter Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle eine Gegenregulation durch den Na^+/H^+ -Protonenaustauscher. Die über diesen

Mechanismus eingeflossenen Na^+ -Ionen aktivieren anschließend die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher⁸⁶². Der konstante Konzentrationsanstieg kulminiert schließlich in einer Osmolalität von 100-120 mosmol/l⁸⁶³. Es kommt zum vermehrten Wassereinstrom in das Zellinnere. Hinzu kommen weitere Schäden durch die Aktivierung von Ca^{2+} -sensitiven Phospholipasen und Proteasen^{864,865}. Es beginnt der irreversible Vorgang der Zellschwellung, d.h. ein Zellödem bewirkt eine massive Zellmembranschädigung, die bei energetisch erschöpften Zellen unweigerlich zur Ruptur führt⁸⁶⁶. Nun ist der "point-of-no-return" (Punkt ohne Wieder-/Rückkehr) erreicht. Die irreversible Schädigung der Zelle verhindert sowohl metabolische wie auch strukturelle Regeneration der Zelle durch Gewebsreperfusion. Die zerstörte Zellmembran führt zum Verlust von ATP, zur Hemmung der Glykolyse und zur Akkumulation von Kataboliten^{847,867,868}. Die steigende Antigenität durch Zellbruchstücke und eine hohe Ammoniakkonzentration aktivieren mehr und mehr die zelluläre Abwehr (chemotaktischer Reiz der Ammoniumionen nach Adenosindesaminierung). Es beginnt die Phagozytose der nekrotischen Zellen durch Leukozyten^{864,865,869,870}.

4.5. Weitere Indikatoren einer irreversibel geschädigten Myokardzelle

Weitere Parameter des beginnenden Zelltodes sind der Verlust der Zelle, Nukleotidsynthese durchzuführen, d.h. die Synthese von t- und mRNA kommt zum Erliegen. RNA-spaltende Enzyme (5-Nukleotidase), welche bei geringstem Energieangebot noch funktionsfähig bleiben, zeigen weiterhin Aktivität, sodass es zur endogenen und exogenen Proteolyse der energieverarmten und energetisch unausgeglichenen Zelle kommt. Des weiteren kommt es zu einer Zunahme des Katecholaminspiegels im Zytoplasma⁸⁷¹. Dies führt zu einer gesteigerten NoradrenalinKonzentration im extrazellulären Raum. Die Gabe von β -Rezeptorblockern zeigte nur geringe therapeutische Erfolge, da sie die Katecholamine nicht von den Rezeptorbindungsstellen verdrängen können und sie nur unzureichend in das ischämische Gebiet gelangen⁹. Sekundäre präventive Gabe von Betablockern vor einem Koronarverschluss verminderte ebenfalls nicht die Inzidenz einer Infarktstehung^{2,848}.

5. Reperfusion

5.1. Definition

Unter Reperfusion versteht man den wiedereinsetzenden arteriellen Blutfluss in ein zuvor ischämisches Gebiet. Meist geschieht dies durch Wiederherstellung des Lumens des okkludierten Gefäßes. Sie ist die Voraussetzung zur Erholung des Gewebes vom ischämischen Schaden. Keine Medikation konnte die Reperfusion in ihrer Fähigkeit der Verhinderung bzw. Verminderung der Infarktentstehung ersetzen, wenn vorhanden, konnte sie evtl. potenziert werden⁸⁷². Daher war und ist die Thrombolyse, die letztendlich eine Reperfusion ermöglicht, nach wie vor die zuerst durchzuführende Therapie eines akuten Herzinfarktes⁸⁷³.

5.2. Energetischer und osmotischer Zustand während der Reperfusion

Die erneute Sauerstoffversorgung des Gewebes reaktiviert die oxidative Phosphorylierung in den reversibel geschädigten Myozyten. Schon während der ersten drei Minuten rephosphorylieren die Mitochondrien das im Gewebe akkumulierte AMP und ADP zu ATP⁸⁵⁸. Die endgültige Auffüllung des durch Ischämie signifikant verringerten Adenosin-Nukleotid-Energiereservoirs erfolgt in den folgenden vier Tagen durch langsame Reifungsprozesse der Adenosin-Vorläufer des Myokards⁸⁷⁴. Die Reperfusion bedingt bei Zellen mit reversibler Schädigung ein relativ schnelles Abpumpen von Wasser und Elektrolyten. Es kommt zu einem Herauswaschen der Glykolysezwischenprodukte und deren Metabolisierung zu CO₂ und H₂O. Die Mitochondrienschwellungen gehen zurück und die intrazellulären K⁺-Konzentrationen steigen auf präischämische Werte an. In diesen Verlauf der Reperfusion ist die Einbindung des Natrium-Protonen-Austauschers (Na⁺/H⁺-Exchanger, NHE) und dessen intrazelluläre Signalweitergabe zu berücksichtigen. Der in der Ischämie und Reperfusion aktivierte NHE tauscht intrazelluläre Protonen gegen extrazelluläre Natriumionen. Da der intrazelluläre pH-Wert während der Ischämie dramatisch absinkt, tauscht der aktivierte NHE, Na⁺ mit H⁺ in einem Verhältnis von 1:1 aus, sodass Na⁺ vermehrt in den intrazellulären Raum gelangt. Dies führt über eine intrazelluläre Natriumüberladung und die Aktivierung von Natrium-Kalzium-Austauschern zu einer Kalziumüberladung der Kardiomyozyten, insbesondere der Mitochondrien. Nach *Fleckenstein et al.* bedingt die erhöhte intrazelluläre Ca²⁺ Konzentration eine maximale Kontraktion, wodurch alle Energiereserven vorzeitig erschöpft werden. Erregungsleitungsstörungen und Arrhythmien sind die oft lebensbedrohlichen Folgen dieses Zeitabschnittes der Reperfusion⁸⁷⁵.

5.3. Reperfusionsschäden

Die Frage nach der Existenz eines Reperfusionsschadens ist noch immer nicht endgültig beantwortet. Klassischerweise unterteilt man die Reperfusionsschäden in das myokardiale Stunning, die Reperfusionarrhythmien und die letalen Reperfusionsschäden. Zu beachten sind die Zeitspanne bis zum Reperfusionbeginn sowie die Existenz verschiedener Reperfusionsschadensproblematiken. Reperfusionarrhythmien, bedingt durch ein schnelles Auswaschen des extrazellulären K^+ und einen schnellen Einstrom von Na^+ in die noch energetisch unterversorgte Zelle sind stets zu beobachten. Diese Arrhythmien entstehen jedoch im nur reversibel geschädigten Myokard und stellen allein keinen Grund dar, eine irreversible Schädigung des Myokards zu verursachen.

Das Phänomen des letalen Reperfusionsschadens unterscheidet die direkt auftretende Nekrose von der zeitlich verzögerten Apoptose. Der nekrotische Zelltod hat verschiedene Ursachen. Zum einen bewirken die Ca^{2+} - und die O_2 -Zufuhr während der Reperfusion ein zu schnelles Wiedererlangen des Energiepotenzials bei noch zu hohen intrazellulären Kalziumkonzentrationen^{876,877}. Die Zelle wird zu maximalen und kräftigen Hyperkontraktionen animiert, wodurch es zu einer Zerreißen der Myofibrillen-Zellmembran und einer mechanischen Zerstörung des Sarkolems kommen kann⁸⁷⁸⁻⁸⁸⁰. Zum anderen gelangt durch den wiedereinsetzenden Blutfluss saures Blut in den Gesamtkreislauf und der Zustand einer metabolischen Azidose entsteht. Des weiteren strömt Kalium aus dem intrazellulären in den extrazellulären Raum, die Folge ist eine Hyperkaliämie⁸⁸¹. Durch den Myoglobinaustritt aus den toten Muskelzellen kommt es bei größeren Mengen zu Ausfällungen im Tubulussystem der Niere und ein Nierenversagen kann die Folge sein⁸⁸¹. Die eigentliche Rolle des apoptotischen Zelluntergangs während der Reperfusion wird noch kontrovers diskutiert und daher in vermehrtem Maße in einigen Arbeiten des MPI Bad Nauheims untersucht⁸⁸²⁻⁸⁸⁴. Beispielfhaft zeigten die Untersuchungen von *Parks* und *Granger et al.* an einem Katzenmodell, dass nach vier Stunden Ischämie das Gewebe weniger stark geschädigt war, als nach drei Stunden Ischämie plus gefolger Reperfusion von einer Stunde⁸⁸⁵.

Durch die Biopsieentnahmen zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Experiments, wobei Entnahmen auch während der Reperfusion durchgeführt wurden, konnten die Veränderungen der Aktivitätszustände der MAPKs-Proteine ebenfalls während dieses Zustands untersucht werden.

6. Myokardiales Stunning

Das „myokardial stunning“ beschreibt den Zustand anhaltender Dysfunktion der Zelle während der Reperfusion. Bereits nach kurzen Verschlüssen tritt der Effekt auf und äußert sich in einer länger andauernden (bis ca. 48 Stunden), regional begrenzten, reversiblen kontraktilen Dysfunktion des zuvor ischämischen Myokards^{1,886,887}. Bei einigen reversibel geschädigten Zellen bleibt trotz des relativ schnellen Abpumpens des angesammelten Wassers und der Elektrolyte ein intrazelluläres Ödem noch über mehrere Stunden nach Reperfusionseintritt bestehen⁸⁸⁸. Als Ursache des Phänomens werden unter anderem folgende zellulären Mechanismen diskutiert: 1) Störung der Kalziumhomeostase durch die Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger Proteasen⁸⁸⁹, 2) Anstieg der freien Radikale und 3) Schäden am kontraktilen Apparat⁸⁹⁰⁻⁸⁹². Die Myokardzellen sind jedoch nach einiger Zeit wieder in der Lage, sich physiologisch zu kontrahieren. Hierbei sind weder Zellnekrosen, noch licht- und elektronenmikroskopisch nachweisbare Veränderungen des ischämischen reperfundierten Myokards zu erkennen⁸⁹³.

7. Myokardialer Infarkt

Der Myokardinfarkt ist ein durch Koronarinsuffizienz bedingtes „territoriales Mangel-Versorgungsgebiet“ des Herzens. Findet ein ausgedehnter Gewebsuntergang eines ganzen Wandabschnittes statt, so spricht man von einem transmuralen Infarkt. Ist nur ein begrenzter Wandbereich nekrotisiert, so handelt es sich um einen subendokardialen, rudimentären oder auch Teilschichtinfarkt. Die Sterblichkeit beträgt 20-40% und trotz einer Frührehabilitation besteht eine starke Rezidivneigung^{3,16}.

Beim Mensch liegt dem Herzinfarkt in der Regel eine arteriosklerotische Erkrankung der Herzkranzgefäße zugrunde. Das klinische Bild des Myokardinfarktes ist durch unterschiedliche, z.T. stark wechselnde Symptome charakterisiert. In der Mehrzahl der Fälle lässt sich eine Myokardinfarkt-Trias nachweisen: Herz(Thorax)schmerz, Blutdruckabfall und Tachykardie. Für die Diagnose eines frischen Infarktes sind neben typischen Elektrokardiogramm-Veränderungen auch die Konzentrationsveränderungen bestimmter Enzyme im Blutplasma von Bedeutung. Hierzu gehören vor allem die Creatin-Phosphokinase (CK), die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und die Lactat-Dehydrogenase (LDH)⁸⁹⁴.

Histopathologisch betrachtet ist ein Infarkt eine Gewebsnekrose, die im Gefolge schwerer örtlicher arterieller Durchblutungsstörung entsteht. Man unterscheidet

verschiedene Manifestationsformen, einen weißen / anämischen Infarkt von einem roten / hämorrhagischen Infarkt. Aufgrund der entsprechenden arteriellen Blutgefäßversorgung im Herzen, d.h. durch das Vorhandensein funktioneller Endarterien, kommt es hier zum anämischen Infarkt⁸⁹⁵. Dieser Infarkttyp entsteht durch eine dauerhafte, vollständige Verlegung der Endarterie. Ebenfalls ist diese Infarktform in der Niere, in der Milz oder im Gehirn zu beobachten. In seiner Form ist er meist kegelförmig und breitet sich von subendokardial nach subepikardial aus. Hierfür ist die unterschiedliche Latenz der betroffenen Myokardregionen verantwortlich. Um das Infarktareal befindet sich oftmals eine hämorrhagische Randzone (ischemic border zone). Der zentrale Bereich des Infarktes stellt eine homogene Koagulationsnekrose dar, in seiner Peripherie schließt sich ein Ödem an^{15,16}.

Die angesprochenen Determinanten der Infarktentstehung sollen hier in ihren einzelnen Auswirkungen dargestellt werden:

- 1) Die **Größe des Versorgungsgebietes** der verschlossenen Gefäße. Die Relation, dass der Verschluss einer großen Arterie zu einem größeren Infarkt führt, als der Verschluss eines kleineren Gefäßes muss zuerst durch den Vergleich der den Gefäßen zugrunde liegenden relativen Gewebsperfusionszonen geprüft werden. Es hat sich gezeigt, dass unter Einbeziehung der Bezugsgrößen Durchmesser des Gefäßes, transportierte Blutmenge, Anzahl der existierenden Kollateralgefäße und Größe des perfundierenden Areals, die Infarkte nach Verschluss eines großen Gefäßes relativ größer sind, als die nach Verschluss eines kleineren. Grund dafür sind zum einen die hämodynamisch ungünstigen Verhältnisse in großen Infarktgebieten und zum anderen die relativ günstige Restdurchblutung von kleineren ischämischen Gebieten⁸⁵².
- 2) Die **Verschlussdauer** steht in enger Abhängigkeit zu einer weiteren Determinante, der **Kollateraldurchblutung**⁸⁹⁶. Man kann daher nie eine feste Zeitgrenze wählen, die auch innerhalb einer Spezies zum gleichen Ausmaß des Verschlusses führt. Der Mensch nimmt im Vergleich zu verschiedenen Tierarten eine gemäßigte Stellung ein, d.h. werden in einer Grafik Verschlussdauer gegen Infarktgröße aufgetragen, so nimmt die Kurve des Menschen nahezu einen gradlinigen Verlauf, die ihren Endpunkt bei fünf Stunden Verschlussdauer und einer Infarktgröße von ca. 80% der ischämischen Zone erreicht^{897,898}. Selbst der Vergleich zwischen verschiedenen Nagetieren zeigt große Unterschiede, so ist es am Herzen des Meerschweinchens, welches ein gut ausgeprägtes Kollateralnetzwerk besitzt, geradezu unmöglich, einen Infarkt durch Koronarverschluss zu erzeugen. Das Kaninchen und die Ratte dagegen weisen schon nach einer Verschlusszeit von einer halben Stunde maximale Infarktgrößen von 100% auf. Das Schwein und der Hund zeigen einen steilen

Anstieg nach der ersten halben Stunde⁸⁹⁹. Überschreitet die Dauer des Verschlusses jedoch die Zeit von 1,5 Stunden, so ist die erreichte Infarktgröße beim Schwein von 90% und beim Hund ca. 60% auch nach weiteren vier Stunden kaum zu steigern^{900,901}.

8. Nekrose

8.1. Definition, Ursache und Vorkommen der Nekrose

Die Nekrose wird durch zellschädigende, unphysiologische externe Einwirkungen, wie Hypoxie, Hitze, Viren, Bakterien, mechanische Noxen (Druck), membran-schädigende Gifte (Säureverätzungen) oder auch Strahlungen ausgelöst. Sie wird als der intravitale, passive und energieunabhängige Zelltod bezeichnet⁹⁰². Typischerweise wird die Nekrose durch Prozesse während der Ischämie ausgelöst und folgt dem eigentlichen Zelltod. Bemühungen, den Zustand des Zelltodes während der Ischämie durch Schwellung (griech. onkos; Onkose) zu beschreiben, setzten sich jedoch nicht durch⁹⁰³.

Nekrose führt zum Erlöschen aller Zellfunktionen, eingeschlossen der Energiebildung und Synthesefähigkeit. Durch die Einstellung der Energiebildung, d.h. der oxidativen Phosphorylierung und die Umstellung auf anaerobe Glykolyse, verschiebt sich der pH-Wert der Zelle, durch die Anreicherung von Laktat in den sauren Bereich. Gekennzeichnet ist die Nekrose durch Zytoplasmaschädigung, Zellhydrops mit Mitochondrienschwellung und der Auflösung aller Membransysteme. Der Glykogengehalt der Zelle nimmt stark ab und es zeigen sich Fettphanerosen. Der Kern zeigt Wandhyperchromasie, ist pyknotisch oder durch Karyorrhesis oder Karyolyse gekennzeichnet. Durch die einsetzenden Membrandefekte ist die Zelle nicht mehr in der Lage, ihren Elektrolythaushalt zu kontrollieren, sodass Kalzium- und Natriumionen in das Zellinnere einströmen. Die Konzentrationsverschiebung bewirkt ein Anschwellen der Zelle bis zur Membranruptur. Dadurch dringen auch lysosomale Hydrolasen (Proteasen) nach außen, die chemotaktische Wirkung auf Entzündungszellen besitzen⁹⁰⁴. Die Nekrose betrifft meist einen gesamten Zellverband, Einzelzellnekrosen sind dagegen seltener. Zellnekrose kann an allen Zellen beobachtet werden, jedoch zeigen Zellen mit hohem Energiebedarf, wie die Herzmuskelzelle eine höhere Inzidenz zur Entstehung der Nekrose als Zellen mit ruhender oder geringer Stoffwechselleistung, wie z.B. Fibrozyten. Ein nekrotisch gewordenes Zellgebiet wird durch eine Entzündungsreaktion abgegrenzt. Mediatoren dieses Abgrenzungs- und Reparaturvorgangs sind vor allem Prostaglandine, die hyperämisierend und

chemotaktisch auf Granulozyten und zusätzlich pyrogen wirken. Eine narbige Organisation der Nekrose kann nach Auflösung granulozytärer Hydrolasen, Resorption durch Makrophagen und lymphogenem Abtransport ausheilen. Ist diese Organisation nicht möglich, so geschieht entweder eine bindegewebige, abgekapselte Demarkation des nekrotischen Gebietes, die nach und nach organisiert wird oder als Sequester abgelöst in der Kapsel eingeschlossen bleibt^{903,905}.

9. Apoptose

9.1. Definition, Ursache und Vorkommen der Apoptose

Unter Apoptose versteht man den Untergang einer Zelle, indem sie den aktiven, energiekonsumierenden Prozess eines genetisch gesteuerten und programmierten Zelltodes durchläuft. Dieser physiologisch bedeutsame Prozess ist erstmalig von *Flemming et al.* im Jahre 1885 an Säugetierfollikeln beobachtet worden⁹⁰⁶. Es sind eine ganze Reihe von exogenen und endogenen Substanzen gefunden worden, die in einer Zelle Apoptose induzieren können. Hormone und Toxine sowie Bakterientoxine oder antigene Chemotherapeutika zählen zu diesen auslösenden Faktoren. Aufgrund des aktiven Prozesses, der der Apoptose zugrunde liegt, muss sich das Energieniveau der Zelle noch auf einer ausreichend hohen Stufe befinden, welches zulässt, ATP-Reserven zu verbrauchen. Je nachdem welche Funktion eine Zelle besitzt, reagiert sie mit unterschiedlicher Empfindlichkeit auf ein Apoptosesignal^{907,908}. Zellen des Blutsystems bedürfen nur eines schwachen Signals, um die Apoptosekaskade zu starten. Zelltypen des Nervensystems oder des Herzen, die nicht regeneriert werden können, bedürfen dagegen eines sehr starken Signals zur Aktivierung der Apoptose⁹⁰⁹.

Schon in den 80-iger Jahren wurden Experimente durchgeführt, in denen mittels Ischämie Nekrose induziert wurde⁸⁶⁷. Erst zu einem späteren Zeitpunkt wurde deutlich, dass Ischämie auch Apoptose auslösen kann⁹¹⁰. In verschiedenen Arbeiten, vor allem am Nervensystem und Gehirn, aber auch am Herzen wurde dieser Zustand beschrieben⁹¹¹. Es herrschte die Diskussion darüber, ob Ischämie alleine Apoptose auslösen kann oder ob Apoptose nur in Verbindung mit Reperfusion zu beobachten ist⁹¹². Physiologisch fungiert die Apoptose als Gegenspieler der Proliferation und spielt in der embryonalen Entwicklung in Form von Rückbildungsschritten eine große Rolle⁹¹³. Bei verschiedenen Erkrankungen durch irreguläre Hemmung oder Stimulation der Apoptose der Zellen kann sie jedoch auch lebensbedrohliche Leiden verursachen⁹¹⁴. Morphologisch erkennt man bei

apoptischen Zellen: Fragmente im Zytoplasma, Erhöhung der Zytoplasmadichte, Zellschrumpfung / keine Schwellung, Chromatin-Kondensation mit Ansammlung am Rande der Kernmembran und Fragmentierung der DNA. Im weiteren Verlauf löst sich die Zelle aus ihrer Umgebung und es erfolgt Karyorrhexis. Schließlich zerfällt die Zelle in eine Vielzahl kleiner membranumhüllter Körperchen (apoptotic bodies), die ohne beginnende Entzündungsreaktion von den Nachbarzellen phagozytiert werden⁹¹⁵. Apoptose ist zumeist an Einzelzellen zu beobachten. Für das Entstehen der Apoptose nach Ischämie gibt es unterschiedliche Erklärungsmodelle, zum einen kann sie durch Sauerstoffradikale induziert werden. Produziert durch das Enzym Xanthinoxidase, erzeugen diese Zellmembranschädigungen durch Lipidperoxidation. Zum anderen stellt die Ca^{2+} -Überladung der Zelle ein Startsignal des Apoptosemechanismus dar. Durch die vorhandene Schädigung der Membran und der folgenden Blockade der Membranrezeptoren kann das gestartete Programm der Zellzerstörung ihren Lauf nehmen, ohne gestoppt zu werden.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Allgemeine Chemikalien und Lösungsmittel

Soweit es in der Ausführung nicht besonders erwähnt wird, wurden alle verwendeten Lösungsmittel und Chemikalien in p.A.-Qualität (d.h. von höchstem Reinheitsgrad) bezogen. Die Auflistung der im Einzelnen verwendeten Chemikalien erfolgt unter den jeweiligen Abschnitten und wird im Anhang im Speziellen aufgeführt.

2. Besondere Reagenzien zur Tiermedikation

2.1. Narkotikaherstellung

2.1.1. Material

α -Chloralose (1,2-O-(2,2,2-trichloroethylidene)- α -D-glucofuranose), Anästhetikum, von Sigma, Deisenhofen

Borax Natriumtetraborat, Lösungsmittel der α -Chloralose, von Sigma, Deisenhofen

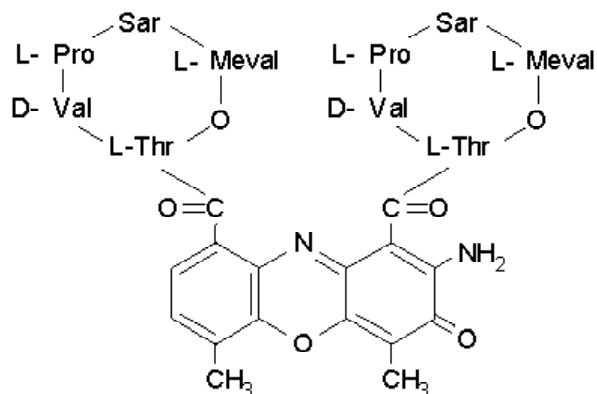
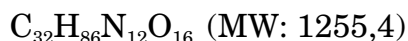
2.1.2. Methode

12 g α -Chloralose und 8 g Borax wurden in 200 ml physiologischer Kochsalzlösung auf dem Magnetrührgerät bei 90°C gelöst. Es entstand eine gelblich trübe Lösung. Da beim Lösungsvorgang auch immer β -Isomere der Chloralose entstehen, diese jedoch in ihrer narkotischen Wirkung minder potent sind, wurde die auf 50°C heruntergekühlte Lösung durch einen Mikrofilter abfiltriert, sodass eine klare, hellgelbe Lösung entstand, die keine β -Isomere mehr enthielt. Das Narkosemittel wurde während des gesamten Versuchsablaufes auf eine Temperatur von 50°C erwärmt und nach Bedarf nur in geringer Menge in den Perfusor eingefüllt^{916,917}.

2.2. Besondere Reagenzien zur systemischen und intramyokardialen Applikation am Tiermodell

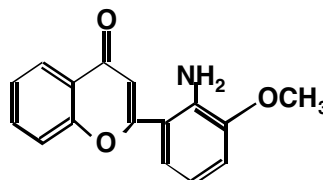
Actinomycin-D

Actinomycin IV; Actinomycin C₁,
von Sigma RBI, Deisenhofen.



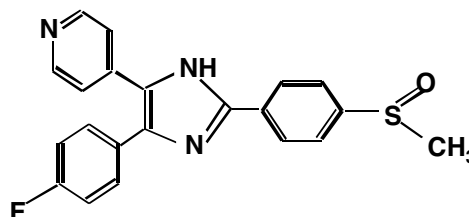
PD98059

2-(2-Amino-3-methoxyphenyl)-
4H-1-benzopyran-4-one
(MEK-1/2 Inhibitor), von Sigma
RBI, Deisenhofen.



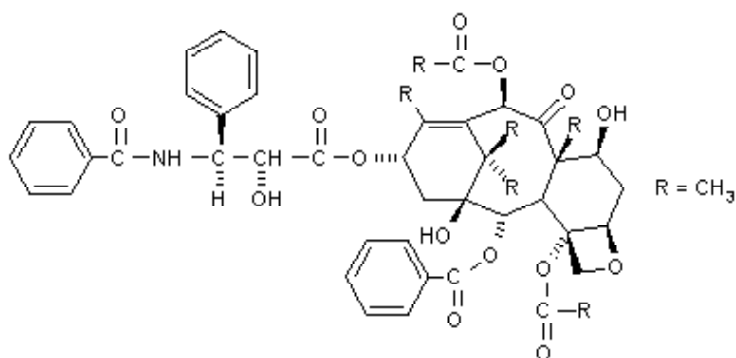
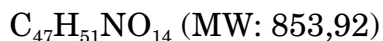
SB203580

4-(4-fluorophenyl)-2-[4-(8-methyl-
sulfinyl)phenyl]-5-(4-pyridyl)
imidazole], spezifischer Inhibitor
der p38-MAPK, von Alexis
Biochemicals, Grünberg.



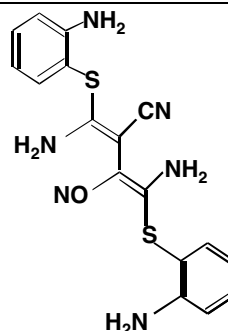
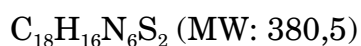
Taxol

Baccatin III; N-benzyl-
phenylisoserine Ester, Synonym:
Paclitaxel; von Sigma, RBI,
Deisenhofen.



UO126

1,4-Diamino-2,3-Dicyano-1,4 bis
(2-Aminophenyl-Thio) Butadiene,
ERK-1/2-Inhibitor) von Alexis
Biochemicals, Grünberg



2.3. Herstellung der Testsubstanzlösungen

2.3.1. Material

Die unter Abschnitt 2.2. genannten Wirkstoffe wurden hier verwendet. Zusätzlich benutzten wir Dimethyl-Sulfoxide (DMSO) von Sigma, Deisenhofen und Krebs-Henselleit-Puffer, um die Substanzen zu lösen und schließlich in die Endverdünnung zu überführen.

Krebs-Henselleit-Puffer:	110,0 mM	NaCl
	2,6 mM	KCl
	1,2 mM	KH ₂ PO ₄
	1,2 mM	MgSO ₄
	10,0 mM	HEPES
	110,0 mM	Glukose

2.3.2. Methode

Verschiedene Konzentrationen bei mikroinfusierender Gabe

Actinomycin-D, PD98059, SB203580, Taxol und UO126 wurden in folgenden Potenzen verabreicht.

- **Actinomycin-D:** 12,5 μ M; 25 μ M und 50 μ M
- **PD98059:** 6,25 μ M; 12,5 μ M; 25 μ M und 50 μ M
- **SB203580:** 40 nM
- **UO126:** 50 nM; 50 μ M und 50 mM
- **Taxol:** 50 nM und 100 nM

Die Ausgangslösungen wurden durch das Lösen von 1 mg der Substanz in 1 ml DMSO hergestellt und in 20 μ l Einzeldosen bei -20°C eingefroren. Die weitere Verdünnung erfolgte in 10 ml Krebs-Henselleit-Puffer (KHB). In der Endverdünnung war maximal eine Konzentration von 0,1% DMSO enthalten.

Dosierung bei systemischer (intravenöser) Gabe

Actinomycin-D, SB203580, Taxol und UO126 wurden systemisch verabreicht. Auch hier erfolgte zuerst ein Lösen in DMSO.

- **Actinomycin-D** wurde in einer Dosierung von 0,12 mg und 0,05 mg/kg KGW gegeben. Das Lösen der gesamten Menge in 0,1 ml DMSO war möglich. Daraufhin wurde auf das Volumen von 50 ml mit KHB aufgefüllt.

- **SB203580** wurde in einer Dosierung von 0,17 mg/ kg KGW infundiert. Die Menge wurde in 0,1 ml DMSO gelöst. Des weiteren wurde wie unter Actinomycin-D-Angaben verfahren.
- **Taxol** wurde in einer Dosierung von 0,17 mg/ kg KGW verabreicht. Das Lösen erfolgte zuerst auch in DMSO und in der weiteren Verdünnung mit KHB.
- **UO126** wurde in einer Dosierung von 0,25 mg, 0,22 mg oder 0,12 mg/kg KGW appliziert. Die Menge wurde in 0,1 ml DMSO gelöst und wie unter Actinomycin-D-Angaben weiterverdünnt.

3. Tiermodell

Es wurde ein *in vivo* Modell der regionalen Ischämie durchgeführt. An anästhesierten, beatmeten Schweinen wurde nach midsternaler Thorakotomie durch Okklusion der linken Koronararterie ein Vorderwandinfarkt induziert.

Die Studie des hier beschriebenen Tierexperiments sowie die Versuchsdurchführung erfolgte nach Prüfung und Genehmigung durch das bioethische Komitee des Veterinärdezernats des Regierungspräsidiums Darmstadt. Alle Tiere wurden unter tierschutzrechtlichen Gesichtspunkten gemäß Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. Jahrgang 1998 Teil I, Nr. 30, S: 1106 fff.) ordnungsgemäß behandelt. Die Versuche erfolgten unter Aufsicht des Leiters des Tierversuchsvorhabens, Prof. Dr. med. Dr. h.c. W. Schaper und nach Absprache mit dem Tierschutzbeauftragten und Tierstalleiter Prof. Dr. med. vet. F. Pierau.

3.1. Material

3.1.1. Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche-kastrierte Läufer Schweine der Deutschen Landrasse (DL) mit einem Körpergewicht zwischen 29 kg und 45 kg verwendet. Die Tiere wurden von einem Aufzüchter aus Hungen-Obbornhofen bezogen. Der Bestand ist frei von den meisten wirtschaftlich wichtigen Infektionserregern und wird regelmässig diesbezüglich kontrolliert³⁷. Nach zweiwöchiger Einstellung im institutseigenen Hof wurden die Tiere in den Versuch genommen. Die Tiere wurden in dieser Zeit mit einem Gerstenschrot-Haferkleien-Gemisch zweimal pro Tag gefüttert. Wasser stand den Tieren per Nippeltränke zur freien Verfügung. Der Transport der Tiere zu den Versuchsräumlichkeiten dauerte ca. 10 min und erfolgte

in Rolltransportboxen in einem Autoanhänger. Eine Erholungsphase des Tieres von mindestens einer Stunde wurde eingehalten, bevor die Prämedikation, des Tieres, erfolgte. Eine Kontrolle der rektalen Körpertemperatur wurde vor Versuchsbeginn durchgeführt. Tiere mit einer Körpertemperatur von über 39,5°C wurden nicht in den Versuch genommen.

3.1.2. Medikamente

Piritramid wurde von Janssen Pharmaceutica (Meckenheim) bezogen. Ketamin wurde bei Medistar GmbH (Holzwickede) bezogen. Die Lieferung von Heparin 25000 erfolgte durch Roche (Grenzach-Wyhlen). Natriumbikarbonat- und Natriumchlorid-Infusionslösung (0,9%) wurde von B. Braun (Melsungen) bezogen.

3.1.3. Operationsinstrumente

Siehe Anhang Kapitel VIII, Abschnitt 1..

3.2. Methoden

3.2.1. Prämedikation und Narkose

Die Prämedikation der Versuchstiere erfolgte mit 2 mg/kg KGW Piritramid (Dipidolor®) per intramuskulärer Gabe und individuell mit 20-25 mg/kg KGW Ketamin 10%ig intramuskulär, 30 min vor Versuchsbeginn. Die Vollnarkose wurde mittels Bolusgabe von α -Chloralose 25 mg/kg KGW und Ketamin 10%ig in einer Dosierung von 15 mg/kg KGW intravenös durch einen Venenverweilkatheter (Vasodrop, 20 G, 1,0 x 0,75 mm) in die Ohrvene eingeleitet. Aufrechterhalten wurde die Narkose durch eine kontinuierliche, intravenöse Dauermedikation von α -Chloralose (25 mg/kg/h). Die Dosierung wurde je nach individueller Verträglichkeit, der Reflexauslösbarkeit und den gegebenen Kreislaufverhältnissen des Versuchstieres variiert.

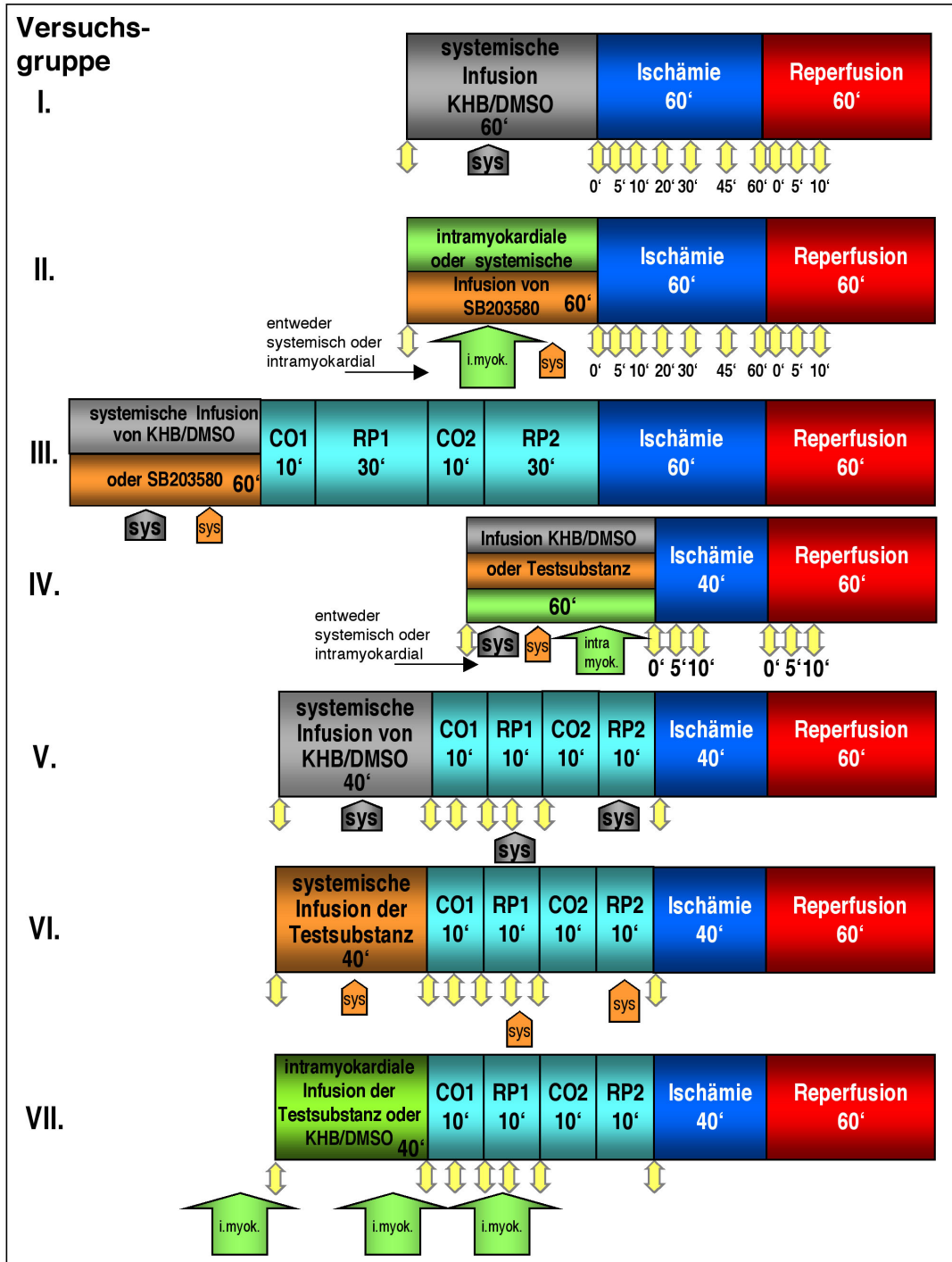
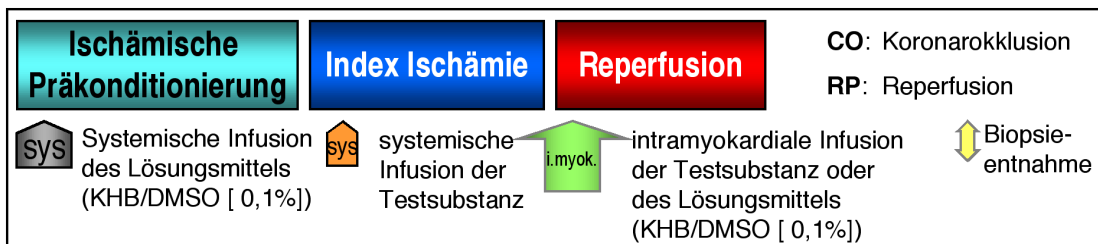


Abb. 13: Darstellung der Versuchsprotokolle der sieben Tierversuchsgruppen.



3.2.2. Operationstechnik

Es erfolgte eine Intubation des Schweines mittels Endotrachealtubus nach Tracheotomie. Anschließend wurden die Tiere an ein pressluftgesteuertes Beatmungsgerät angeschlossen und mit 3 l/min Raumluft und 0,5 l/min Sauerstoff beatmet. Es wurden weitere 0,5 ml Piritramid intravenös appliziert und das Tier mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) über den gesamten Versuchszeitraum infundiert. Unter künstlicher Beatmung wurden im Halsbereich beidseitig die Arteria carotis communis und Vena jugularis interna aufgesucht und freipräpariert. Nach Sektion der V. jugularis interna wurde rechterseits ein zentralvenöser Katheter eingeführt. Über diesen erfolgte die weitere Applikation des Anästhetikums und der isotonischen Elektrolytlösung. Beinhaltete das Versuchsprotokoll die systemische Gabe eines Test-Pharmakons (Abb. 13), musste zusätzlich die linke Jugularvene kanüliert werden und per Katheter erfolgte dann hier die systemische Applikation der zu testenden Substanz.

Nach Präparation der beiden Arteriae carotis, erfolgte die Inzision der linken Arterie und das Einführen eines arteriellen Katheters. Die kanülierte linke Arteria carotis wurde über einen mit 0,9% NaCl gefüllten PVC-Schlauch an einen Statham-transducer angeschlossen und über ein Druckmessgerät somit invasiv der Blutdruckmessung zugänglich gemacht. Es wurden der arterielle und der linksventrikuläre Blutdruck gemessen. Zusätzlich wurden die Tiere an ein EKG-Gerät angeschlossen. Es wurden drei Ableitungen (nach Einthoven) abgeleitet und mit Hilfe eines Laborrechners aufgezeichnet.

Anschließend erfolgte die Eröffnung des Brustkorbes durch eine mediane Sternotomie. Dazu wurden mit einem Elektrokauter die Haut und das Bindegewebe über dem Sternum von der Apertura thoracica bis zum Cartilago xyphoideus durchtrennt, evtl. entstandene Blutungen aus Hautgefäßen wurden mit Hilfe eines Elektrokauters gestillt. Mit einer Schere wurde das Zwerchfell unterhalb des Xyphoidknorpels durchstoßen und mit dem Finger die Pleura thoracalis abgelöst. Mit einer Knochensäge wurde nun das Sternum angesägt und anschließend mit einer Sternumschere in seiner gesamten Länge durchschnitten. Mittels Thoraxspreizer konnte das Brustbein gespreizt werden und der Zugang zu dem darunterliegenden Herz wurde freigegeben. Die Blutungen auf den Schnittflächen des Sternums wurden mittels des Elektrokauters oder mit Knochenwachs verödet. Das Perikard wurde kreuzförmig inzidiert und die entstandenen vier Enden mittels Permahandseide an das subkutane Bindegewebe fixiert. Somit kam das Herz in dieser Aufhängung leicht angehoben zum Liegen.

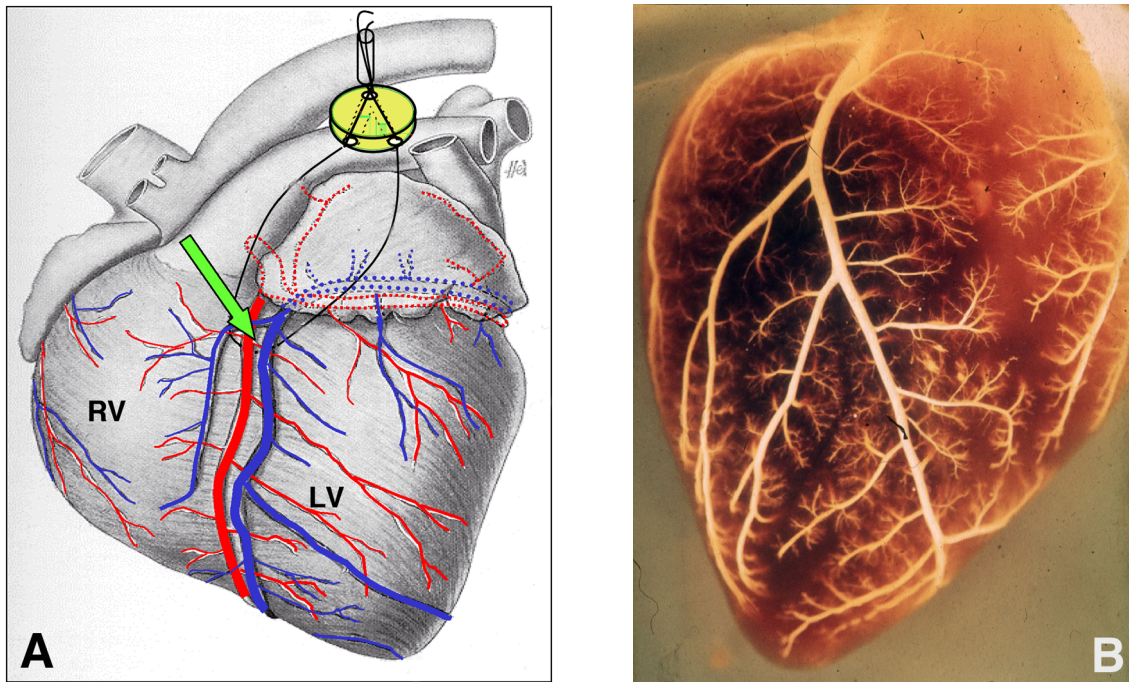


Abb 14:

(A) Schematische Darstellung des Koronargefäßsystems der Facies auricularis eines Schweineherzens (RV: rechter Ventrikel, LV: linker Ventrikel). In der Farbe Rot (gestrichelt) ist die Arteria coronaria sinister sowie ihr Ramus circumflexus eingezeichnet. Gefülltes Rot zeigt den Ramus interventricularis paraconalis (RIP) der Arteria coronaria sinister sowie den proximalen und distalen Kollateralast und die Nebenäste. Das blaugestrichelt dargestellte Gefäß zeigt die Vena cordis magna, die in gefülltem Blau in die Vena interventricularis übergeht und in ihren End- und Begleitästen endet. Der grüne Pfeil zeigt die Lokalisation des Okklusionsmechanismus des RIP mittels Umstechungsnaht und eingefädelttem gelben Knopf. Quelle: modifiziert nach Nickel-Schummer-Seiferle; Anatomie der Haustiere³⁸.

(B) Fotografische Darstellung eines Injektionspräparats der Koronararterien des Schweines nach Befüllung mit Kontrastmittel. Quelle: Schaper et al.¹⁵

Anschließend wurde der Ramus interventricularis paraconalis (RIP) der linken absteigenden Koronararterie aufgesucht und derart präpariert, dass mit einer Umstechungsnaht der Blutfluss gedrosselt werden konnte. Der RIP wurde im proximalen Drittel mit einem Seidenfaden (USP 2-0; 3 metric, Nadel-Fadenkombination, mit 3/8 schneidender Nadel von 2,4 cm Länge und Präzisionsspitze) in einem kreisförmig geführten Bogen umstochen. Auf die beiden Fadenenden wurde ein Plastikknöpfchen aufgefädelt, welches zwei Bohrkanäle aufweist, die auf der Unterseite je eine Öffnung haben und auf der Oberseite in einer gemeinsamen Öffnung münden. Danach wurden etwa vier Zentimeter Infusionsschlauch über die Fäden geschoben. Mittels Arterienklemme wurde nun der Schlauch gegen das Knöpfchen geschoben und dieses damit gegen den RIP gepresst (Abb. 14A, B und 15A-C). Die Koronararterie konnte somit reversibel verschlossen werden, sodass Reperfusionenzyklen den Okklusionsperioden direkt folgen konnten.

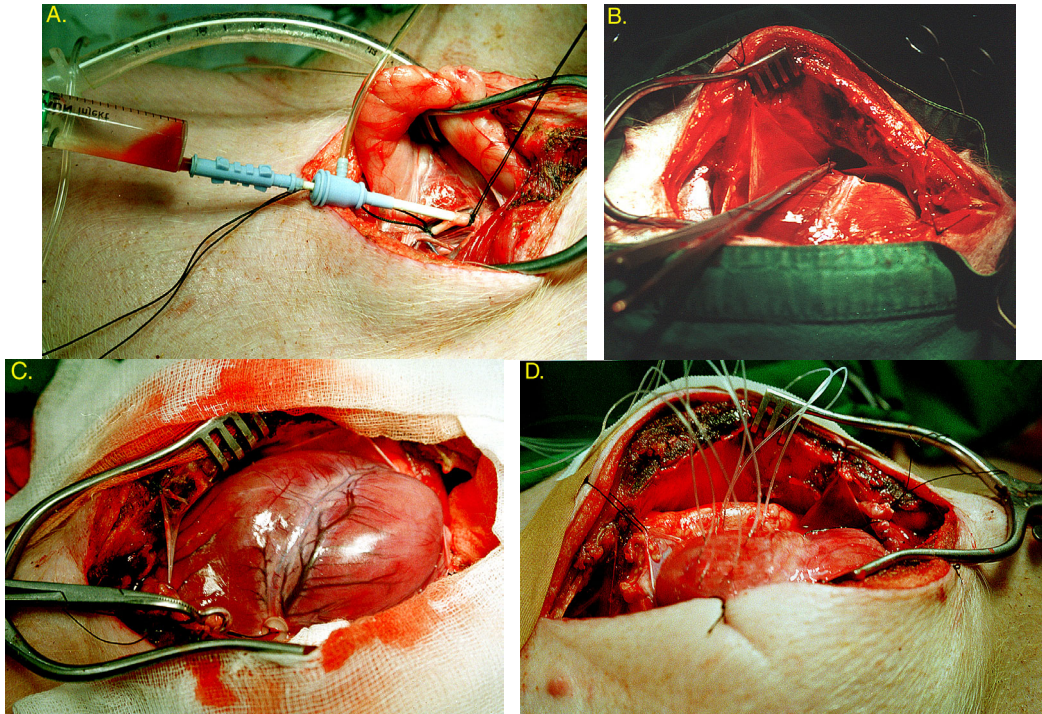


Abb. 15: Fotografien der Versuchsdurchführung. (A) Das Bild zeigt das Einführen und Platzieren des arteriellen Katheters in die linke Arteria carotis. Die Fixation des Katheters erfolgte mittels zweier Seidenfäden am kaudalen Ende des Katheters mit dem Gefäß. (B) die Fotografie zeigt den Vorgang der Umstechung des Ramus interventricularis paraconalis (RIP). (C) das Bild demonstriert den Verschluss des RIP durch das Plastikknöpfchen und den daraufgepressten Plastikschlauch. Deutlich gestaute Gefäße sind zu erkennen. (D) zeigt die lokale Mikroinfusion in das zu erwartende ischämische Myokard. Die Infusion erfolgte mittels acht feiner Nadeln, die mit PVC-Schläuchen verbunden waren und durch eine Mikroinfusionspumpe bestückt wurden.

3.2.3. Lokale Mikroinfusion in das zu erwartende ischämische Myokard

Distal der gesetzten Umstechungsnaht wurden bei Versuchen mit lokaler Mikroinfusion des Pharmakons acht dünne, sehr feine Nadeln (26 gauge) paarweise in das zu erwartende ischämische Myokard (= Risikogebiet [RG]) von basal nach apikal gesetzt. Sie hatten eine Länge von ca. vier mm und reichten vom Epi- zum Endokard. Die Nadeln waren über Infusionsschläuche (non-sterile Polythene Tubing, 0,40 mm ID) an eine Mikropumpe angeschlossen und die zu untersuchenden Substanzen wurden mit einer Fördergeschwindigkeit von 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ für die jeweilig verschieden langen Zeitintervalle (Abb. 12) in das Myokardgewebe infundiert⁹¹⁸ (Abb. 15D und Abb.16). Über drei Nadelpaare erfolgte die Applikation der Substanz, über das vierte basale Nadelpaar wurde nur das Lösungsmittel als Kontrolle infundiert. Die Dauer der Mikroinfusionen war variabel und betrug zwischen 15 und 60 Minuten eines Vorlaufes plus weiterer Gaben innerhalb der Versuchsprotokolle.

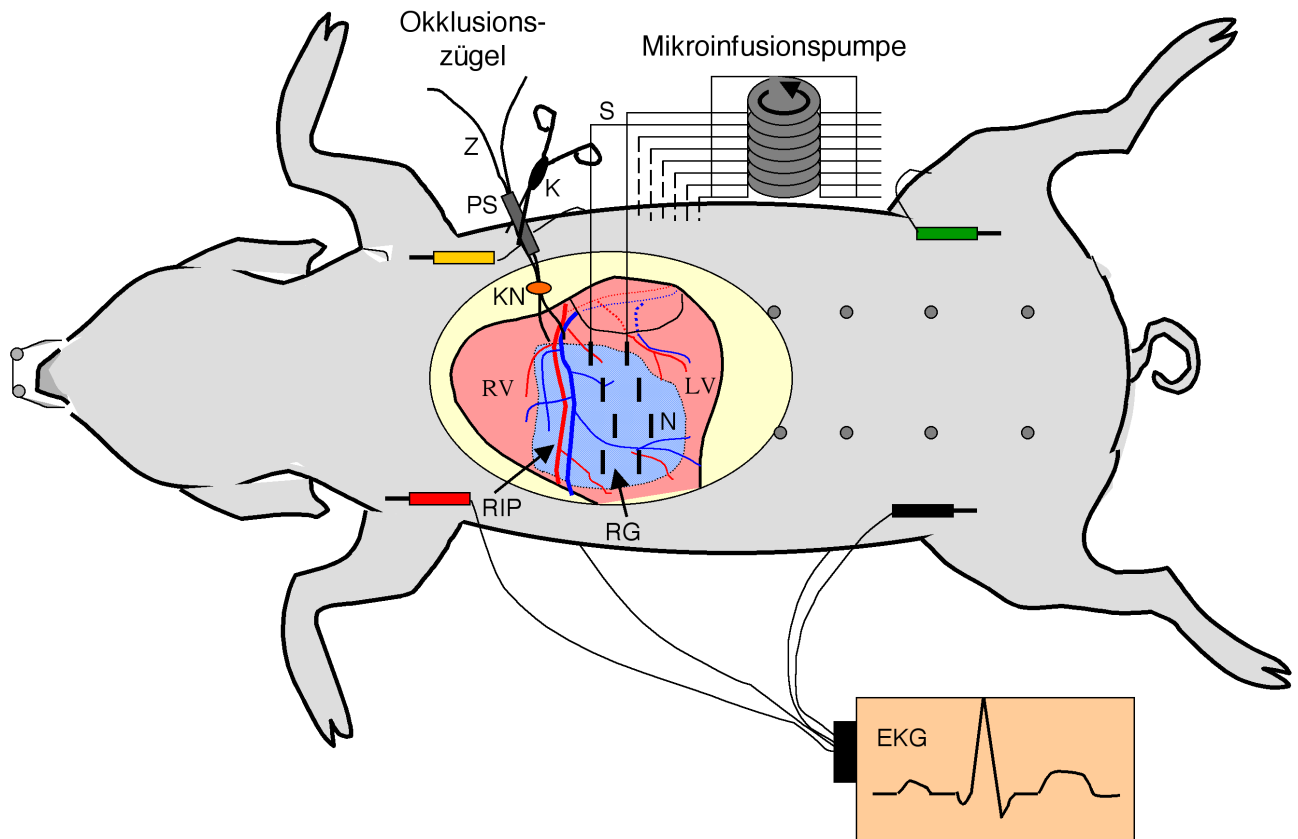


Abb. 16: Schematisierte Ventralansicht eines Schweines nach midsternaler Thorakotomie. Herzschema: **RV**: rechter Ventrikel, **LV**: linker Ventrikel, **RG**: Risiko-Gebiet. Darstellung des Okklusionsmechanismus des Ramus interventricularis paraconalis (RIP): **Z**: Okklusionszügel, **K**: Klemme, **PS**: Plastikschiene, **KN**: Knöpfchen. Darstellung der Mikroinfusionsapparatur: **N**: Mikroinfusionsnadel, **S**: PVC-Mikroinfusionsschläuche. Schema der EKG-Ableitung mit P-Welle, QRS-Komplex und T-Welle.

3.2.4. Versuchsprotokolle

Nach Stabilisierung der gemessenen hämodynamischen Parameter und einer Gabe von 5000 I.E. Heparin wurde mit den Versuchsprotokollen begonnen. Es wurden die unter Tabelle 1 aufgeführten Blutparameter (Tab. 1) in einer arteriellen Blutprobe gemessen und je nach Ergebnis durch Regulation der Beatmung oder evtl. durch die Gabe von Natriumbikarbonat korrigiert.

Tabelle 1: Tabellarische Aufstellung der Normalwerte der arteriell bestimmten Blutparameter des Schweines.

Säure/Base- und Sauerstoff-Parameter	
pH	7,35 - 7,45
pCO ₂ [mmHg]	35 - 45
pO ₂ [mmHg]	75 - 100
CHb [g/dl]	12 - 18
FCOHb [%]	94 - 97
FMetHb [%]	0,0 - 1,5
FHHb [%]	0,0 - 5,0
Elektrolyte [mmol/l]	
Na ⁺	135 - 148
K ⁺	3,5 - 5,3
Ca ⁺⁺	1,15 - 1,40
Cl ⁻	98 - 106

Auf diesen variablen Teil des Versuchsprotokolls folgte bei den Versuchen mit Präkonditionierung entweder ein Präkonditionierungszyklus von zweimalig 10 min Ischämie und 30 min Reperfusion (Präkonditionierungsprotokoll 1) oder 10 min Ischämie und 10 Minuten Reperfusion (Präkonditionierungsprotokoll 2; Abb. 12 und Tab. 2).

Im Anschluss an die zweite Reperfusionsphase der Präkonditionierung wurde durch 40 minütiges oder 60 minütiges Unterbinden des Ramus interventricularis paraconalis (Indexischämie) ein Infarkt gesetzt. Auftretende Ventrikelfibrillationen wurden durch einen Defibrillator behoben, wobei mit zunehmender Häufigkeit der Fibrillationen die Energie von 100 Joule auf 350 Joule gesteigert wurde.

Hieran schloss sich eine 60 minütige Reperfusionsphase an, um eine Demarkierung des nekrotischen Gewebes zu ermöglichen. Je nach Ergebnisdokumentation erfolgte die in Abschnitt 3.2.6. beschriebene in vivo Färbung des Herzgewebes oder alternativ die Entnahme von Myokardstanzbiopsien. Diese wurden zu verschiedenen Zeitpunkten des Versuchsverlaufes (Abb. 12 und Tab. 2) entnommen und für anschließende biochemische Gewebsuntersuchungen verwendet.

3.2.5. Entnahme von Myokardbiopsien

3.2.5.1. Material

- Drillbiopsiestanze (unter Vakuum gehaltener Hohlbohrer, KaVo Dental GmbH, Biberach / Riss, kleine Veränderungen durch hauseigene Fertigungen der Feinmechanikwerkstatt)
- Röhrchen mit Schraubverschluss (15 ml und 50 ml Falcons, Greiner-Labor-technik, Solingen)
- flüssiger Stickstoff
- Vakuumpumpe (Gilford-Instruments, Berlin)

3.2.5.2. Methode

Für die biochemischen Untersuchungen (s. Abschnitt 5. und 6.) wurden mittels einer Drillbiopsiestanze kegelförmige Myokardbiopsien von ca. 80 mg Gewicht aus dem Applikationsareal der Mikroinfusionsnadeln sowie Kontrollgewebe entnommen. Die Drillstanze war an eine Vakuumpumpe angeschlossen, die ein Vakuum von 15 mm Hg aufbaute, sodass die Biopsie bei der Entnahme in den Stanzkolben angesaugt wurde und danach schnell mittels Druckluft (2 bar/cm²) in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff (-196°C) ausgeblasen und schockgefroren wurde. Kontrollgewebe für die Testsubstanzapplikationsareale stellten das zu erwartende ischämische Gebiet ohne Substanzapplikation, das Gewebe mit alleiniger Lösungsmittelinfusion sowie Gewebe aus dem Nicht-Risiko-Gebiet (NRG) des linken und rechten nicht-ischämischen Ventrikels dar. Es wurden verschiedene Zeitpunkte gewählt, um Biopsien zu entnehmen. Die erste Biopsieentnahme erfolgte vor der Substanzapplikation, danach erfolgte sie nach Abschluss der Applikation, d.h. vor der Ischämie und weiterhin zu verschiedenen Zeitpunkten des Versuchsprotokolls (Abb. 12; eingezeichnete gelbe Pfeile markieren die Zeitpunkte der Biopsieentnahme).

3.2.6. *In vivo*-Färbung des Myokardgewebes

3.2.6.1. Material

spezielle Lösungen und Substanzen

Fluoreszein (Sigma, Deisenhofen)

Kaliumchlorid-Lösung, 20%ig (Sigma, Deisenhofen)

PBS (pH 7,4) 80,0 g NaCl
 2,0 g KCl
 11,5 g Na₂HPO₄
 2,0 g KH₂PO₄ ad 1 l ddH₂O

Tween 20 (Sigma, Deisenhofen)

Zink-Cadmium-Sulfid orange-fluoreszierende Mikrosphären (Duke-Scientific Corp., AC Leusden, Niederlande)

Instrumente

Siehe Anhang, Kapitel VIII, Abschnitt 1..

3.2.6.2. Methode

Als Reperfusionmarker wurde in der 45. Minute der letzten (d.h. dritten bei vorgeschalteter Präkonditionierung) Reperusionsphase (RP III) Fluoreszein (10%ig in NaCl) intrakardial in den rechten Ventrikel injiziert. Somit wurden alle durchbluteten Bereiche des Tieres gelb gefärbt. Diese Färbung diente in der Infarktzone in Form eines Reperusionsmarker. In der 60. Minute der RP III wurden der RIP reokkludiert und die Aorta mittels Aortenklemme verschlossen. Zur Darstellung der Abgrenzung von Risiko-Gebiet (RG, jenes Gebiet, welches durch Okklusion ischämisch war) und Nicht-Risiko-Gebiet (NRG, Gebiete des linken Ventrikels, die während der Okklusion blutperfundiert waren) wurden 0,5 g orange-fluoreszierende Zink-Cadmium-Sulfid gekoppelte Mikrosphären (Durchmesser von 2-15 μ M) in den Bulbus aorticus verabreicht. Die Mikrosphären wurden in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung und 0,01% Tween 20 gelöst. Danach wurden einige Kontraktionen abgewartet, die ausreichend waren, um die Mikrosphären in die Koronargefäße zu befördern. Der Versuch wurde nach dem Vertiefen der Narkose mit einer intravenösen Bolusgabe von 25,0 mg/kg KG α -Choralose und anschließender Verabreichung von 1,5 ml/kg KG einer 20%igen Kaliumchloridlösung durch elektromechanische Entkopplung und resultierendem Herzstillstand beendet. Danach wurde das Herz entnommen und durch mehrmaliges Waschen mit PBS blutleer gespült. Die gesamte Versuchsdauer betrug von Beginn der Prämedikation bis zur Entnahme des Herzens maximal 330 min.

Tab. 2: Die Tabelle zeigt die Einteilung der Versuchsgruppen I-VII sowie die Zuordnung der jeweiligen Substanz, der Applikationsform, die Gesamtzahl der untersuchten Tiere in den Gruppen, die Anzahl der davon biopsierten Tiere und die minimalen und maximalen Körpergewichtsgrenzen der Tiere (KG) in Kilogrammangabe (kg).

Versuchsgruppe	Testsubstanz	Applikationsform	Tieranzahl biopsiert	Tiergewicht [kg]	Tieranzahl untersucht
IV	Actinomycin-D	syst.	7	33-39,5	14
VI	Actinomycin-D	syst.	6	36-42	16
VII	Actinomycin-D	i. myok.	8	35-45	17
IV	PD98059	i. myok.	6	34-42	15
VII	PD98059	i. myok.	8	29,5-37,5	16
II	SB203580	syst.	7	32-46	15
II	SB203580	i. myok.	6	31-43	12
III	SB203580	syst.	5	38-42	12
VI	SB203580	syst.	8	30-39,5	16
VII	SB203580	i. myok.	4	34,5-38	11
IV	Taxol	syst.	5	36-46	7
IV	Taxol	i. myok.	5	33,5-42	9
VI	Taxol	syst.	3	30,5-37,5	7
VII	Taxol	i. myok.	5	36-44	9
IV	UO126	syst.	7	31-42	16
IV	UO126	i. myok.	6	36-44	15
VI	UO126	syst.	6	29-40	18
VII	UO126	i. myok.	5	27-38	13
I	KHB/DMSO	syst.	4	32-44	15
II	KHB/DMSO	i. myok.	*		
III	KHB/DMSO	syst.	4	30-39	12
IV	KHB/DMSO	syst.	6	37-42	15
IV	KHB/DMSO	i. myok.	*		
V	KHB/DMSO	syst.	5	35-40	10
VII	KHB/DMSO	i. myok.	*		

syst.: systemische Applikation

i. myok.: lokale intramyokardiale Infusion

* jeweils 1 Nadelpaar mit KHB/DMSO bei den Testsubstanzversuchen

4. Herzaufarbeitung und *in vitro*-Färbetechnik

4.1. Material

Spezielle Lösungen

Formaldehyd 4%ig, (Sigma, Grünberg)

PBS (pH 7,0)

2,3,5-Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid (2,3,5-TTC), (Sigma, Grünberg)

Geräte

Siehe Anhang Kapitel VIII, Abschnitt 1..

4.2. Methode

Am entnommenen Herzen wurden der rechte Ventrikel und der Atrialbereich vollständig abpräpariert. Der verbleibende linke Ventrikel wurde durch Ausstopfen mit Gazetupfer in eine runde Form gebracht und für 20 min bei -80°C gefroren. Anschließend wurden die Tupfer entnommen und im rechten Winkel sechs Scheiben geschnitten. Danach wurden die einzelnen Scheiben gewogen. In den Versuchen mit lokaler Mikroinfusion wurde die Schnittführung so gewählt, dass auf der basalen Schnittfläche jeder Herzscheibe ein Nadelpaar steckte und der Anschnitt den Querschnitt der Diffusionsbereiche der Nadeln enthielt. Es entstanden vier Herzscheiben ungefähr gleicher Dicke (2 cm), die fünfte, die Basis-Herzscheibe, beinhaltete die Okklusionsstelle.

4.2.1. TTC-Färbereaktion und Fotografie der Herzscheiben

Die Scheiben wurden unter UV-Licht bei 366 nm von beiden Seiten fotografiert und darauffolgend für 20 min in 1%iger TTC-Lösung (gelöst in in PBS, pH 7) im Wasserbad bei 37°C ein weiteres Mal gefärbt. Bei diesem Färbeschritt war es notwendig, die Scheiben im Becherglas auf einem Glasstab durch die Lumina der Scheiben aufzureihen, sie auf diese Weise zu fixieren und somit in einer bestimmten Reihenfolge zu ordnen. Danach wurden die Scheiben für mindestens sechs Stunden in einer 4%igen Formaldehydlösung fixiert. Nach diesem Färbe- und Fixiervorgang wurde jede Scheibe von beiden Seiten erneut unter UV-Licht, unter Weißlicht sowie mittels Doppelbelichtung unter UV- und Weißlicht abgelichtet, indem die Scheiben zwischen zwei Glasplatten gepresst wurden (Abb.17, 18 und 19).

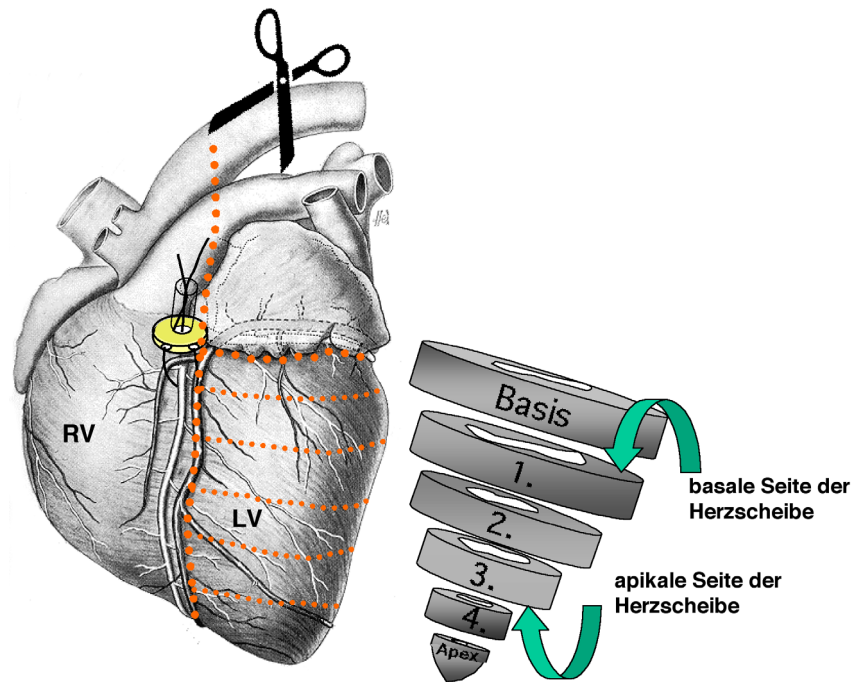


Abb. 17: Schematische Darstellung der Herzaufarbeitung. Der linke Ventrikel (LV) wurde vom rechten Ventrikel (RV) septal abgetrennt. Danach wurden das Herzohr, der atriale Bereich und Teile des LV bis zur Okklusionsstelle abpräpariert. Anschließend folgte das Schneiden der sechs Herzscheiben distal der Okklusionsstelle.

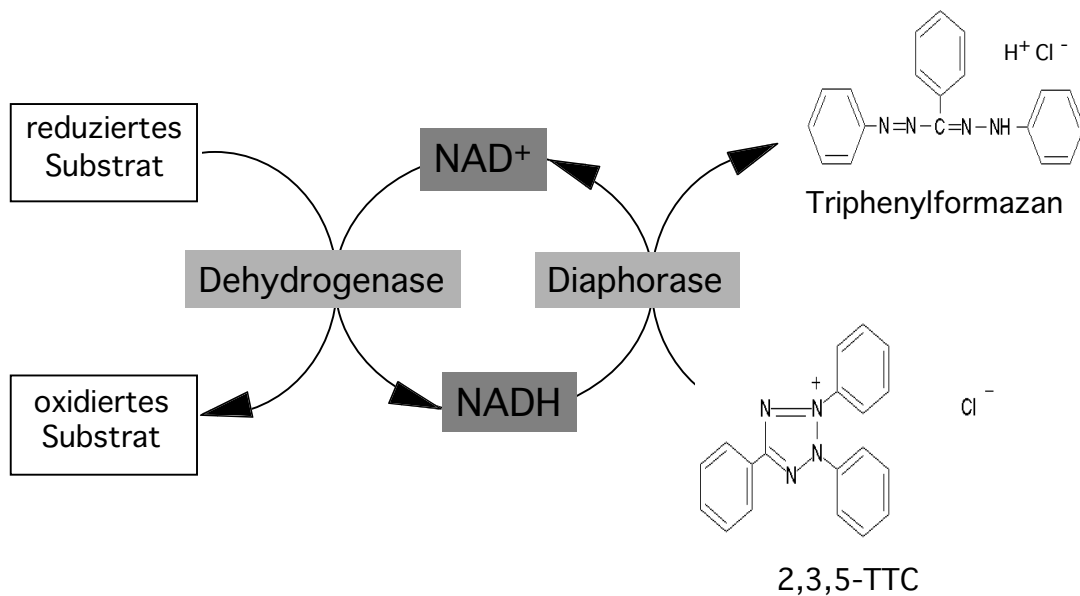


Abb. 18: Färbereaktion des 2,3,5-Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid (2,3,5-TTC-Farbstoffes). NAD⁺ = Nicotinamidadenindinucleotid.

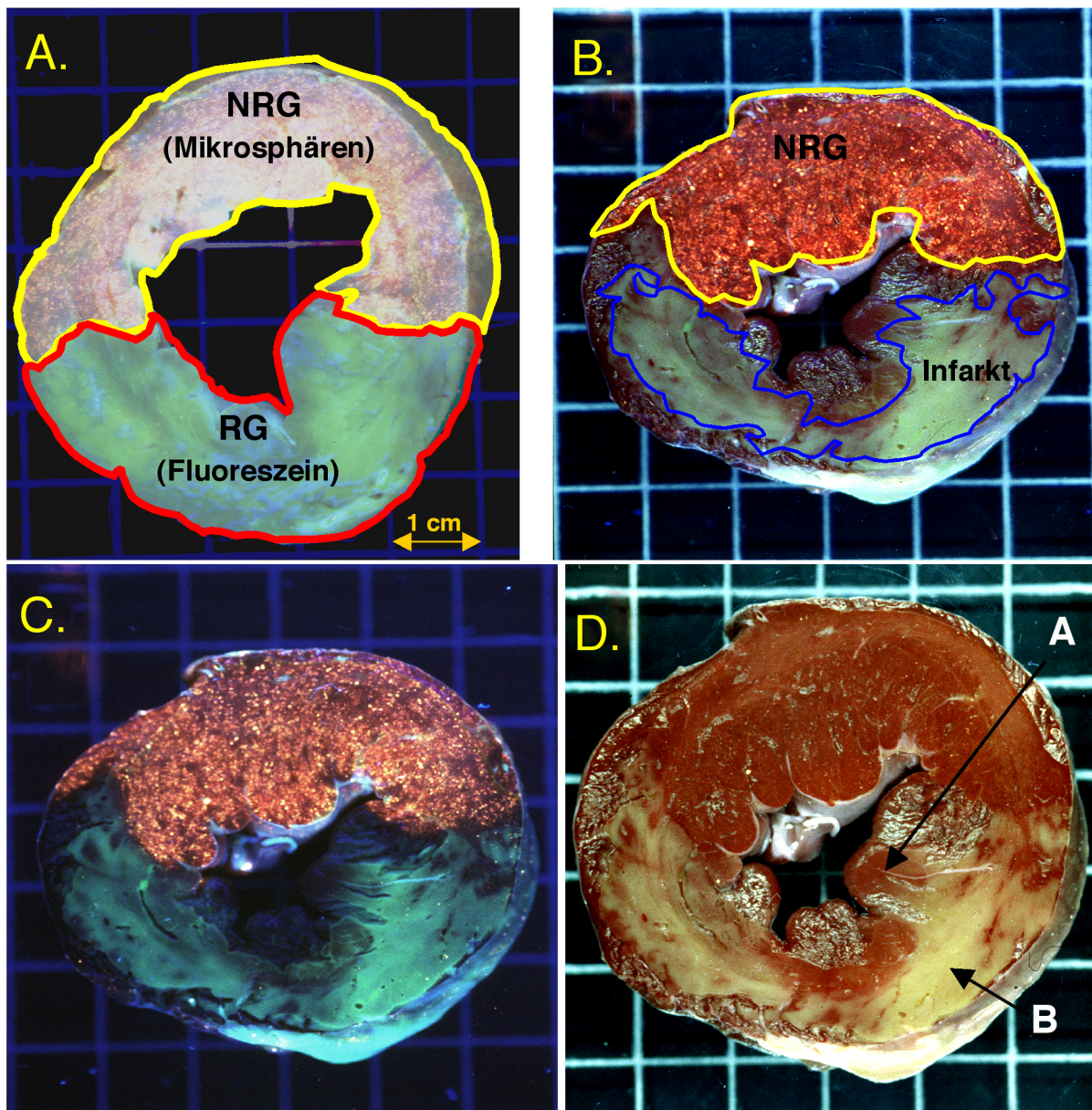


Abb. 19: Die vier abgebildeten Herzscheiben verdeutlichen die einzelnen Schritte der Färbemethode. (A) Herzscheibe nach *in vivo*-Färbung mit Fluoreszein und Mikrosphären. Fotografie unter UV-Licht (366 nm); [Blende: 2,8 mit 1 sec Belichtung]. NRG: Nicht-Risiko-Gebiet = Gebiet des linken Ventrikels, welches nicht ischämisch war. RG: Risikogebiet = okkludiertes Gebiet des linken Ventrikels. (B) Doppelbelichtete Herzscheibenfotografie unter UV-Licht (366 nm) [Blende: 2,8 mit 1 sec Belichtung] und Weißlicht [Blende: 8 mit 1/15 sec Belichtung], nach *in vivo*-Färbung mit Fluoreszein und Mikrosphären und folgender *in vitro* TTC-Färbung. (C) Herzscheibe nach Färbeschritt des Bildes B. Fotografie einfach belichtet unter UV-Licht (366 nm). (D) Herzscheibe nach Färbeschritt des Bildes B. Fotografie einfach belichtet unter Weißlicht [Blende: 8 mit 1/15 sec Belichtung]. A: TTC-rot gefärbtes, nicht-nekrotisches Myokard im RG. B: TTC-ungefärbtes, nekrotisches Myokard im RG.

4.2.2. Auswertungsmethodik und Ergebnisdokumentation

Die Auswertung der Herzscheiben erfolgte nach dem Einscannen der Fotografien. Die gescannten Bilder wurden mittels eines Computer-Messprogrammes planimetriert und das prozentuale Verhältnis des Risikogebietes (RG) zum Nicht-Risikogebiet (NRG) mit Hilfe eines Kalkulationsprogrammes ermittelt. Um die Größe der Scheibe als Faktor miteinzubeziehen, wurde das Scheibengewicht (wt) in die Formel eingefügt (Abb. 20).

$$IGr [\%] = \frac{wtIG}{wtRG} = \frac{\sum_{i=1}^k wt_i \cdot \frac{IG_{Ai} + IG_{Bi}}{LV_{Ai} + LV_{Bi}}}{\sum_{i=1}^k wt_i \cdot \frac{RG_{Ai} + RG_{Bi}}{LV_{Ai} + LV_{Bi}}} \cdot 100$$

Abb. 20: Die Abbildung zeigt die Formel der Infarktgrößenberechnung.

IGr: Infarktgröße [%]

wt: Herzscheibengewicht [g]

wtIG: gewichtskorrigiertes Infarktgebiet

wtRG: gewichtskorrigiertes Risikogebiet

IG: Infarktgebiet [cm²]

RG: Risikogebiet [cm²]

LV: Linker Ventrikel [cm²]

k: Anzahl der Herzscheiben

A: apikale Herzscheibenseite

B: basale Herzscheibenseite

5. Allgemeine Verfahren der Proteinbiochemie

5.1. Bearbeitung des Biopsiematerials

5.1.1. Material

Die unter Abschnitt 3.2.5. beschriebenen Biopsie-Proben wurden bei -80°C gelagert und anschließend aufgearbeitet.

Speziell verwendete Homogenisierungs-/Extraktionspuffer:

Extraktionspuffer A:

20,0 mM Tris-HCl
 250,0 mM Saccharose
 1,0 mM DTT
 1,0 mM EGTA
 1,0 mM EDTA
 0,5 mM PMSF
 0,1 mM Natriumorthovanadat
 10,0 mM NaF ad 100 ml ddH₂O pH 7,4

Extraktionspuffer B:

20,0	mM	Tris-HCl	
1000,0	mM	Saccharose	
1,0	mM	DTT	
1,0	mM	EGTA	
1,0	mM	EDTA	
10,0	mM	KCl	
0,1	mM	Natriumorthovanadat	
0,5	mM	PMSF	
10,0	mM	NaF	ad 100 ml ddH ₂ O pH 7,4

Extraktionspuffer C:

20,0	mM	Tris-HCl	
400,0	mM	KCl	
1,0	mM	DTT	
1,0	mM	EGTA	
0,1	%	Triton-X-100	
10,0	%	Glycerol	
0,1	mM	Natriumorthovanadat	ad 100 ml ddH ₂ O pH 7,4

5.1.2. Methode

Je nach Größe der Probe wurden 500 - 1000 μ l des gekühlten Extraktionspuffers (Puffer A) zu der Probe gegeben. Die mit dem Drillbohrer entnommenen Biopsien wurden mit einem Glashomogenisator zerkleinert bis eine homogene Lösung entstand. Größere Gewebestücke wurden zuerst (unter ständiger Zugabe von flüssigem Stickstoff) mit einem Porzellanmörser zermahlen und anschließend mit dem Extraktionspuffer (A) homogenisiert. Die homogenisierten Proben wurden anschließend wieder auf Eis gestellt. Danach erfolgten die unter Abbildung 21 beschriebenen Schritte der Zentrifugationen und Herstellung der verschiedenen Zellfraktionen.

5.2. Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde ein Produkt der Firma BioRad; München verwendet, das nach der von *Bradford* (1976) entwickelten Methode arbeitete⁹¹⁹. Der Test wurde nach Anweisung durchgeführt und die Farbreaktion bei einer Wellenlänge von 750 nm spektroskopisch ermittelt.

Alternativ wurde zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen ein Testsystem der Firma Pierce (Rockford, Il., USA) verwendet, wenn die zuerst genannte Methode aufgrund von Inkompatibilitäten mit Bestandteilen des Probenpuffers nicht möglich war. Auch hier wurde nach Anweisung verfahren und die bei der Umsetzung von Bichinchoninsäure auftretende Farbreaktion im Spektrometer bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Dieses Testsystem kombiniert die

bekannte Biuretreaktion von Cu^{2+} mit Proteinen in alkalischem Medium mit einem sehr empfindlichen und selektiv auf Cu^{2+} reagierenden Detektionsreagenz, der Bichinchoninsäure (BCS). Cu^{2+} bildet in alkalischem Medium mit Proteinen einen Komplex, dieser bildet mit BCS ein violettees Reaktionsprodukt mit einem UV-Absorptionsmaximum bei 562 nm. Somit kann man spektrofotometrisch die Menge an Protein in wässriger Lösung bestimmen.

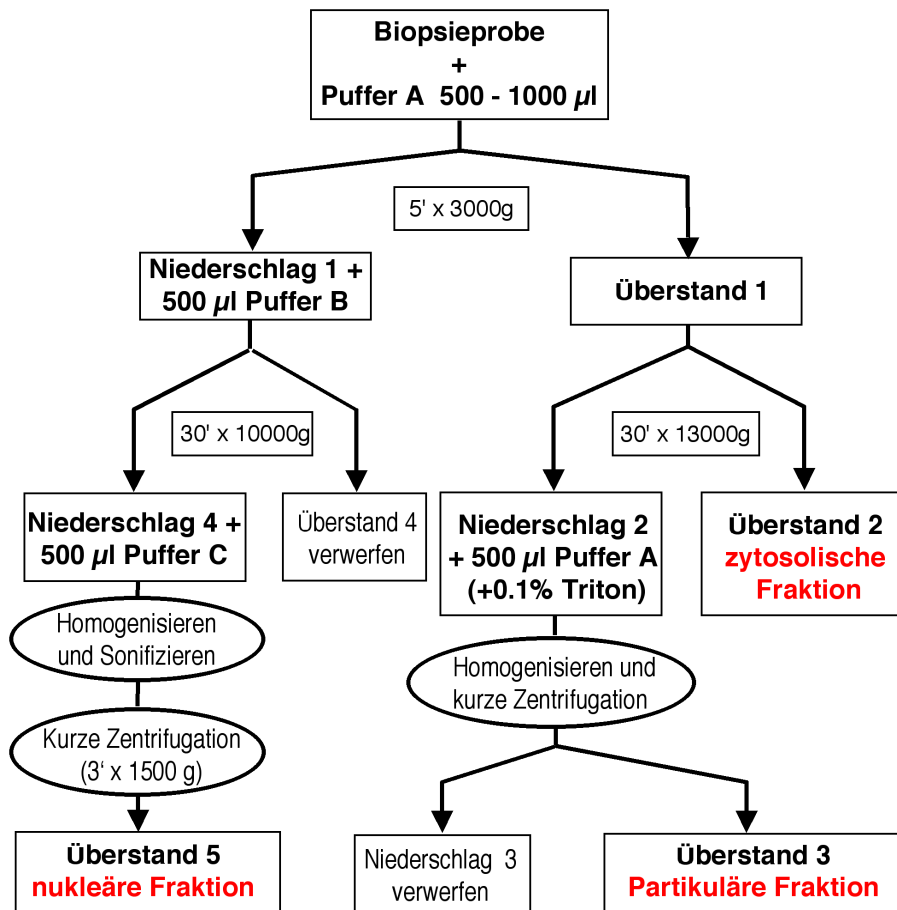


Abb. 21: schematische Darstellung der Probenfraktionierung der Myokardbiopsien. Es wurden drei Zellfraktionen isoliert. Dies waren die zytosolische, die partikuläre und die nukleäre Fraktion.

5.2.1. Material

Reagenz A: Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, BCA und Natriumtartrat in 0,2 N NaOH

Reagenz B: 4%ige Kupfersulfatlösung

Arbeitslösung: Mischung von Reagenz A und B im Verhältnis 50:1 unmittelbar vor der Proteinbestimmung

5.2.2. Methode

Die unter Abbildung 21 fraktionierten zytosolischen und partikulären Proben wurden 1:10 bzw. die nukleäre Fraktion 1:20 mit dd H₂O verdünnt. Anschließend wurden 100 µl der verdünnten Proben mit 2 ml BCS-Reagenz gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Abkühlung auf Zimmertemperatur wurde mittels spektrofotometrischer Messung bei einer Wellenlänge von 562 nm die Proteinkonzentration bestimmt. Eine Standardkurve wurde durch Mitführung von BSA-Standards mit Proteinkonzentrationen von 5 bis 1200 µg/ml erstellt (Abb. 22).

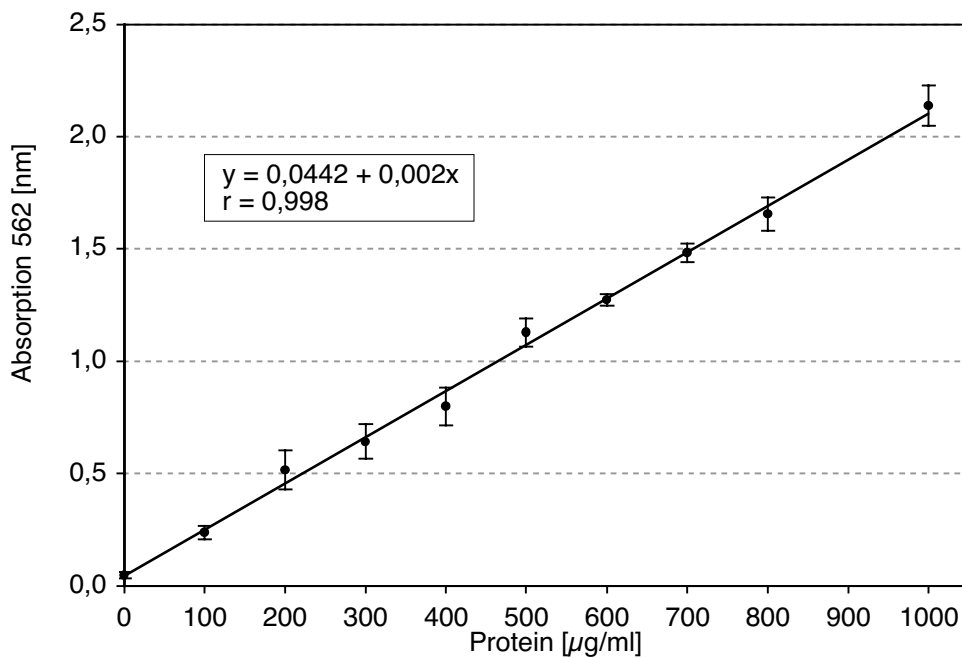


Abb. 22: Regressionsgerade durch die gemessenen Standardwerte der Proteinmengen von 100-1000 µg/ml nach der Mikro-Proteinbestimmungsmethode mit bovinem Serumalbumin (BSA).

6. Spezielle Verfahren der Proteinbiochemie

6.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

6.1.1. Material

Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle Lösungsmittel und Chemikalien in p.A. - Qualität (von höchstem Reinheitsgrad) bezogen.

Folgende Substanzen wurden von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen:

Ammoniumpersulfat, BSA, Glukose, Kaliumchlorid, EDTA, EGTA, Dithiothreitol

(DTT), β -Mercaptoethanol, Natriumfluorid, PMSF, Ponceau-Färbereagenz, Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat (Tween 20), Natriumorthovanadate, Saccharose, Temed, Tris-HCl, Triton X-100.

Ethanol 96%, Glycin, Glycerol, Methanol, Natriumcarbonat, Natriumchlorid, Natronlauge 12 N, Salzsäure 1 N wurde von Roth, Karlsruhe, bezogen.

Die Eichlösung für den pH-Meter, Formaldehyd 37%, Glycerin 87%, HEPES, Kaliumchlorid und SDS wurde von MERCK, Darmstadt, bezogen.

Proteinmarker (GibCo Lifetechnologies, Eggenstein).

Proteinmarker anfärbbar durch Silberfärbung (Amersham Pharmacia biotech.).

Laufpuffer (Laemmlipuffer, BioRad, Frankfurt).

Spezielle Lösungen

Tris-Lösung	1 M	Tris	pH 8,8 pH 6,8
Sammelgelpuffer	1,0 % 500,0 mM	(w/v) SDS Tris	pH 6,8
Trenngelpuffer	10,0 % 1500,0 mM	(w/v) SDS Tris	pH 8,8
Acrylamidlösung	30,0 % 0,8 %	(w/v) Acrylamid (w/v) Bisacrylamid	
10%iges Trenngel	7,50 ml 12,00 ml 10,50 ml 0,20 ml 0,02 ml	Trenngelpuffer Acrylamidlösung H ₂ O Ammoniumpersulfat 10% (w/v) Temed	
5%iges Sammelgel	2,50 ml 1,65 ml 5,70 ml 0,10 ml 0,01 ml	Sammelgelpuffer Acrylamidlösung H ₂ O Ammoniumpersulfat 10% (w/v) Temed	
Probenpuffer reduzierend	50,0 mM 5,0 % 20,0 % 100,0 mM	Tris SDS Glycerin DTT	pH 6,8
Elektrophorese- Laufpuffer	80,00 mM 10,00 mM 0,04 %	Glycin Tris SDS	pH 8,3

Geräte

siehe Anhang, Kapitel VIII, Abschnitt 1..

6.1.2. Methode

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte mit Modifikationen nach dem von *Laemmli* (1970) entwickelten Verfahren unter denaturierenden Bedingungen in einer eindimensionalen, diskontinuierlichen Gelelektrophorese (SDS-PAGE)⁴⁹. Die verwendeten Gele bestanden aus einem unteren, 10%igen Trenngel und einem darüberliegenden 5%igen Sammelgel. Die Porengröße bei der Polyacrylamid-Gelmatrix wurde durch die Polyacrylamidkonzentration und deren Vernetzungsgrad bestimmt. Dabei bildeten die beiden Komponenten der flüssigen Acrylamid / N, N'-Methylenbisacrylamidlösung ein Netzwerk aus, welches durch freie Radikale des Ammoniumpersulfat und durch Temed stabilisiert wurden und schließlich zur Polymerisation des Geles führten.

Die zytosolischen Proteinproben wurden im Verhältnis 2:1 mit dem reduzierenden Probenpuffer verdünnt, die partikulären und nukleären Proben wurden in gleichen Verhältnissen gemischt. Anschließend wurde das Protein-Puffer-Gemisch für 5 min bei 95°C denaturiert. Diese Behandlung induzierte eine Anlagerung stark negativ geladener SDS-Moleküle an die hydrophoben Abschnitte der Proteine. Dadurch wurde deren Eigenladung überdeckt, sodass die resultierende negative Gesamtladung proportional zur Molekülgröße der Proteine war. Die Verwendung des reduzierenden Agens β -Mercaptoethanol bewirkte das Lösen der intra- und intermolekularen Disulfid-Brücken und ermöglichte dadurch die elektrophoretische Auftrennung von Protein-Untereinheiten. Zusätzlich führte beides zur Linearisierung der Proteine, sodass ihre Laufeigenschaften im elektrischen Feld nur von der Molekülgröße abhängig waren. Die Proben wurden bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Es wurde eine Gelkammer der Firma BioRad verwendet. Vor dem Zusammenbau der Gelkammern wurden diese mit Alkohol gereinigt. Darauf folgend wurde das Trenngel, wie unter Abschnitt 6.1.1. beschrieben, gemischt und in die Gelkammern gegossen. Nach Polymerisation der Gele wurde das Sammelgel darüber gegossen und der Probenkamm (10-, 12- bzw. 15er Kamm, Füllvolumen 30-50 μ l) eingesetzt. Die Gele wurden nun in die Elektrophoreseapparatur eingespannt und platziert. Der Raum zwischen den Gelen wurde vollständig mit Laufpuffer gefüllt. Der Kamm wurde vorsichtig gezogen und die entstandenen Kammern mittels einer Glasspritze mit der Probe beschickt (mind. 20 μ g Gesamtprotein). Zur Kontrolle der zu untersuchenden Proben wurde stets ein vorgefärbtes Markerprotein mit definierten Molekulargewichten und bei einigen Versuchen eine positive Probenfraktion mit aufgetragen. Der Gibco-Marker zeigte nach der Elektrophorese zehn Banden, die zwischen 9 und 187 kDa lagen. Eine charakteristisch rot gefärbte Bande zeigte sich bei 61 kDa. Der Proteinmarker, der verwendet wurde, sofern die Gele durch eine Silberfärbung angefärbt wurden,

zeigte nach der Elektrophorese 12 charakteristische Banden, die zwischen 15 und 220 kDa lagen. Nach dem Füllen des Elektrophoresebehälters mit dem Laufpuffer wurde der Elektrophoreselauf bei einer konstanten Stromstärke von 50 mA (Spannung 120-200 V) für ca. ein bis zwei Stunden gestartet.

6.2. Silberfärbung

6.2.1. Material

Fixierer 1	40	% (v/v)	Methanol	
	10	% (v/v)	Essigsäure	
Fixierer 2	10	% (v/v)	Ethanol	
	5	% (v/v)	Essigsäure	
Färbelösung	21,0 ml	90mM	NaOH	
	4,0 ml	1,18mM	AgNO ₃ -Lösung	
	1,4 ml	25%ige	NH ₃	ad 100 ml dd H ₂ O
Entwickler	10,0 ml		Methanol	
	500,0 µl	1%ige	Zitronensäure	
	50,0 µl		Formaldehyd	ad 100 ml dd H ₂ O
Stopplösung	5	% (v/v)	Essigsäure	

6.2.2. Methode

Eine Silberfärbung der Gele wurde mit vorgefertigten Lösungen der Firma BioRad, nach modifizierter Anleitung durchgeführt.

Nach der Fixierung des Gels mit zwei Fixativen für insgesamt 2 h folgte ein Waschschrift des Gels für mindestens eine Stunde mit dd H₂O. Anschließend wurde das Gel mit der Silbernitrat-Lösung für 30 min inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift für 3 min, wurde das Gel im Entwickler geschwenkt und die Reaktion bei ausreichender Anfärbung der Banden mit Essigsäure abgestoppt. Zur längeren Aufbewahrung bei 4°C wurde dem Wasser 0,01% NaN₃ beigefügt.

6.3 Western Blot Verfahren

6.3.1. Proteintransfer

Die in der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden für die Western Blot Analyse nach einem Verfahren von *Towbin et al.* (1975) in einem elektrischen Feld auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und auf diese Weise einem immunologischen Nachweis zugänglich gemacht⁴⁸.

6.3.1.1. Material

Lösungen

Blotpuffer	20,0 mM	Tris
(Transferpuffer)	150,0 mM	Glycin
	20,0 % (v/v)	Methanol

Verbrauchsmaterialien

Filterpapier, Nitrozellulosemembran (Amersham Pharmacia biotech.).

6.3.1.2. Methode

Es wurden zwei Verfahren des Proteintransfers durchgeführt, zum einen das "Tankverfahren". Hierbei wurden in Transferpuffer getränkte Filterpapiere und Schwämme als Pufferreservoir verwendet. Das Packen der Anodenkammer erfolgte in der folgend genannten Reihenfolge. Zuerst wurden ein mit Transferpuffer getränkter Schwamm, dann drei Lagen Filterpapier, darauf die Nitrozellulosemembran und das Gel gepackt. Über das Gel wurden wiederum drei Lagen Filterpapier gelegt, nach jedem Filterpapier wurde evtl. dazwischen befindliche Luft durch vorsichtiges Darüberstreichen mit einem Glasstäbchen entfernt. Als letztes wurde wieder ein Schwamm gepackt (Abb. 23). Der Elektrotransfer konnte variabel durchgeführt werden. Entweder bei einer konstanten Spannung von 30 V (Stromstärke ca. 350 mA) für ein bis zwei Stunden oder bei einer konstanten Spannung von sieben V (Stromstärke ca. 110-150 mA) über Nacht. Einer eventuellen Erhitzung der Membranen und des Puffers wurde durch stetige Kühlung entgegengewirkt.

Das zweite angewandte Verfahren, war das "Semi-dry"-Verfahren. Das Packen der Filter, der Membran und des Geles wurden ebenfalls wie unter Abbildung 23 beschrieben durchgeführt. Der Transfer fand bei einer konstanten Spannung von neun V (Stromstärke ca. 200 mA) für 90 min statt.

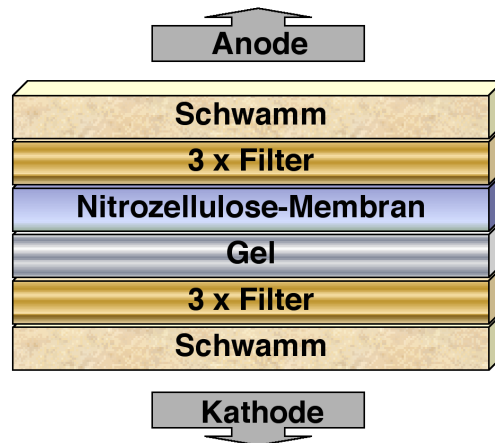


Abb. 23: Reihenfolge der verwendeten Materialien beim Packen der Anodenkammer.

6.3.2. Ponceaufärbung

6.3.2.1. Material

Lösungen

Ponceau S-Lösung (Sigma, Deisenhofen). Konzentrat: 1:500 in ddH₂O verdünnt

TBS-Puffer 10x: 0,5 M Tris
 1,0 M NaCl pH 7,4

6.3.2.2. Methode

Der Erfolg des Proteintransfers im Western Blot Verfahren wurde durch eine reversible Anfärbung der Nitrozellulosemembran mit dem Farbstoff Ponceau S überprüft. Nach dreiminütiger Anfärbung wurde so lange mit ddH₂O differenziert, bis sich die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund abhoben. Ein Entfärben der Membran wurde durch mehrmaliges Waschen mit TBS-Puffer erreicht.

6.3.3. Immunologischer Proteinnachweis

6.3.3.1. Material

Allgemein verwendete Puffer

TBS 10 x:	0,5 M 1,0 M	Tris NaCl			pH 7,4
PBS 10 x	80,0 g 2,0 g 11,5 g 2,0 g	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄	ad 1 l ddH ₂ O		pH 7,4
PBS/Tween 10 x:	80,0 g 2,0 g 11,5 g 2,0 g 0,1 % (v/v)	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ Tween 20	ad 1 l ddH ₂ O		pH 7,4

Besondere Reagenzien

Magermilchpulver (Blockreagenz), anti-Maus-IgG (POD-markierter Sekundärantikörper), anti-Kaninchen IgG (POD-markierter Sekundärantikörper), ECL-Detektions-Reagenz (Amersham, Pharmacia biotech., Europe GmbH, Freiburg), Protein-A-Agarose (Sigma, Deisenhofen).

Lösungen

Magermilchlösung: 5% Magermilchpulver in TBS/Tween

Antikörperlösung: Verdünnung in TBS / Tween (3% bzw. 1,5% Magermilchpulver)

ECL Western Blot Detektions-Reagenz 1 u. 2: 1:1 Gemisch (3ml:3ml)

Geräte

Siehe Anhang Kapitel VIII, Abschnitt 1..

Antikörper

Tab. 3: Tabellarische Aufstellung der verwendeten Primär-Antikörper (AK). Angaben über Hersteller, getestete Konzentrationen und Belichtungszeiten der Antikörper.

* gerichtet gegen die an den Aminosäuren Thr202/Tyr204 phosphorylierte Form der p44/42 MAP-Kinase (ERK 1/2).

** dieser Antikörper richtet sich spezifisch gegen die an den Aminosäuren Thr183/Tyr185 phosphorylierte Form der SAPKs /JNKs.

*** dieser Antikörper richtet sich spezifisch gegen die an den Aminosäuren Thr180/Tyr182 phosphorylierte Form der p38-MAPKs.

◇ dieser Antikörper richtet sich spezifisch gegen das Epitop mit den Aminosäuren Glu-63, Ser-65, Ala-66, Met-67, Gln-70 und Arg-73, welches in der aktiven-GTP-gebundenen Form von Ras die Serin-Threonin Kinase Raf-1 bindet.

◇◇ dieser Antikörper richtet sich spezifisch gegen die Aminosäuren 180-250 der Raf-1-Kinase, welche für die Aktivierung von MEK-1/2 verantwortlich sind. (b.w.)

Primär-Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Belichtungszeit
monoklonaler AK-Maus-anti-phospho-ERK 1/2 *	1:500	New England Biolabs	30-60 min, evtl. über Nacht
polyklonaler AK-Kaninchen-anti-phospho-JNK1/2 **	1:500	New England Biolabs	15-30 min
polyklonaler AK-Kaninchen-anti-phospho-p38-MAPK ***	1:500	New England Biolabs	60 min, evtl. über Nacht
polyklonaler AK-Kaninchen-anti-ERK2	1:3000	Santa Cruz	1-2 min
polyklonaler AK-Kaninchen-anti-JNK2	1:3000	Santa Cruz	5 min
polyklonaler AK-Kaninchen-anti-p38-MAPK	1:3000	Santa Cruz	5 min
polyklonaler AK-Kaninchen-anti-c-Jun (u. anti-P-c-Jun)	1:500	New England Biolabs	10-15 min
polyklonaler AK-Kaninchen-anti-ATF-2 (u. anti-P-ATF-2)	1:500	New England Biolabs	10-15 min
polyklonaler AK-Kaninchen-anti-Elk-1 (u. anti-P-Elk-1)	1:500	New England Biolabs	10-15 min
polyklonaler AK-Kaninchen-anti-c-Myc (u. anti-P-c-Myc)	1:500	New England Biolabs	10-15 min
polyklonaler AK-Maus-anti-phospho-Threonin-Proline	1:3000	Cell Signalling	Silberfärbung
polyklonaler AK-Kaninchen-phospho-(Ser/Thr)Phe	1:500	New England Biolabs	Silberfärbung
polyklonaler AK-Kaninchen-anti-phospho-Serin	1:2000	Cell Signalling	Silberfärbung, Immunopräzipitation
polyklonaler AK-Kaninchen-anti-phospho-Threonin	1:2000	Cell Signalling	Silberfärbung, Immunopräzipitation
Monoklonaler AK-Maus-anti-phospho-Tyrosine	1:2000	Cell Signalling	Silberfärbung, Immunopräzipitation
polyklonaler AK-Kaninchen-anti-MAPKAPK2	1:500	New England Biolabs	10-15 min
polyklonaler AK-Kaninchen-anti-H-Ras ◆	1:2000	Santa Cruz	5 min
polyklonaler AK-Kaninchen-anti-Raf 1 ◆◆	1:2000	Santa Cruz	5 min

Tab. 4: Tabellarische Angaben über die verwendeten Sekundär-Antikörper, ihre Hersteller und die im Test eingesetzte Verdünnung. Alle verwendeten Sekundär-Antikörper waren mit dem Substrat HR-POD (Meerrettich Peroxidase) gekoppelt.

Sekundär-Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Ziege-Anti-Maus-IgG	1:5000	New England Biolabs
Ziege-Anti-Kaninchen-IgG	1:5000	New England Biolabs
Ziege-Anti-Kaninchen-IgG	1:5000	Santa Cruz

6.3.3.2. Methode

Zuerst wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran durch eine Inkubation in 5%iger Magermilchlösung (Magermilch gelöst in TBS-Tween) über Nacht bei 4°C blockiert. Danach wurde für 5-10 min mit PBS/Tween-Puffer gewaschen und anschließend der Primärantikörper in der unter Tab. 3 beschriebenen Verdünnung in 2%iger Magermilchlösung in TBS verdünnt. Hierfür wurden die Antikörper in Konzentrationen zwischen 0,2 und 2 µg/ml eingesetzt. Die Inkubation erfolgte im Zentrifugenröhrchen für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C auf einem Rollinkubator. Nach einem weiteren Waschschriff für 30 min mit TBS-Tween wurde die Membran für 90 min im Dunkeln wiederum auf dem Rollinkubator mit einem speziesspezifischen, peroxidase markierten Sekundärantikörper (Tab. 4) inkubiert. Danach wurde die Membran für 60 min mit TBS-Tween-Puffer gewaschen, anschließend mit POD-Substrat-Lösung angefärbt, d.h. das detektierte Antigen mittels ECL-Färbung (enhanced-chemo-luminescence-Färbung) quantifiziert. Die gewaschene Membran wurde hierbei für eine Minute mit dem Gemisch der ECL-Reagenzien 1 und 2 im Verhältnis 1:1 inkubiert. Danach wurde die Nitrozellulosemembran auf ein Filterpapier gelegt, sodass Reste des Färbereagens aufgesaugt wurden. Daraufhin wurde die Nitrozellulosemembran möglichst falten- und luftfrei in Klarsichtfolie beiderseits eingehüllt und in einer Filmkassette eingeklebt. Anschließend wurde auf die Membran ein Film gelegt und je nach verwendetem Antikörper für unterschiedliche Zeit belichtet (Tab. 3).

6.3.4. Immunopräzipitation

6.3.4.1. Material

siehe Abschnitt 6.1.1. und 6.3.3.1.

6.3.4.2. Methode

Um die Reaktion bei der Western Blot Analyse zu verstärken, wurde bei bestimmten Antikörpern eine Immunopräzipitation der Proteinfraction (zytosolische und nukleäre Fraction) vor der Elektrophorese durchgeführt. Dafür wurde eine Probenmenge mit einem Gesamtproteinanteil von 200 μg mit dem Primär-Antikörper (2 μg) für 4 h bei 4°C unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert. Nach Zugabe von Protein-A-Agarose zu dem Immunkomplex für weitere 4 h bei 4°C wurde der entstandene Immunkomplex bei 13000 x g für 5 min zentrifugiert und das entstandene Präzipitat nach Abgießen des Überstandes in reduziertem Laemmli-Puffer resuspendiert und für 5 min bei 95°C denaturiert. Danach erfolgten wie unter Abschnitt 6.1.2. beschrieben, eine Auftrennung der immunopräzipitierten Proteine durch Elektrophorese und ein Immunoblotverfahren (s. Abschnitt 6.3.3.) mit dem zuvor präzipitierten Primär-Antikörper.

6.4. Messung der Protein-Kinase-Aktivität durch den in-Gel-Phosphorylierungsassay

6.4.1. Material

Zusätzlich zu den in Abschnitt 6.1.1. aufgelisteten Materialien wurden folgende benötigt:

[γ -³²P]-ATP, Amersham (Pharmacia biotech., Freiburg), Glutathion-Sepharose (Amersham Pharmacia biotech., Freiburg). Von Sigma, Deisenhofen wurden folgende Substanzen bezogen: HEPES, Guanidine-HCl, Propanol, Protein-Kinase-Inhibitor, Nonidete P-40, Magnesiumchlorid, Myelin-basic-Protein (gewonnen aus bovinem Gehirn, in Form lyophilisierten Pulvers).

Die rekombinant hergestellte MAPKAPK-2(46-400) diente als Substrat der p38-MAPKs. Es beinhaltet die Aminosäuren 46-400, welche die katalytische Domäne des Proteins mit einschließen. Das rekombinant hergestellte c-Jun wurde als Substrat der SAPK/JNKs benutzt. Es beinhaltete die Aminosäuren 1-135 und die N-terminale transaktive Domäne des Proteins. Beide Proteine wurden im Bakterium *Escherichia coli* exprimiert und an Glutathion-S-Transferase als

Fusionsprotein gebunden. Anschließend erfolgte eine Reinigung des Proteins durch Glutathion-Sepharose G-25-Chromatografie. Der Bakterien-Klon wurde von C.J. Marshall hergestellt und uns freundlicherweise von P.H. Sudgen (NHLI Division, Cardiac Medicine, Imperial College School of Medicine, London SW3, 6LY, UK) zur Verfügung gestellt.

6.4.2. Methoden

6.4.2.1. Sephadex-Gel-Filtration

Hierbei handelt es sich um ein säulenchromatografisches Verfahren zur Trennung von Substanzgemischen nach ihrer Molekülgröße. Das Gel (stationäre Phase) besteht hierbei aus gequollenem Sephadex® G25, einem quervernetzten Polysaccharidkettenkomplex mit 1,6-, 1,4- und 1,3-glykosidischen Bindungen zwischen den Glukoseanteilen. Es besitzt Kugelform und wurde in der Porengröße verwendet, die eine Durchlässigkeit von Partikeln mit dem Durchmesser von 90-260 μm ermöglichte. Große Moleküle, die nicht in die Poren der stationären Phase eindringen können, wandern am schnellsten durch das Gelmaterial. Kleinere Moleküle, die in die Poren des Gels eindringen können, wandern langsamer durch die Säule, da sie einen verlängerten Diffusionsweg besitzen. Anschließend werden sie ihrer Größe entsprechend durch den Elutionspuffer ausgewaschen. Als Puffer wurden 10 ml einer 20 mM Ammoniumacetat-Lösung verwendet. Die Flussrate betrug 10 ml/h. Das Eluat beinhaltete eine durchschnittliche Proteinmenge von 200 $\mu\text{g/ml}$.

6.4.2.2. Bestimmung der ERK 1/2-Aktivitäten

Das Prinzip des Aktivitätstests liegt darin, dass die Kinase das Substrat unter Verbrauch des radioaktiv markierten ATPs phosphoryliert (Abb. 24) ⁴⁷.

Jeweils gleiche Mengen Gesamtprotein (20-40 μg) wurden auf 10%igen SDS-Gelen, die das ERK-Substrat Myelin-basic Protein (MBP) ⁹²⁰ in einer Konzentration von 0,25 mg/ml enthielten, elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele für 1 h in einer Lösung bestehend aus 20%igem Propanol (v/v) in 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) gewaschen. Darauf folgend wurden die Gele für eine weitere Stunde in einer Lösung aus 5 mM 2-Mercaptoethanol und 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) unter stetigem Wechsel gewaschen. Es folgte ein Denaturierungsschritt durch Inkubation in 6 M Guanidin-HCl. Danach wurden die Proteine auf dem Gel mit einem Puffer aus 50 mM Tris-HCl, 0,1 mM 2-Mercaptoethanol (pH 8,0) für die Zeit von 16 h renaturiert. Nach einer Vorinkubation der Gele mit einem Puffer aus DTT

(2 mM) und MgCl_2 (10 mM) in HEPES (40 mM) wurde das Substrat anschließend durch Inkubation mit $25 \mu\text{M}$ [$\gamma^{32}\text{-P}$]-Adenosin Triphosphat (ATP; $5 \mu\text{Ci/ml}$) phosphoryliert. Die Phosphorylierung des Substrates erfolgte für 4 h bei einer Temperatur von 25°C in Anwesenheit von 0,5 mM EGTA, 10 mM Magnesiumchlorid und $1,0 \mu\text{M}$ eines Proteinkinase-A-inhibitorischen Proteins (PKI) zur Minderung der unspezifischen Phosphorylierung des Substrates MBP. Nach intensivem Waschen für 1 h in einer Lösung aus 2%igem (w/v) Natrium-Pyrophosphat, gelöst in 5%iger (w/v) Trichloressigsäure wurden die Gele getrocknet. Die quantitative und autoradiografische Analyse der Gele erfolgte mit Hilfe eines Phosphoimager^{SF} Storm 860.

Als weitere Methodik erfolgte die Auswertung der Aktivität mittels Signalexpression auf radioaktiv-sensitive Filme. Der Film wurde bei -80°C mehrere Stunden bis Tage, abhängig von der Stärke der Signale, den Gelen ausgesetzt. Die ionisierende Strahlung radioaktiv markierter Moleküle als Strahlenquelle schwärzte die empfindliche Röntgenfilmemulsion proportional zur Menge an Radioaktivität, sodass die Signale quantitativ und qualitativ ausgewertet werden konnten. Die Filme wurden der Inkubation anschließend in der Entwicklungsanlage entwickelt und ebenfalls autoradiografisch ausgewertet.

6.4.2.3. Bestimmung der p38-MAPK-Aktivität

Hier wurde wie unter Abschnitt 6.4.2.2. beschrieben verfahren. Als Substrat der zu untersuchenden p38-MAPK wurde den Gelen 0,5 mg/ml GST-MAPKAPK-2(46-400) (Glutathion-S-Transferase-MAPKAPK-2) zugesetzt. In den Untersuchungen, die Gewebeproben aus Versuchen mit Applikation des spezifischen p38-MAPK-Inhibitors SB203580 beinhalteten, musste der *in-Gel*-Phosphorylierung die Substanz SB203580 in einer Konzentration von 40 nM hinzugefügt werden.

6.4.2.4. Bestimmung der SAPKs/JNKs-Aktivitäten

Die Methodik, wie unter Abschnitt 6.4.2.2. beschrieben, wurde auch hier angewandt. Als Substrat der SAPKs / JNKs fungierte GST-c-Jun(1-135) (Glutathion-S-Transferase-c-Jun) in einer Konzentration von 0,5 mg/ml im Trennungsgel.

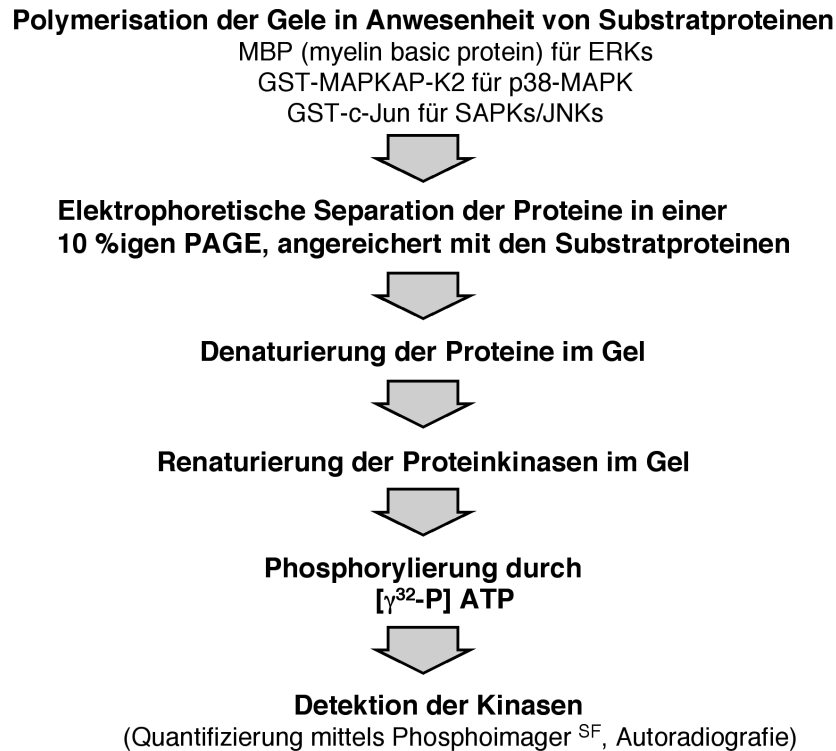


Abb. 24: Schematische Darstellung der Einzelschritte der in-Gel Aktivitätsbestimmung.

7. Aufreinigung von Phosphoproteinen aus dem entnommenen Herzgewebe

Die Isolierung umfasste folgende Schritte:

- Homogenisierung (siehe Abschnitt 5.1.)
- Zentrifugationen zur Gewinnung der spezifischen Zellfraktionen (siehe Abschnitt 5.1.)
- Gelfiltration (siehe Abschnitt 6.4.2.1.)
- Gefriertrocknung
- Weiterer Zentrifugationsschritt
- Präparative Säulenionenaustauschchromatografie unter der Bildung von Chelatkomplexen

7.1. Präparative Säulenionenaustauschchromatografie unter der Bildung von Chelatkomplexen

7.1.1. Material

Säulen: HiTrap Chelating affinity columns; 1 ml Fassungsvermögen (Amersham Pharmacia biotech.)

Startpuffer(Laufpuffer)

0,1 M Essigsäure (= acetic acid: CH_3COOH); pH: 3,35 (mit NaOH wurde der pH-Wert eingestellt)

Metallionenlösung

100 mM FeCl_3 gelöst im Startpuffer (676 mg/25 ml 0,1 M Essigsäure)

Elutionspuffer

0,5%ige Ammoniumacetat-Lösung (0,25g NH_4Cl ad 50 ml Aqua bidest. pH: 8,7 mit NH_4OH wurde der pH-Wert eingestellt)

„Stripping“-Puffer

50 mM EDTA-Lösung (841 mg EDTA ad 50 ml Essigsäure)

Aufbewahrungslösung

20%iges Ethanol, 4°C

7.1.2. Methode

Die Methode der präparativen Ionenaustauschchromatografie diente der Konzentrierung von Phosphoproteinen aus dem entnommenen homogenisierten Myokardbiopsiematerial⁹²¹.

Die Säulenchromatografie beruht auf dem Prinzip der Trennung von Eiweißstoffen an Säulen unter Anwendung von Trägersubstanzen (= stationäre Phase) und Elutionsmitteln (= mobile Phase). Die Matrix, die sogenannte Trägersubstanz (Füllungsmittel der Säule) der hier verwendeten Säulen bestand aus Agarosekügelchen ($\text{Ø } 34 \mu\text{m}$), die mit 6%iger Sephadex® High Performance angereichert wurden. An diese war durch stabile Ethergruppen Aminoethansäure gebunden, welche die Liganden der Chelatkomplexbildung darstellten.

Die Säule konnte mit einem maximalen Perfusionsdruck von 3 bar (0,3 ml/min) mit der jeweilig verwendeten Probenlösung perfundiert werden. Zuerst wurde die Säule

durch mehrmaliges Spülen mit Aqua bidest. von der Aufbewahrungslösung Ethanol freigespült. Anschließend wurde die Säule mit dem Startpuffer aufgefüllt. Das Fassungsvermögen der Säule betrug 1 ml. Danach wurde die Säule mit der Metallionenlösung bestückt (Metallionen-Bindungskapazität: $\sim 23 \mu\text{mol Fe}^{3+}/\text{ml}$ Gel). Hierbei entstand ein Chelatkomplex.

7.1.3. Reaktion 1 der Chelatkomplexbildung

Ein 1,2-Diaminoethan-Molekül besitzt zwei Stickstoffatome mit freien Elektronenpaaren, die mit dem Eisen (III)-Ion in eine kovalente Wechselwirkung treten können. Die Liganden (1,2-Diaminoethan-Molekül) greifen dabei ähnlich einer Krebsschere nach dem Zentralion (Eisen (III)-Ion). Nachdem das erste Atom des Liganden an das Zentralion gebunden hat, wird die Ausbildung weiterer Bindungen zum Liganden begünstigt, da sich die weiteren Bindungsstellen schon nahe am Zentralion befinden. Fünf- und sechsgliedrige Ringe sind dabei aus sterischen Gründen besonders stabil.

7.1.4. Filtration und Zentrifugation

Nach der Homogenisierung und anschließenden Zentrifugation der Proben erfolgte ein Filtrationsschritt der Probenlösung durch einen $45 \mu\text{m}$ Filter. Durch das Lösen der gefriergetrockneten Proben in 0,1 M Essigsäure fand eine Ausfällung der Proteine statt, die durch einen weiteren Zentrifugationsschritt für 15 min bei 13000 g vom Rest getrennt wurden. Der Niederschlag wurde verworfen und der Überstand zur Befüllung der Säule verwendet. Hiermit erreichte man einen Anionenaustausch durch Bindung von Phosphoproteinen an die Säule.

7.1.5. Reaktion 2 der Chelatkomplexbildung

Ein Ionenaustauscher besteht aus einer unlöslichen Matrix, an die bestimmte geladene Gruppen kovalent gebunden sind. Diese geladenen Gruppen sind mit mobilen Gegenionen assoziiert, die reversibel durch andere Ionen der gleichen Ladung ausgetauscht werden können, ohne die Matrix zu verändern.

Ein Anionenaustauscher ist selbst positiv und kann negative Gegenionen binden. Unsere Myokardbiopsiehomogenate besaßen aufgrund verschiedener Ladungseigenschaften meist unterschiedliche Affinität zum Ionenaustauscher. Die Affinität konnte jedoch durch die Auswahl der Versuchsbedingungen, wie Ionenstärke oder Puffer-pH, wieder aufgehoben werden, d.h. die spezifischen Substanzen (Phosphoproteine) wurden eluiert. Der Trenneffekt beruhte auf den Unterschieden der Festigkeit der Anionenbindung unterschiedlicher Konstitution.

Deionisierendes Formamid, Dextransulfat, Dithiothreitol, EDTA (Ethylendiamin-tetraacetat), Ethanol (100%ig, 70%ig), Ethidiumbromid Formaldehyd (37%ig).

Glycerol GTE-Puffer (sterilfiltriert) 2,25 g Glukose
6,25 ml M Tris-HCl, pH 8,0
5,00 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0
kurz vor alkalischer Lyse Zugabe von 2 mg/ml Lysoym.

Heringsperma-DNA HybondTM-N-Nylonmembran, Isopropanol

K-Acetat-Lösung (5 M) 60,0 ml 5 M K-Acetat
11,5 ml Essigsäure
28,5 ml destilliertes, autoklaviertes Wasser.

Kaliumhydrogenphosphat

RNA-Ladungspuffer für RNA-Gele 0,75 ml deionisiertes Formamid
0,15 ml 10x MOPS-Puffer
0,24 ml Formaldehyd
0,10 ml destilliertes, autoklaviertes Wasser
0,10 ml Glycerol
0,08 mg 10% Bromphenolblau

Lösung A für RNA-Isolierung 4,00 M Guanidinthiocyanat
0,25 M Natriumcitrat, pH 7,0
0,50 % (w/v) N-Laurylsarcosyl
0,10 M β -Mercaptoethanol (vor Gebrauch
zugesetzt)

47,25 g (4 M) Guanidinium ad 100 ml destilliertes, autoklaviertes Wasser. 750 μ l (0,1 M) 2-Mercaptoethanol werden kurz vor Gebrauch als Reduktionsmittel zur Ribonuklease-Inaktivierung zugegeben. Es führt zur Reduktion der Disulfid-Brücken in den Proteinen.

Marker für RNA (*Hinf* III-Restriktion)

Markierungspuffer (5 x) 25 mM Tris-HCl, pH 8,0 (0,2 M)
25 mM MgCl₂
10 mM Dithiothreitol

MOPS-Puffer (3-N-morpholino-propanesulfonic acid-buffer = RNA-Puffer) 10 x
41,80 g MOPS
4,10 g Na-Acetat
3,72 g Na₂EDTA in 1 l destilliertem Wasser, pH 7,0 mit NaOH einstellen

NaCl (Natriumchlorid)

NaOH (Natriumhydroxid)

Natrium-Acetat (3 M)

Phenol Radioaktivität (^{32}P dCTP; 3,000 Ci/mmol), RNase (Ribonuklease A)

10 ml Stock-Lösung: 9,8 ml destilliertes Wasser
100,0 μl 1 M Tris-HCl
100,0 μl 1,5 m NaCl
100,0 mg RNase A

SDS (Sodiumdodecylsulfat) = Natriumlaurylsulfat)

Alkalische SDS-Lösung (5 ml) 3,5 ml destilliertes Wasser
1,0 ml 1 N NaOH
0,5 ml 10% SDS

SSC (standard saline-citrate, Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer) Transferpuffer

175,3 g NaCl
88,2 g Natrium-Citrat
ad 1 l destilliertes Wasser pH 7,0 mit 10 N NaOH einstellen
(Autoklavieren).

SSPE (20 x) 175,3 g NaCl
27,6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
7,4 g EDTA
ad 1 l destilliertes Wasser, pH 7,4 mit 10 N NaOH einstellen

TBE (10 x)-Puffer 1 l Stammlösung 108 g Trisaminomethan
55 g Borsäure
40 ml EDTA
ad 1 l destilliertes Wasser, pH $\geq 8,3$

TE-Puffer 10 mM Tris-HCl (pH 7,5)
1 mM EDTA

Tris-HCl (Trisaminomethan, pH mit HCl eingestellt).

t-RNA (transfer-RNA)

8.1.2. Geräte

Siehe Anhang, Kapitel VIII, Abschnitt 1..

8.1.3. Isolierung von Gesamt-RNA aus Ribonuklease-reichem Gewebe

Es wurde die Einzelschritt-Mehode mit der Guanidinium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion angewendet, die von Dr. R. Zimmermann nach Absprache modifiziert wurde.

Das tiefgefrorene Biopsiegewebe wurde mit einem Mörser zerstoßen und gemahlen, eine Menge von 0,4 g abgewogen und in 4 ml der Lösung A bei 13500 Umdrehungen/min mit einem Mixstab homogenisiert. Ein Gemisch aus:

0,4 ml 3M Natrium-Acetat (pH 4,0)

4,0 ml Phenol

0,8 ml Chloroform-Isoamylalkohol

wurde in einem Verhältnis von (49:1 v/v) der Probe zugegeben. Daraufhin wurde das Probengemisch sofort umgewendet und auf einem Rüttler 5 min geschüttelt. Folgend wurde die Probe für 15 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (15 min, 10000 xg, 4°C) wurde die Oberphase abgenommen und die RNA durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol unter Parafilmabdeckung für mindestens 1 h gefällt^{922,923}. Die sedimentierte RNA wurde in 300 µl Lösung A resuspendiert, erneut mit einem Volumen Isopropanol für 30 min bei -20°C präzipitiert und durch Zentrifugation sedimentiert. Nach zweimaligem Waschen mit 70%igem Ethanol und Antrocknen im Lyophilisator wurde die Gesamt-RNA in 50-100 µl DEPC-ddH₂O rückgelöst und bei -80°C, à 20 µg aliquotiert und aufbewahrt. Ein Aliquot von 3 µl wurde zur Messung der optischen Dichte (OD) eingesetzt und hierfür in 500 µl destilliertem Wasser verdünnt.

8.1.4. Messung der optischen Dichte

Die optische Dichte (OD) wurde mit Hilfe eines Spektralfotometers in Präzisionsküvetten gemessen. OD entspricht der absorbierten Lichtmenge gemessen bei unterschiedlichen Wellenlängen. Es wurde die Wellenlänge 260 nm für OD₂₆₀ und 280 nm für OD₂₈₀ gewählt. Unter Zuhilfenahme des Extinktionskoeffizienten, der für verschiedene Nukleinsäuren unterschiedlich ist (liegt für DNA bei 50 und für RNA bei 40), wurde die Konzentration der Nukleinsäuren in der Lösung berechnet.

Somit entspricht die optische Dichte von 1 ungefähr 40 µg/ml für Einzelstrang-DNA und -RNA. Eine Lösung, die 40 µg/ml RNA enthält, hat eine Absorption von 1 bei 260 nm, d.h. OD₂₆₀ = 1 = 40 µg/ml⁹²⁴.

$\begin{aligned} \text{RNA-Konzentration in Wasser} &= \text{OD}_{260} \times 1 / \text{Verdünnung} \times 40/1000 \\ &= \mu\text{g RNA}/\mu\text{l H}_2\text{O} \end{aligned}$

Für die Aufbewahrung der RNA bei -80°C wurde der Probe das 2,5-fache Volumen 100%iges Ethanol (-20°C) hinzugegeben. Die RNA-Konzentration wurde dann folgendermaßen berechnet:

$$\begin{aligned} &\text{RNA-Konzentration im Wasser-Ethanol-Gemisch} \\ &= \mu\text{g RNA}/\mu\text{l H}_2\text{O} \times \mu\text{l H}_2\text{O} / (\text{Gesamtmenge H}_2\text{O} + \text{Ethanol}) \\ &= \mu\text{g RNA}/\mu\text{l H}_2\text{O-Ethanolgemisch} \end{aligned}$$

Bildet man die Relation, d.h. den Quotient der bei 260 nm und 280 nm gemessenen Extinktion, kann bei den berechneten Werten zwischen 1,9 und 2,0 die Reinheit des Nukleinsäure-Isolates bestätigt werden.

Liegt der Wert etwas niedriger, d.h. unter 1,8 deutet dies auf eine Verunreinigung der RNA-Lösung mit Phenolen bzw. auf die Anwesenheit von Proteinen hin⁹²⁵.

8.1.5. Gelelektrophoretische Auftrennung der RNA

Die Gelelektrophorese ermöglicht die Trennung unterschiedlich großer, geladener Moleküle im elektrischen Feld (Verfahren nach Lehrach et al., 1977).

Die Gelelektrophorese bietet die Möglichkeit, durch die negativ geladenen Phosphatgruppen der RNA-Moleküle im elektrischen Feld eine Auftrennung dem Logarithmus ihrer Kettenlänge entsprechend. Große Moleküle wandern langsamer, kleine Moleküle schneller in Richtung Anode. Als elektrisch neutrale dreidimensionale Trägermatrix dienen Agarosegele unterschiedlicher Konzentration. Wobei der prozentuale Anteil der Agarose die Porengröße eines Gels bestimmt. Eine hohe Konzentration führt zur Bildung kleiner Poren, die nur für kleine Nukleinsäurefragmente durchgängig sind. Langkettige Moleküle werden dagegen zurückgehalten. Es wurde wie bei *Brown et al.* beschrieben, ein horizontales Agarosegel in einem Gelschlitten mit Gelkamm gegossen⁹²⁶.

10 x MOPS-Puffer

0,2 M MOPS
80,0 mM Natriumacetat, pH 7,0
10,0 mM EDTA

RNA-Probenpuffer

50,0 %	(v/v)	Formamid
5,8 %	(v/v)	Formaldehyd, 37%ige Lösung
1	x	MOPS

RNA-Auftragspuffer

50,000 %	(v/v)	Glycerin
1,000 mM		EDTA
0,025 %	(w/v)	Bromphenolblau
0,025 %	(w/v)	Xylencyanol

Für die RNA-Gele mit einer Größe von 20 cm x 20 cm wurden 1% (w/v) Agarose in 1 x MOPS-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 60°C wurden 5,8% (v/v) Formaldehyd zugegeben. Nach der Verfestigung des Geles konnte der Gelkamm entfernt werden und es blieben kleine Geltaschen zurück, die jeweils mit 18 μ l Probe bestückt werden konnten.

Um eine erfolgreiche Auftrennung zu detektieren, wurde der Agaroselösung Ethidiumbromid zugefügt. Dies ist ein stark mutagener, fluoreszierender Farbstoff, welcher sich durch seine aromatische Struktur bevorzugt parallel zwischen benachbarte Basen einlagert. Je Probe wurden 15 μ g RNA (gelöst im Wasser-Ethanol-Gemisch) für 30 min in einer auf 4°C vorgekühlten Vakuumzentrifuge in einem offenen Reagiergefäß reduziert. Nach Zugabe von 16 μ l RNA-Ladungspuffer und 1 μ l Ethidiumbromid (1 ng/ml) wurde die Probe zur RNA-Entfaltung 15 min bei 64°C geschüttelt und anschließend auf Eis gestellt. Vor dem Befüllen der Gele mit den RNA-Proben in die Slots wurden 2,5 l MOPS-Laufpuffer in die Gelkammer gefüllt. Zur Bestimmung der Transkriptionsgrößen wurde ein RNA-Längenstandard aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 5 V/cm und 4°C für 3 h in 1 x MOPS-Puffer. Nach 30 min wurde die Umwälzpumpe zur Zirkulation des Laufpuffers angestellt. Alternativ erfolgte die Elektrophorese bei 1-2 V/cm für 16-20 h. Zur Überprüfung der Integrität der aufgetrennten RNA wurde ein Streifen mit Gesamt-RNA und dem RNA-Längenstandard vom Gel abgetrennt und die RNA unter UV-Licht ($\lambda = 302$ nm) sichtbar gemacht.

8.1.6. Fotografie

Für die Fotografie eines Gels nutzt man die Wirkung von Ethidiumbromid aus. Dies wirkt vor allem durch Interkalation, d.h. Einlagerung zwischen benachbarten Basenpaaren in ein doppelsträngiges DNA-Molekül und führt zu einer Entwindung der Doppelhelix. Über UV-Licht Einstrahlung ($\lambda = 254-305$ nm) werden die Nukleinsäure-Fragmente durch Fluoreszenz als Banden (Emission von orange-

farbenem Licht im sichtbaren Bereich von 500-590 nm) sichtbar. Voraussetzung ist eine ausreichende Nukleinsäuremenge von mindestens 25 ng auf dem Gel. Die Intensität des emittierten Lichtes ist proportional zur Menge der eingelagerten Ethidiumbromid-Moleküle. Die charakteristischen RNA-Merkmale sind die 18S- und 28S-Banden. S steht hierbei für die Svedberg-Einheit, wobei die 18S- bzw. 28S-Bande einer Größe von 2366 bzw. 6333 Nukleotiden entspricht⁹²⁴.

8.2. Spezielle Verfahren

8.2.1. Blot-Hybridisierung

8.2.1.1. Northern-Blot

Der Northern Blot ist ein Verfahren, bei dem über die Einwirkung kapillärer Kräfte die elektrophoretisch aufgetrennte RNA aus dem Gel auf eine immobilisierende Nylonmembran übertragen wird. Dem Prinzip liegt zugrunde, dass die positiv geladene Membran eine starke Bindung von negativ geladenen Nukleinsäuren ermöglicht⁹²⁷. Geblottet wurde Gesamt-RNA von unverändertem Kontrollgewebe aus dem NRG und RG von KHB/DMSO behandelten Schweinen sowie von Myokardgewebe des NRG und RG der mit Actinomycin-D (0,22 mg/kg KGW) behandelten Schweine. Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben von *Zhou et al.*⁹²⁸. Der Vorteil dieser Methode mit abwärts gerichteter kapillarer Kraft liegt darin, dass eine feuchte Papierschicht den Transferprozess nicht verzögert, wie es bei dem aufwärts gerichteten Kapillartransfer der Fall sein kann. Bevor das Gel in die Transferapparatur gelegt wurde, wurde es für 5 min in Wasser geschwenkt, um das Formaldehyd zu entfernen. Ein weiterer Waschschrift für 5 min in 10 x SSC + DEPC folgte. Anschließend wurde es auf die ebenfalls mit 10 x SSC + DEPC befeuchtete Membran gelegt. Zur Markierung und späteren Orientierung wurde an der Membran und dem Gel jeweils die linke obere Ecke abgeschnitten. Die Größe der Membran sollte hierbei genau der Gelgröße entsprechen. Es musste ebenfalls darauf geachtet werden, dass beim Auflegen des Gels Luftblasen vermieden wurden, die einen Transfer verhindert hätten. Die Papierschicht wurde durch Plastikfolie vor dem Kontakt mit Laufpuffer geschützt. Der Blot wurde mit einer Glasplatte abgedeckt, mit einem Gewicht von 500 g beschwert und in eine Schale mit Laufpuffer (10 x SSC) gestellt. Das Gel-Blotting Papier musste während des gesamten Verfahrens in den Laufpuffer eingetaucht bleiben. Nach 16 bis 18 h wurde die Membran 2-3 min in 2 x SSC + DEPC unter stetigem Schwenken gespült, damit Reste der Agarose entfernt wurden. Anschließend wurde sie in Gel-Blotting-Papier eingewickelt und für 1 Stunde getrocknet. Die Fixierung der RNA erfolgte

automatisch durch „Crosslinken“ mit UV-Licht (in einem UV-Stratalinker) mit einer Energie von 1200 μ Joule x 100.

8.2.1.2. Prähybridisierung

Für die Prähybridisierung wurde die Membran mit der RNA-Seite nach innen in eine Glashybridisierungsröhre (Länge: 26,5 cm; Durchmesser: 4 cm) gelegt.

Pro Röhre wurden 10 ml Puffer hergestellt:

- 5,00 ml deionisiertes Formamid (= 50%)
- 2,00 ml Dextransulfat
- 2,00 ml 5 x P-Puffer
- 0,58 g NaCl (1M)
- 100 μ g/ml Heringssperma-DNA

Die Heringssperma-DNA musste vor Gebrauch für 10 min bei 95°C denaturiert werden. Die Prähybridisierung fand bei 42°C für 3-4 h in einem Hybridisierungssofen statt. Hierbei wurden die Röhren um ihre Längsachse horizontal rotiert.

8.2.1.3. Markierung einer Hybridisierungssonde (Random primed oligo-labeling)

Die Sonden waren in Vektoren inkloniert. Sie wurden für die Markierung in einen Restriktionsansatz mit einem passenden Restriktionsenzym aus dem Vektor herausgeschnitten, auf ein Gel aufgetragen und mit Glasmilch (Geneclean® II Kit) isoliert.

Es handelte sich um folgende Sonden (cDNAs)

c-Jun: Die cDNA des c-Jun Transkriptionsfaktors gehört zu den „early response genes“ und bildet mit Fos ein Heterodimer. Schnelle Aktivierung findet vor allem in Mitogen-stimulierten Fibroblasten statt. Die Nukleotidgröße beträgt 2,722 kb. Es ist auf dem Chromosom 1 p32-p31 lokalisiert. Das Protein besitzt ein Molekulargewicht von 39 kDa, (freundlicherweise von Dr. R. Bravo zur Verfügung gestellt).

ATF-2: c-AMP response element (CRE-BP1) binding protein; activating transcription factor-2. Kurzbezeichnung: plaf-hATF2. Die cDNA besitzt eine Größe von 2,4 kb. Transfiziert durch das Bakterium DH10B. Durch das Enzym amp- β -gal aus dem Vektor Lafmid BA herausgeschnitten. Lokalisiert auf dem Chromosom 2: q32 (IMAGp998D16283; RZPD, Berlin).

Elk-1: Gehört zu der Familie der ETS-Domän-Proteine. Stimuliert die Transkription von Genen, indem eine Bindung an purinreiche DNA-Sequenzen stattfindet. Nukleäres Phosphoprotein (44 kDa), stimuliert durch die drei Familien der MAPKs. Tertiär-Komplex mit den Ets- und SRF-Bindungsmotiven des Fos-serum response elements. Chromosomale Lokalisation: Chromosom 10 p11.2 (IMAGp998E173968; RZPD, Berlin).

c-Fos: Die cDNA des human cellular FBJ osteosarcoma oncogene homologue. Nukleäres Phosphoprotein, bildet eine nicht-kovalente Bindung mit dem c-Jun/AP-1 Transkriptionsfaktorkomplex. Die c-Fos Expression wird durch eine Vielzahl von Stimuli gesteigert, wie z.B. Wachstumsfaktoren, Zytokine, Neurotransmitter, Polypeptid-Hormonen und v.a.. Chromosomale Lokalisation: Chromosom 14 q24.3. Die Nukleotidgröße beträgt 2,2 kb. Das Protein besitzt ein Molekulargewicht von 40 kDa (ATCC41042, Rockville, USA).

c-Myc: Human cellular avian myelocytomatosis oncogene homologue. Nukleäre Lokalisation, Transkriptionsfaktor, vor allem an der Transkription von Wachstumsfaktor-regulierten Genen beteiligt. Lokalisiert auf Chromosom 8 q24.12-q24.13. Die Nukleotidgröße beträgt 2,7 kb. Das Protein besitzt ein Molekulargewicht von 48 kDa (PCR-Produkt; freundlicherweise von Dr. H.S. Sharma zur Verfügung gestellt).

Eine Mischung von Zufalls-Hexanukleotiden wurde verwendet, um die DNA-Synthese *in vitro* zu starten. Als Matrize diente eine für die Sonde entsprechende lineare Doppelstrang-cDNA, die denaturiert wurde. Hexanukleotide lagerten sich an und der komplementäre Strang wurde unter Einbau des radioaktiv markierten dCTPs synthetisiert. Auf diese Weise konnten Sonden mit extrem hoher spezifischer Aktivität hergestellt werden. Mit Markierungssystemen wurden 25 ng Matrizen-DNA radioaktiv markiert (Prime-a-gene® Labeling System, Rediprime DNA labelling system, Prime-It®RmT random Primer Labeling Kit, Ready-to-go DNA-labelling Kit).

Die einzelnen Komponenten wurden auf Eis gelagert und langsam aufgetaut. Das wärmeempfindliche Klenow-Enzym wurde bei -20°C aufbewahrt. Die DNA, die als Sonde benutzt werden sollte, wurde in Wasser gelöst und bei 95°C für 5 min denaturiert. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurden folgende Komponenten zugegeben:

- 10 μ l 5 x Markierungspuffer
- 2 μ l dNTP-Mix (dATP, dTTP, dGTP), -je dNTP 20 μ M
- 2 μ l nukleasefreies BSA (400 μ g/ml)

Im S1-Radioaktivlabor der Sicherheitsstufe 1:

4 μl ^{32}P dCTP (50 μCi)

1 μl Klenow-Enzym (5 Units)

Nach sorgfältigem Mischen wurde bei Raumtemperatur für 60 min inkubiert. Die Reaktion wurde bei 95°C innerhalb von 5 min abgestoppt und die Probe auf Eis gestellt. Entweder konnte sie sofort verwendet werden oder für den späteren Verbrauch bei -20°C gelagert werden.

8.2.1.4. Papierchromatografie

Die Papierchromatografie dient der Bestimmung der eingebauten radioaktiv markierten Nukleotide.

Auf einem Chromatografiepapier-Streifen wurde 1 μl der markierten Probe aufgetragen und der Streifen zwischen zwei Objektträgern eingeklemmt und in eine 0,5 M KH_2PO_4 -Lösung gehängt. Nach ca. 15-20 cm Laufstrecke wurde der Streifen unter Rotlicht getrocknet, in eine obere und untere Region getrennt und die Radioaktivität mittels Szintillationszähler gemessen. In die untere Region wanderten die nicht eingebauten freien Nukleotide.

$$\text{Cpcm eingebaut} / \text{Gesamt-cpm} \times 100\% = \% \text{ Einbau}$$

Auf 1 ml Hybridisierungspuffer wurde 10^6 cpm (bezogen auf die eingebaute Radioaktivität) eingesetzt.

8.2.1.5. Hybridisierung

Die berechnete Menge der markierten Probe wurde aufgeköcht, kurz auf Eis abgekühlt, abzentrifugiert und in den Puffer der Hybridisierungsröhre gegeben. Die Hybridisierung erfolgte für 16 bis 20 h im Hybridisierungssofen, wie auch die Prähybridisierung, bei 42°C unter nicht stringenten Bedingungen (50% deionisiertes Formamid, 1 M NaCl). Deionisiertes Formamid erniedrigt in einer Konzentration von 1% die Schmelztemperatur von DNA um 72°C. Es geht eine Verbindung mit der Aminogruppe von Adenin ein und verhindert auf diese Weise die Bildung von A-T-Basenpaaren. Die Folge ist eine Denaturierung von doppelsträngiger DNA ⁹²⁵.

8.2.1.6. Waschen der Membran

Die Membran wurde in der Waschlösung in einer Glasschüssel im Wasserbad geschwenkt.

2 x	5 min in	2 x SSC + 0,1% SDS bei Raumtemperatur
2 x	15 min in	2 x SSC + 0,1% SDS bei 42°C
2 x	5 min in	0,2 x SSC + 0,1% SDS bei 42°C
2 x	5 min in	0,2 x SSC + 0,1% SDS bei 68°C

8.2.1.7. Autoradiografie

Mit der Autoradiografie können Radionukleotide über Filmschwärzung nachgewiesen werden. Die auf den Film einwirkende Strahlung, hier γ -³²P-CTP, bewirkt über Ionisationsprozesse eine Freisetzung von Elektronen, die zur Reduktion von Silberionen zu atomarem Silber (schwarz) führen. Die entwickelten Filme bezeichnet man als Autoradiogramme. Bei ³²P handelt es sich um energiereiche Strahlung, welche einen entsprechenden Schutz durch Plexiglasabschirmung bzw. Schutzbrille erfordert⁹²⁵.

Die Membranen wurden in Röntgenkassetten mit eingebauten Verstärkerfolien verbracht. Diese Verstärkerfolien arbeiten nach dem Szintillationsprinzip bei -80°C. Die radioaktiven Membranen wurden mit einem Röntgenfilm in Kontakt gebracht, welcher 24 h oder länger auflag. Die Filme wurden in der Dunkelkammer aufgelegt und nach ausreichender Exposition in der Entwicklungsmaschine entwickelt. Ein Signal macht eine weitgehend eindeutige Aussage über das Vorliegen einer gesuchten RNA-Sequenz, die mit einer spezifischen Sonde hybridisiert hat.

Lagen nur schwache Signale vor, wurde die Membran mit kochendem 0,1%-igem SDS übergossen und 30 min bei Raumtemperatur schwenkend dehybridisiert. Eine Membran wurde bis zu sechsmal für die Hybridisierungen genutzt. Dabei war es jedoch möglich, dass RNA mit jeder Dehybridisierung zum Teil abgewaschen wurde.

9. Auswertung und Statistik

Die Datenaufarbeitung, Auswertung und grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Programms Excel (Microsoft Corporation). Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert mit den zugehörigen Standardfehlern dargestellt. Die

vergleichende Statistik wurde mittels SigmaStat durchgeführt. Die verwendeten Tests waren bei gegebenen Voraussetzungen die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) bzw. bei abhängigen Stichproben die Varianzanalyse für Messwiederholungen (RM ANOVA). Andernfalls kamen der Kruskal-Wallis-Test bzw. der Friedman-Test in Frage. Zum Vergleich zweier Gruppen, unabhängiger oder abhängiger Stichproben, wurden der t-Test bzw. alternativ der Mann-Whitney oder Wilcoxon-Test benutzt. In allen Fällen wurde ein Ergebnis mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als signifikant anerkannt.

IV. ERGEBNISSE

1. Etablierung eines *in-vivo*-Modells des Schweines zur Quantifizierung von Infarkten nach der Applikation MAPKs-inhibierender Substanzen

Es wurde ein Modell etabliert, das die Rolle der Mitogen-aktivierten-Proteinkinasen-Signalvermittlung während eines ischämischen Präkonditionierungsprotokolls (IP) aufzeigte. Die MAPKs-Transduktionskaskaden wurden im Schweineexperiment durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren blockiert und die Auswirkungen dieser Inhibition auf die IP-erzeugte Kardioprotektion durch Bestimmung der Infarktgröße dargestellt. Die Aktivitätsverminderung der MAPKs durch die Inhibition wurde des Weiteren über den Grad ihrer Phosphorylierung sowie der ihrer nachgeschalteten Substrate und Transkriptionsfaktoren bestimmt.

Mittels des etablierten Modells am Schwein wurden Versuchsprotokolle ohne Präkonditionierung durchgeführt, d.h. Experimente, die nur die alleinige Indexischämie und die folgende Reperfusion beinhalteten. Diese Protokolle stellten die Kontrollen im Vergleich zu den Präkonditionierungsprotokollen dar. Zusätzlich wurden Versuche unter Verwendung der Kontrollversuchsprotokolle mit systemischer bzw. intramyokardialer Applikation der Testsubstanzen benutzt, sodass der Vergleich zu den Präkonditionierungsprotokollen mit Substanzapplikation ersichtlich wurde.

Die Kontrollgruppen zu den Versuchen der systemischen Substanzapplikation waren die Versuchsgruppen I, III und IV (Tab. 5). In allen durchgeführten Kontrolluntersuchungen wurde das Lösungsmittel KHB/DMSO (Krebs-Henselleitpuffer / DMSO) infundiert, da es als Lösungsmittel aller verwendeten MAPKs-Inhibitoren fungierte. DMSO wurde entsprechend der zum Lösen der Testsubstanzen notwendigen Konzentration von 0,1% verwendet. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede ($p < 0,001$) der Infarktgrößen im Vergleich zu den zuvor durchgeführten Pilotversuchen ohne Applikation des Lösungsmittels aufgezeigt werden.

In den Versuchen der lokalen intramyokardialen Mikroinfusion wurde über ein Nadelpaar nur das Lösungsmittel der Substanzen verabreicht. Dies stellte für die folgenden Biopsieentnahmen, neben dem ischämischen Risikogebiet ohne Substanzapplikation und dem Nicht-Risikogebiet, das wichtigste Myokardareal dar, da diese Nadeln ebenfalls in das erwartete ischämische Myokard platziert wurden.

Die Diffusion der Substanzen bei der Anwendung der intramyokardialen Applikationsform erfolgte unter Berücksichtigung ihrer Diffusionskoeffizienten und der vorherrschenden Konzentrationsunterschiede im perfundierten Myokard. Dies bedeutet, dass bei einem Koeffizienten von 1 die infundierte Stoffmenge pro Sekunde einen Quadratzentimeter des Myokards passierte.

Alle experimentell untersuchten Substanzen der vorliegenden Arbeit wurden vor ihrer Anwendung in den genannten Ischämie- oder Präkonditionierungsprotokollen durch eine intramyokardiale Infusion in nicht ischämisches Myokard getestet. Hierdurch konnte festgestellt werden, ob die alleinige Substanzapplikation ohne Ischämie Nekrose induzierte. Diese Pilotversuche zeigten negative Ergebnisse für alle verwendeten Substanzen, d.h. um die jeweiligen Infusionsnadeln der Substanzen konnte kein Infarkt festgestellt werden.

1.1. Ermittlung der Infarktgröße am etablierten Schweinemodell

Die Infarktgröße (IGr) berechnete sich aus dem Quotienten des Infarktgebietes (IG) relativ zum Risikogebiet (RG). Die Planimetrierung wurde distal der Okklusionsstelle des Ramus interventricularis paraconalis, additiv aus sechs Abbildungen der Herzscheiben des linken Ventrikels unter Einbeziehung des Scheibengewichtes durchgeführt (siehe Abschnitt 3.4.2.3. Material und Methode).

Das Verhältnis aus der Größe des Risikogebietes (RG) und der Gesamtgröße des linken Ventrikels (LV) wurde bei jeder Herzscheibe mit bestimmt und ein Mittelwert pro ausgewertetem Herz errechnet. Varianzen gleicher Ausprägung, von größeren Werten der basalen Scheiben, zu kleineren Werten der apikalen Scheiben waren in allen Versuchen zu beobachten. Der Vergleich der Mittelwerte des Quotienten aus RG/LV zwischen den Gruppen erbrachte jedoch keine Unterschiede der Werte.

Die nachfolgenden Abbildungen der Herzscheiben stellen nur eine kleine Auswahl des gesamten dokumentierten Materials dar. Sie geben jedoch einen repräsentativen Querschnitt der gefundenen Veränderungen des jeweiligen Versuchsprotokolls wieder.

1.2. Wahl des Präkonditionierungsprotokolls zur Testung der MAPKs-Inhibitoren PD98059, UO126, Taxol und Actinomycin-D

Erste Versuche der Arbeit erbrachten die Erkenntnis, dass das Präkonditionierungsmodell 1 (Versuchsgruppe III) mit zwei Präkonditionierungszyklen

10 minütiger Ischämie gefolgt von 30 minütiger Reperfusion und anschließender 60 minütiger Indexischämie und 60 minütiger Reperfusion im Vergleich geringere Infarktreduktion erzielte, als zweimalig 10 min Ischämie und 10 min Reperfusion, gefolgt von einer 40 minütigen Indexischämie und 60 minütiger Reperfusion (Präkonditionierungsprotokoll 2; Versuchsgruppe IV). Aufgrund dieser Ergebnisse und der Intention, lokale intramyokardiale Infusionen von MAPKs-Inhibitoren durchzuführen, die Infarkte induzierten, wählten wir das Präkonditionierungsmodell 2 aus, welches eine definitive ja- oder nein-Antwort der Infarktbewertung zuließ. Das Präkonditionierungsprotokoll 2 mit einem durch Präkonditionierung nahezu vollständig geschützten Myokardgebiet, ermöglichte die eindeutige Bewertung der Inhibitorenwirkung. Man konnte davon ausgehen, dass die Infarkte allein aufgrund der Inhibitorenwirkung entstanden.

1.3. Wahl des Indexischämieprotokolls zur Untersuchung des p38-MAPKs-Inhibitors SB203580

Erste Versuche mit der SB203580-Substanz zeigten im Gegensatz zu den anderen Testsubstanzen eine kardioprotektive Wirkungsweise. Daher musste ein Indexischämieprotokoll gewählt werden, welches relativ große Infarkte produziert, um eine signifikante Reduktion der Infarktgröße durch SB203580 erzielen zu können. Es wurde das Kontrollprotokoll 1 (Versuchsgruppe I) mit 60 min Ischämie und folgender Reperfusion von 60 min ausgewählt.

1.4. Auswirkungen der Substanzapplikationen auf die dokumentierten hämodynamischen Parameter des Schweinmodells

Weder die systemische noch die lokale intramyokardiale Applikation der getesteten Substanzen verursachten Veränderungen des Blutdruckes und der Herzfrequenz im Vergleich zu Kontrollversuchen. Bedingte Blutdrucksenkungen und Frequenzschwankungen während der Ischämiephase der Protokolle waren sowohl in den Kontroll- als auch Testgruppentieren zu beobachten. Während der ersten fünf Minuten der Ischämiephasen der Präkonditionierung und Indexischämiephase konnte eine Frequenzsteigerung um 20% des Basiswertes beobachtet werden. Die Tiere stabilisierten sich jedoch zumeist ab einer Ischämiedauer von 30-40 min und erreichten die Ausgangswerte von ~70-90 mmHg des Blutdruckes und eine Frequenz von 60-70 Schlägen/min. Mit Einsatz der Reperfusion konnten stets Reperfusionsarrhythmien festgestellt werden. Es wurden Extrasystolen sowie idiopathische ventrikuläre Rhythmen (ventrikuläre Tachykardien) beobachtet. Sie gaben uns die Sicherheit der stattfindenden Reperfusion. Eventuell waren ein bis

zwei Defibrillationen im Bereich von 100-200 J notwendig, häufig fand jedoch eine autonome Regulation des Sinusrhythmus statt. Während der gesamten Phase der Reperfusion war der Blutdruck konstant niedriger (~30%) als zu Beginn des Versuches und während der Ischämiephase. Werte zwischen 45-60 mmHg wurden hierbei notiert.

2. Übersicht über die planimetrisch bestimmten Infarktgrößen der Tiere der verschiedenen Versuchsgruppen

Aufgrund der Vielzahl der angewendeten Versuchsprotokolle und der Verwendung fünf verschiedener Inhibitoren der MAPKs-Kaskade befindet sich bereits zu Beginn dieses Ergebnisteils eine tabellarische Aufzeichnung (Tab. 5) der nachfolgend anhand von Abbildungen und grafischen Darstellungen aufgeführten Infarktgrößen der sieben Versuchsgruppen.

3. Infarktgrößendarstellung der Tiere der Ischämie- und Präkonditionierungsprotokolle ohne Testsubstanzapplikation

3.1. Infarktgröße der Tiere der Versuchsgruppe I

Dieses Ischämie/Reperusionsprotokoll mit 60 min Ischämie und 60 min Reperfusion stellte unsere Kontrolle 1 dar. Es wurde nach Beendigung des Versuchsprotokolls eine Infarktgröße von $69,3 \pm 2,7\%$ des Risikogebietes festgestellt. Dies stellte im Vergleich zum Präkonditionierungsprotokoll 1 (IGr: $21,9 \pm 3,3\%$, s. Abschnitt 3.3.) dessen kardioprotektives Potenzial dar. Des weiteren konnten wir eine signifikant ($p < 0,05$) gesteigerte Infarktgröße gegenüber dem zweiten Kontrollprotokoll (Versuchsgruppe IV; IGr: $54 \pm 2,5\%$, siehe Abschnitt) mit 40 min Ischämie gefolgt von 60 min Reperfusion beobachten (Abb. 25 und 29).

3.2. Infarktgröße der Tiere der Versuchsgruppe IV

Dieses Ischämie/Reperusionsprotokoll stellte die zweite Kontrollgruppe der Studie dar. Die Infarktgröße betrug nach 40 min Ischämie und 60 min Reperfusion $54,0 \pm 2,5\%$ des Risikogebietes (Abb. 26 und 29).

Tab. 5: Tabellarische Aufzeichnung der Infarktgröße der verschiedenen Versuchsgruppen (I-VII). CO: Koronare Okklusion; RP: Reperfusion; IP: ischämische Präkonditionierung; syst.: systemische Applikation der Substanz; i. myok.: intramyokardiale Applikation der Substanz; Actino-D: Actinomycin-D; kg KGW: pro Kilogramm Körpergewicht.

Gruppe	experimentelles Protokoll	Infarktgröße (IGr) %
I	syst. KHB / DMSO + CO 60' / RP 60'	69,3 ± 2,7%
II	syst. SB203580 + CO 60' / RP 60'	0,17 mg / kg KGW: 36,1 ± 5,6%
II	i. myok. SB203580 + CO 60' / RP 60'	40 nM: 36,8 ± 3,7%
III	syst. KHB / DMSO + IP 1 + CO 60' / RP 60'	21,9 ± 3,3%
IV	syst. KHB/DMSO + CO 40' / RP 60'	54 ± 2,5%
IV	syst. UO126 + CO 40' / RP 60'	0,12 mg / kg KGW: 69,8 ± 3,8%
IV	syst. Taxol + CO 40' / RP 60'	0,17 mg / kg KGW: 65,4 ± 1,7%
IV	syst. Actino-D + CO 40' / RP 60'	0,05 mg / kg KGW: 78,5 ± 3,8%
IV	i. myok. PD98059 + CO 40' / RP 60'	50 µM: 59,4 ± 1,9%
V	syst. KHB / DMSO + IP 2 + CO 40' / RP 60'	2,5 ± 0,75%
VI	syst. SB203580 + IP 2 + CO 40' / RP 60'	0,17 mg / kg KGW: 3,2 ± 0,5%
VI	syst. UO126 + IP 2 + CO 40' / RP 60'	0,25 mg / kg KGW: 68,7 ± 2% 0,22 mg / kg KGW: 54,6 ± 0,5% 0,12 mg / kg KGW: 41,6 ± 1,2%
VI	syst. Taxol + IP 2 + CO 40' / RP 60'	0,17 mg / kg KGW: 40,1 ± 4,2%
VI	syst. Actino-D + IP 2 + CO 40' / RP 60'	0,12 mg / kg KGW: 88,6 ± 1,7% 0,05 mg / kg KGW: 65,6 ± 1,5%
VII	i. myok. KHB/DMSO + IP 2 + CO 40' / RP 60'	3,8 ± 0,5%
VII	i. myok. SB203580 + IP 2+ CO 40' / RP 60'	40 nM: 3,8 ± 0,5%
VII	i. myok. PD98059 + IP 2+ CO 40' / RP 60'	50 µM: 28 ± 2% 25 µM: 20,3 ± 2% 12,5 µM: 8,8 ± 1,3% 6,25 µM: 3,2 ± 0,2%
VII	i. myok. UO126 + IP 2+ CO 40' / RP 60'	50 mM: 36,5 ± 2% 50 µM: 32,5 ± 1% 50 nM: 5,5 ± 0,75%
VII	i. myok. Taxol + IP 2+ CO 40' / RP 60'	100 nM: 34,1 ± 2,6% 50 nM: 28 ± 3,2%
VII	i. myok. Actino-D + IP 2+ CO 40' / RP 60'	50 µM: 39,4 ± 4,8% 25 µM: 26,4 ± 1,8% 12,5 µM: 15,6 ± 2,3%

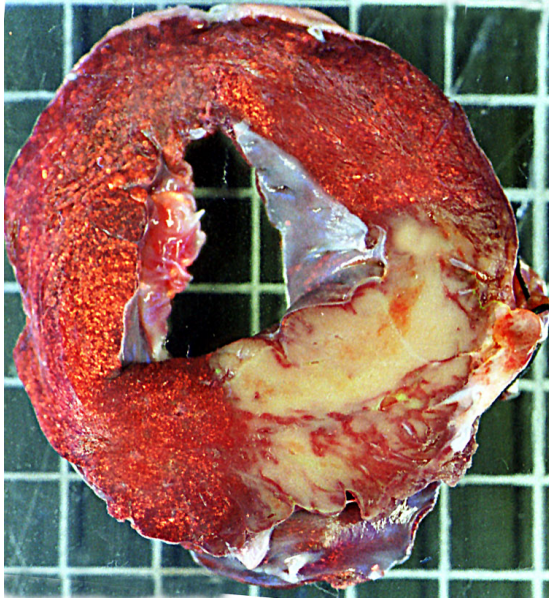


Abb. 25: Abbildung der basalen Schnittansicht einer Herzscheibe eines Tieres der Kontrollgruppe 1 (Versuchsgruppe I). Das Infarktgebiet zeigt sich als weißes, TTC-ungefärbtes Myokardareal, im ansonsten purpurot gefärbten Risikogebiet des linken Ventrikels.

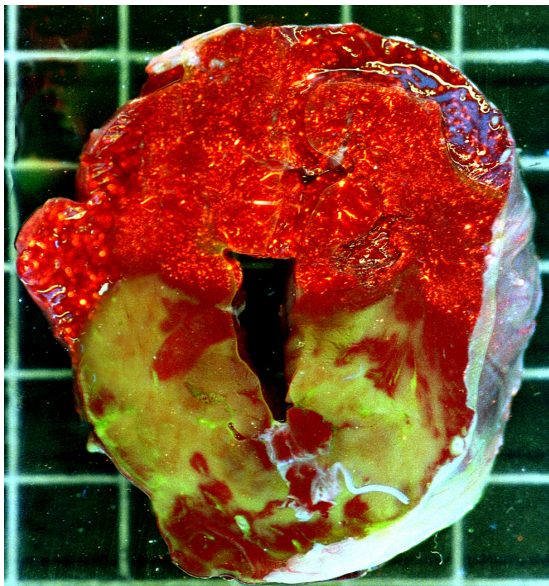


Abb. 26: Apikale Schnittansicht einer Herzscheibe eines Tieres der Kontrollgruppe 2 (Versuchsgruppe IV mit KHB/DMSO-Applikation). Das Infarktgebiet zeigt sich als weißes, TTC-ungefärbtes Myokardareal, im ansonsten purpurot gefärbten Risikogebiet des linken Ventrikels. Das Risikogebiet grenzt sich vom Nicht-Risikogebiet durch die Abwesenheit der orange-fluoreszierenden Mikrosphären ab.

3.3. Infarktgröße der Tiere der Versuchsgruppen III und V

Die Infarktgröße der Tiere der Versuchsgruppe III betrug $21,9 \pm 3,3\%$ des Risikogebietes, es stellte unser Präkonditionierungsprotokoll 1 dar. Eine signifikante ($p < 0,02$) Reduktion der Infarktgröße im Vergleich zur Kontrollgruppe 1 = Versuchsgruppe I (IGr: $69,3 \pm 2,7\%$) war zu beobachten. In der Versuchsgruppe V wurde das Präkonditionierungsprotokoll 2 abgehandelt. Hier wurde eine Infarktgröße von $2,5 \pm 0,75\%$ des Risikogebietes festgestellt. Dies stellte eine signifikante ($p < 0,02$) Reduktion gegenüber der Kontrollgruppe 2 = Versuchsgruppe IV mit KHB/DMSO-Infusion und einer Infarktgröße von $54 \pm 2,5\%$ dar (Abb. 27, 28 und 29).

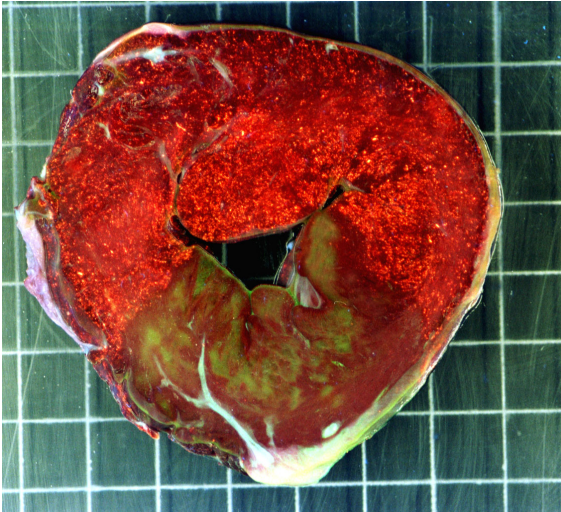


Abb. 27: Herzscheibe in apikaler Ansicht. Die Abbildung zeigt die Scheibe eines Tieres nach dem Ischämischen Präkonditionierungsprotokoll 1 (Versuchsgruppe III).

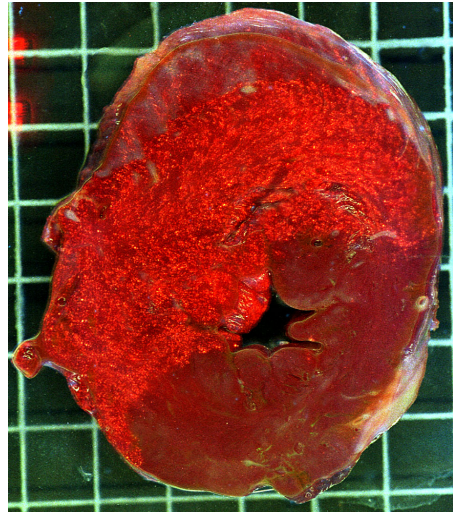


Abb. 28: Herzscheibe eines Tieres nach dem Ischämischen Präkonditionierungsprotokoll 2 (Versuchsgruppe V). Die Abbildung zeigt die Scheibe in apikaler Ansicht.

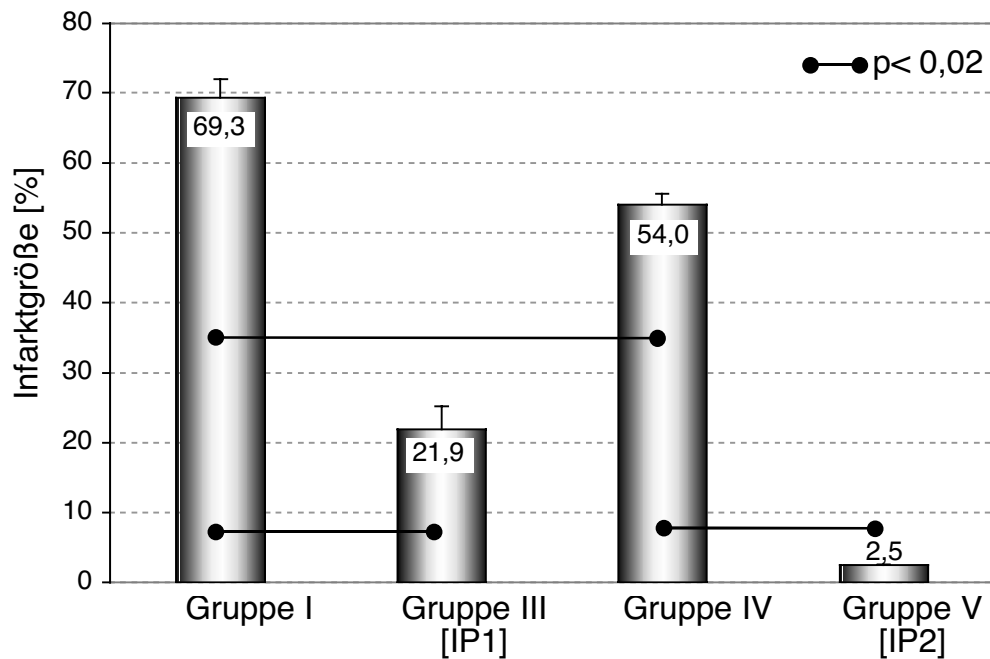


Abb. 29: Darstellung der Infarktgröße (IGr in Prozent der Fläche des Risikogebietes des linken Ventrikelmyokards) der Indexischämiekontrollgruppen (Versuchsgruppe I = Kontrollgruppe 1 und Versuchsgruppe IV = Kontrollgruppe 2) im Vergleich zu den jeweiligen Präkonditionierungsprotokollen.

IP = ischämische Präkonditionierung.

4. Untersuchung der p38-MAPKs-Kaskade mittels des spezifischen Inhibitors SB203580

4.1. Infarktgröße der Tiere der Versuchsgruppe II

In diesem Abschnitt der Arbeit wurde der Effekt der lokalen und systemischen intramyokardialen SB203580-Applikation auf die Infarktentstehung nach 60 min Indexischämie und 60 min Reperfusion ohne vorgeschaltetem Präkonditionierungsprotokoll untersucht.

Es wurde zur Testung der intramyokardialen Applikation der SB203580-Substanz das Indexischämieprotokoll 1 ausgewählt. Hierdurch konnte die protektive Wirkung des p38-MAPKs Inhibitors in einem großflächig infarzierten Risikogebiet beurteilt werden.

Die lokale intramyokardiale Mikroinfusion von SB203580 erfolgte in diesem Versuchsabschnitt 60 min vor der Indexischämie mit einer Konzentration von 40 nM, einer Infusionsgeschwindigkeit von 20 μ l/h (siehe Abschnitt Versuchsprotokoll; Gruppe II). Durch die SB203580-Applikation wurde eine signifikante ($p < 0,02$) Infarktgrößenreduktion auf Werte von $36,8 \pm 3,7\%$ des Risikogebietes im Vergleich zur Kontrollgruppe 1 ($69,3 \pm 2,7\%$) erzielt (siehe Abschnitt Versuchsprotokoll; Gruppe I). Makroskopisch konnten geschützte Myokardgebiete von keilförmiger Gestalt um die Mikroinfusionsnadeln beobachtet werden, die sich inmitten von nekrotischem, TTC-ungefärbtem Myokardgewebe befanden (Abb. 6A und 7). In den Kontrollversuchen wurden über die Infusionsnadeln das Lösungsmittel von SB203580, KHB/DMSO (Konzentration von DMSO 0,1%) verabreicht. Hierbei konnte keine Protektion im Diffusionsgebiet des Lösungsmittel eruiert werden, d.h. um die Nadeln war TTC-ungefärbtes, weiß-infarziertes Myokard zu sehen.

Die intravenöse systemische Gabe von SB203580 erfolgte in einer Dosierung von 0,17 mg/kg KGW für die Dauer von 60 min vor der 60 minütigen Indexischämie (siehe Protokoll; Gruppe II). Auch bei dieser Applikationsform von SB203580 wurde eine signifikante ($p < 0,02$) Infarktgrößenverminderung von $36,1 \pm 5,6\%$ des Risikogebietes im Vergleich zur Kontrollgruppe 1 (IGr: $69,3 \pm 2,7\%$) erzielt (siehe Protokoll; Gruppe I) (Abb. 30B und 31). Die nach systemischer SB203580-Gabe entstandenen Infarkte waren von punktförmiger Gestalt und unterschieden sich deutlich von dem soliden Charakter der Infarkte der Kontrollgruppen, die sich von subendokardialen Regionen nach subepikardial ausbreiteten.

In der dargestellten Versuchsreihe wurde SB203580 in einer Konzentration von 0,17 mg / kg KGW appliziert. Dabei verstarben drei der insgesamt 27 behandelten Tiere zu einem frühen Zeitpunkt der Ischämie (10.-20. min).

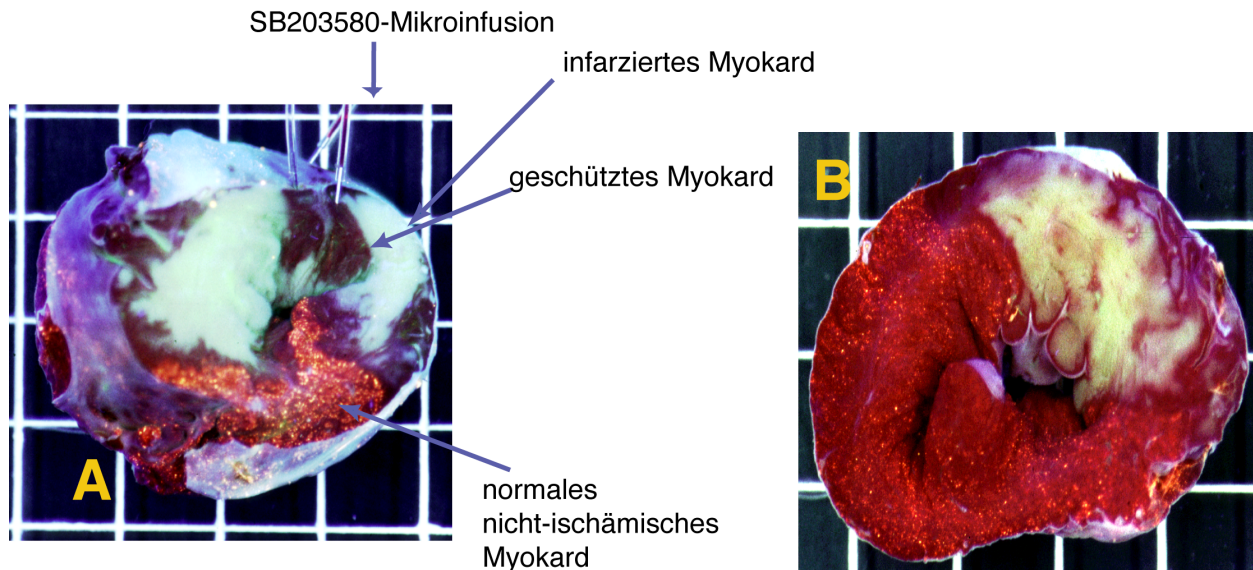


Abb. 30: **A** Apikale Schnittansicht einer Herzscheibe nach lokaler intramyokardialer SB203580 Mikroinfusion (40 nM). Geschützte, TTC-ungefärbte Myokardareale sind um die Mikroinfusionsnadeln zu erkennen. **B** Basale Ansicht einer Herzscheibe nach systemischer SB203580 Applikation (0,17 mg/kg KGW). Das weiße, TTC-ungefärbte Infarktgebiet befindet sich in den endokardialen Abschnitten des Risikogebietes. Geschütztes nicht-nekrotisches Myokardgewebe umschließt das Infarktgebiet.

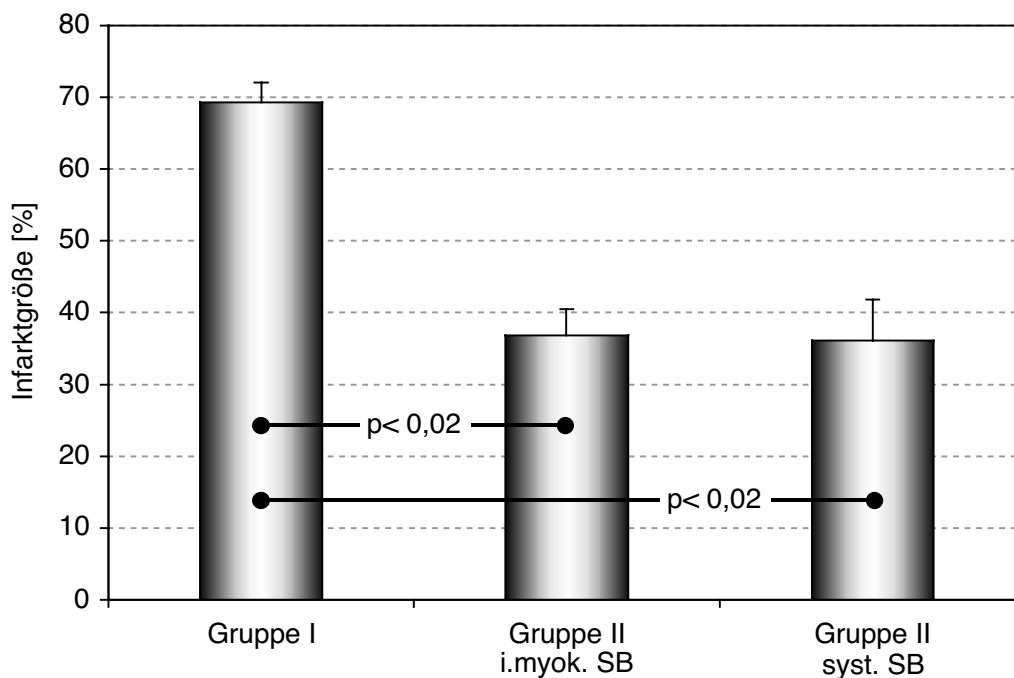


Abb. 31: Grafische Darstellung der Infarktgrößen der Tiere der Versuchsgruppen I und II nach systemischer bzw. lokaler intramyokardialer Applikation von SB203580. Die Werte der Gruppe II wurden im Vergleich zur Infarktgröße der Tiere der Versuchsgruppe I (Kontrollgruppe 1) aufgetragen.
i.myok. SB = intramyokardiale Infusion von SB203580,
syst. SB = systemische Infusion von SB203580.

4.2. Infarktgröße der Tiere der Versuchsgruppen VI und VII nach systemischer bzw. intramyokardialer SB203580-Applikation und vorgeschaltetem Präkonditionierungsprotokoll 2

In diesem Abschnitt der Untersuchungen erarbeiteten wir den Effekt der systemischen und lokalen intramyokardialen SB203580-Applikation auf die Infarktentstehung nach 40 min Indexischämie und 60 min Reperfusion mit dem vorgeschalteten Präkonditionierungsprotokoll 2.

Die systemische Infusion von SB203580 (0,17 mg/kg KGW) erfolgte während eines 40 minütigen Vorlaufes und während beider Reperfuzyklen der folgenden Präkonditionierung (siehe Protokoll; Gruppe VII). Die Testsubstanz hatte keinen Einfluss auf die infarktreduzierende Wirksamkeit des Präkonditionierungsprotokoll. Die IGr erhöhte sich minimal von $2,5 \pm 0,75\%$ auf $3,2 \pm 0,5\%$ (Abb. 32B und 33).

Auch die lokale intramyokardiale Infusion der SB203580-Substanz bedingte nur eine geringfügige Erhöhung der IGr auf $3,8 \pm 0,5\%$, jedoch konnte kein nekrotisches Myokard um die Nadeln festgestellt werden (Abb. 32A und 33), d.h. der protektive Mechanismus der Präkonditionierung wurde durch SB203580 nicht aufgehoben.



Abb. 32: **A** Herzscheibe nach intramyokardialer SB203580-Applikation mit nachfolgender ischämischer Präkonditionierung (IP 2). Die Abbildung zeigt die Scheibe in basaler Schnittansicht. **B** Das Bild zeigt die apikale Ansicht einer Herzscheibe nach systemischer SB203580 (0,17 mg/kg KGW) Infusion und nachfolgender ischämischer Präkonditionierung 2.

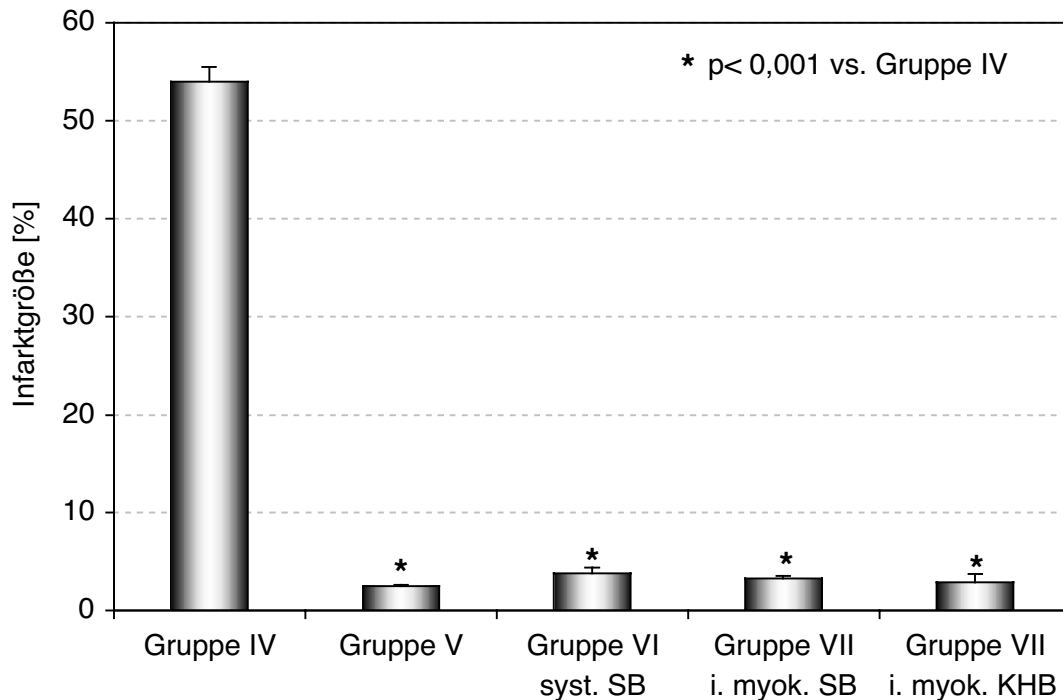


Abb. 33: Grafische Darstellung der planimetrisch quantifizierten Infarktgrößen der Kontrollgruppe 2 (Gruppe IV) mit syst. KHB/DMSO Infusion. Diese wurden im Vergleich zum Präkonditionierungsprotokoll 2 (Versuchsgruppe V), zur Versuchsgruppe VI nach systemischer SB203580-Infusion und zur Versuchsgruppe VII nach intramyokardialer Gabe von SB203580 oder KHB/DMSO aufgetragen. i.myok. SB = intramyokardiale Infusion von SB203580, syst. SB = systemische Infusion von SB203580, syst. KHB = systemische Applikation von DMSO in Krebs-Henselleit-Puffer.

5. In-vitro Untersuchungen der SB203580-Studie

5.1. Effekt der SB203580-Applikation auf die Phosphorylierungsintensität / Aktivität der p38-MAPKs-Kaskade

Im Versuchsabschnitt der SB203580-behandelten Tiere erfolgten Western Blot Analysen unter Verwendung des spezifischen anti-Phospho-p38-MAPKs-Antikörpers. Das Epitop des Antikörpers beinhaltet die duale Phosphorylierungsstelle der p38-MAPKs an den Aminosäuren Thr180 und Tyr182.

Die Untersuchungen wurde an den Drillbiopsien des linken Ventrikels durchgeführt, die zu den Zeitpunkten der 0. min, 5. min, 10. min, 20. min, 30. min, 45. min und 60. min der Ischämie entnommen wurden. Sie stammten aus dem mit systemisch SB203580 (Versuchsgruppe II) behandelten Risikogebiet (RG), aus dem mit systemisch KHB/DMSO behandelten RG (Versuchsgruppe I) und dem Nicht-Risikogebiet des linken Ventrikels (NRG) (Versuchsgruppe I und II).

Sowohl in den SB203580-behandelten, als auch den KHB/DMSO-behandelten Tieren wurde im Vergleich zu nicht-ischämischem Myokardgewebe ein signifikanter ($p < 0,05$) Anstieg der p38-MAPKs-Phosphorylierungsintensität während des Ischämieverlaufs festgestellt. Das Phosphorylierungsmaximum der p38-MAPKs wurde in beiden Gruppen zum Zeitpunkt der 20. min der Ischämie erreicht, ohne einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen der KHB/DMSO- und SB203580-behandelten Tiere zu beobachten. Danach nahm die Phosphorylierungsintensität der SB203580-behandelten Tiere bis zur 45. min der Ischämie ab. Zum Zeitpunkt der 60. min war wiederum ein leichter Anstieg zu verzeichnen. In den KHB/DMSO-behandelten Tieren war eine stetige Reduktion der Phosphorylierung bis zur 60. min der Ischämiephase zu beobachten. Signifikante Unterschiede zwischen SB203580- und KHB/DMSO-behandelten Tieren waren nur zu den Zeitpunkten der 30. min und 45. min zu erkennen ($p < 0,05$) (Abb. 34 und 35).

Zur Kontrolle der phosphorylierten Form der p38-MAPKs wurden die untersuchten Proben auch stets einer Detektion mit dem nicht-phosphorylierten Antikörper der p38-MAPKs unterzogen. Hierbei wurde der Anteil des Gesamtkinaseproteins in der jeweiligen Zellfraktion nachgewiesen. Es zeigten sich im Vergleich der Proben aus dem mit SB203580 (syst) behandelten Risikogebiet (Zeitpunkt 0., 5., 10., 20., 30., 45. und 60. min), aus dem mit KHB/DMSO (syst) behandelten RG (gleiche Zeitpunkte), aus nicht-behandeltem Risikogebiet und Nicht-Risikogebiet keine Unterschiede (Abb. 36 und 37).

Die Dokumentation der p38-MAPKs-Aktivität erfolgte mittels einer „in-Gel-Phosphorylierung“ des p38-MAPKs spezifischen Substrates, GST-MAPKAPK-2(46-400). Der Aktivitätsverlauf war vergleichbar dem der Phosphorylierungsintensität (Abb. 33), d.h. es konnte ein Anstieg durch Ischämie, sowohl bei den SB203580- als auch bei den KHB/DMSO-behandelten Tieren im Vergleich zu unbehandeltem Myokardgewebe dargestellt werden. Des weiteren zeigte sich bis zur 20. min der Ischämie kein Unterschied der p38-MAPKs-Aktivität in SB203580- und KHB/DMSO-behandelten Tieren (Abb. 38 und 39A). Zur Kompensation des Auswascheffekts führte man die Aktivitätsbestimmung unter Anwesenheit des SB203580 (50 nM)-Inhibitors durch. Es wurde bereits zur 5. min der Ischämie eine signifikante ($p < 0,05$) Inhibition der p38-MAPKs-Aktivität durch SB203580 festgestellt, die sich während des gesamten Verlaufs der Ischämie fortsetzte (Abb. 38 und 39B). Die dauerhafte Präsenz des Inhibitors bei der Aktivitätsbestimmung war daher für die Wirksamkeit im Myokard essentiell.

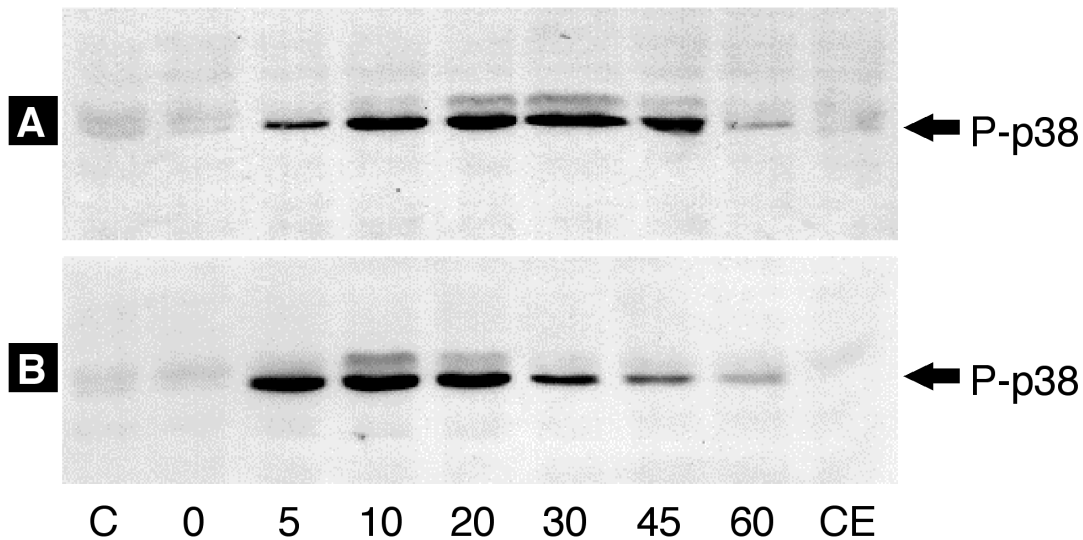


Abb. 34: Diese Western Blot Daten zeigen den Effekt der KHB/DMSO- (A) und systemischen SB203580-Infusion (B) auf die Phosphorylierung (P) der p38-MAPKs während des Verlaufs des Indexischämieprotokolles 1. Die Untersuchung erfolgte unter Verwendung des spezifischen Antikörpers, dessen Epitop sich gegen die Phosphorylierungsstellen Thr180/Tyr 182 richtete. Die Pfeile an der rechten Seite entsprechen einem Molekulargewicht von 38 kDa, der Molekülgröße der p38-MAPKs. C = Gewebe eines unbehandelten linken Ventrikels, CE = Gewebe des Nicht-Risikogebietes nach Ende des SB203580-Infusionsintervalls, 0., 5., 10., 20., 30., 45. und 60. min = Gewebe entnommen an den entsprechenden Zeitpunkten der Indexischämie (Stanzbiopsien der Versuchsgruppen I und II).

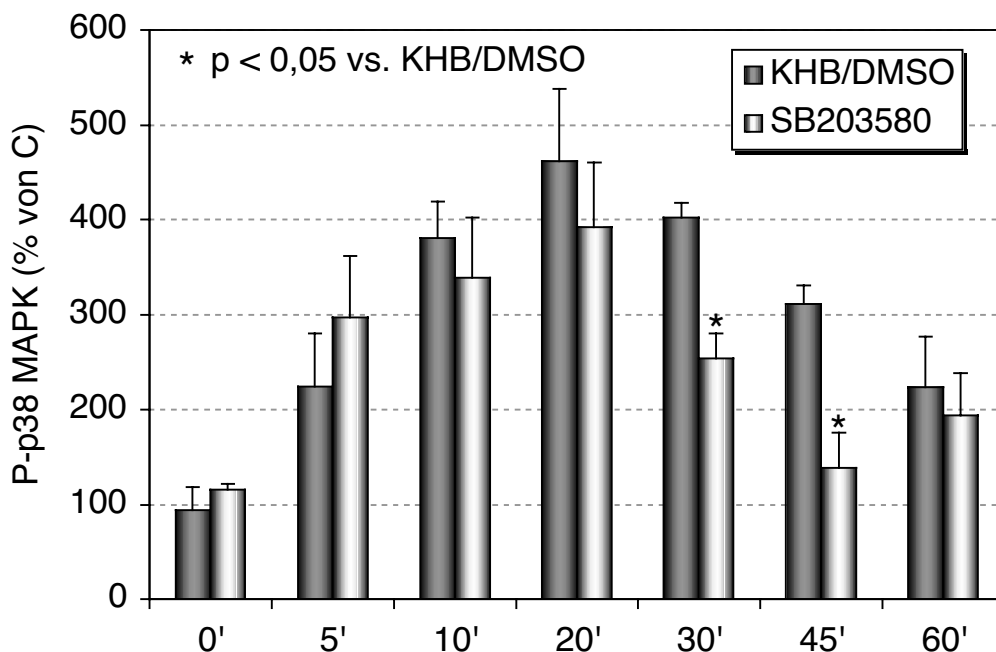


Abb. 35: Quantifizierung der p38-MAPK-Phosphorylierung des Myokard-Risikogebiets (RG) zu den Zeitpunkten der 0., 5., 10., 20., 30., 45. und 60. (min) der Indexischämie. Die Werte der KHB/DMSO-behandelten (graue Säulen; KHB) und SB203580 (weiße Säulen; SB) behandelten Myokardgewebeprobe wurden als prozentualer Anteil zum Kontrollgewebe C (Gewebe eines unbehandelten linken Ventrikels) aufgetragen.

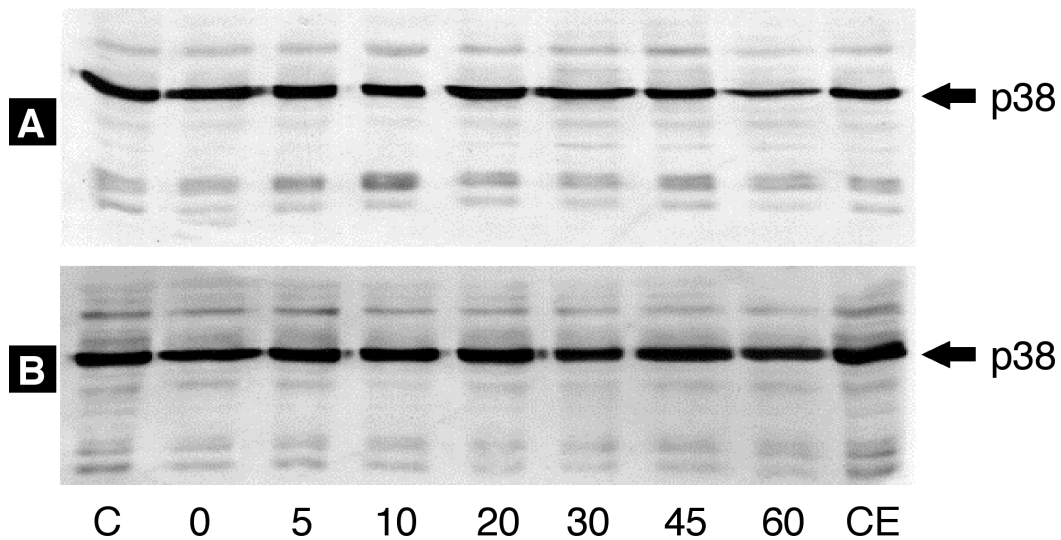


Abb. 36: Effekt der systemischen KHB/DMSO-Applikation (A) und systemischen SB203580-Applikation (B) auf den Gesamt-p38-MAPK-Anteil der Proben. C = Gewebe eines unbehandelten linken Ventrikels, CE = Gewebe des Nicht-Risikogebietes nach Ende des SB203580-Infusionsintervalls, 0., 5., 10., 20., 30., 45. und 60. min = Gewebe entnommen an den entsprechenden Zeitpunkten der Indexischämie (Stanzbiopsien der Versuchsgruppen I und II).

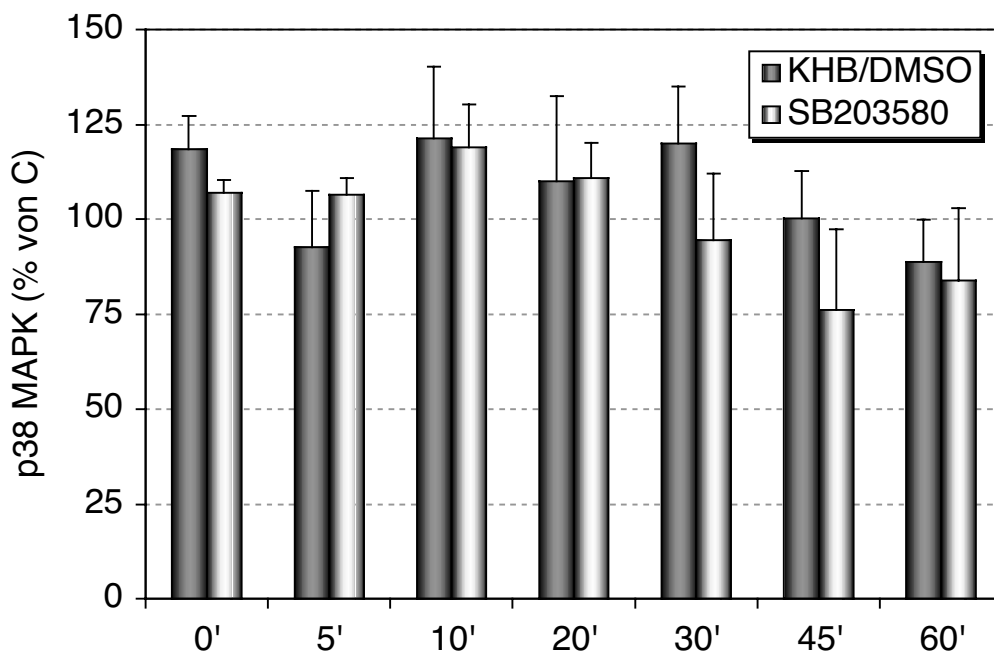


Abb. 37: Quantifizierung der unter Abb. 36 repräsentativ dargestellten p38-MAPK-Expression zu den genannten Zeitpunkten (min) der Indexischämie. Graue Säulen nach KHB/DMSO Behandlung; weiße Säulen nach SB203580-Behandlung.

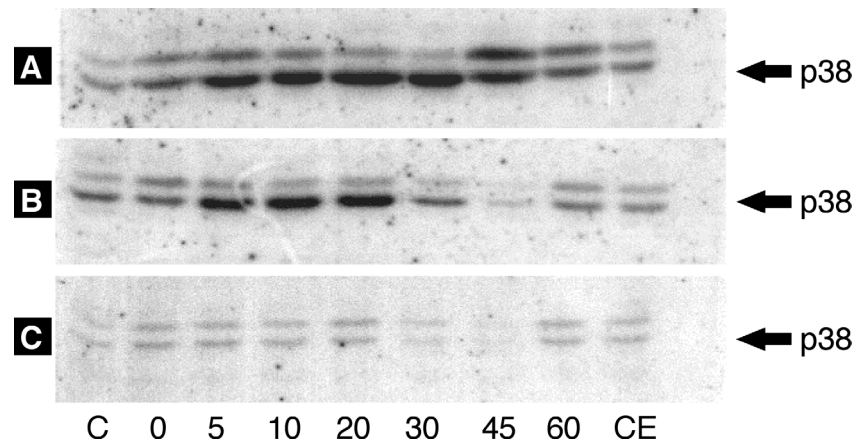


Abb. 38: Die Abbildung zeigt den Effekt der systemischen KHB/DMSO- (A) und SB203580-Infusion (B, C) auf die p38-MAPKs-Aktivität anhand der Phosphorylierung des MAPKs-Substrates MAPKAP-K2. (C) stellt die Auswirkungen auf die p38-MAPKs-Aktivität dar, sofern der Zusatz des SB203580-Inhibitors zum Gel erfolgte. C = Gewebe eines unbehandelten linken Ventrikels, CE = Gewebe des Nicht-Risikogebietes nach Ende des SB203580-Infusionsintervalles, 0., 5., 10., 20., 30., 45. und 60.min = Gewebe entnommen an den entsprechenden Zeitpunkten der Indexischämie (Stanzbiopsien der Versuchsgruppen I und II).

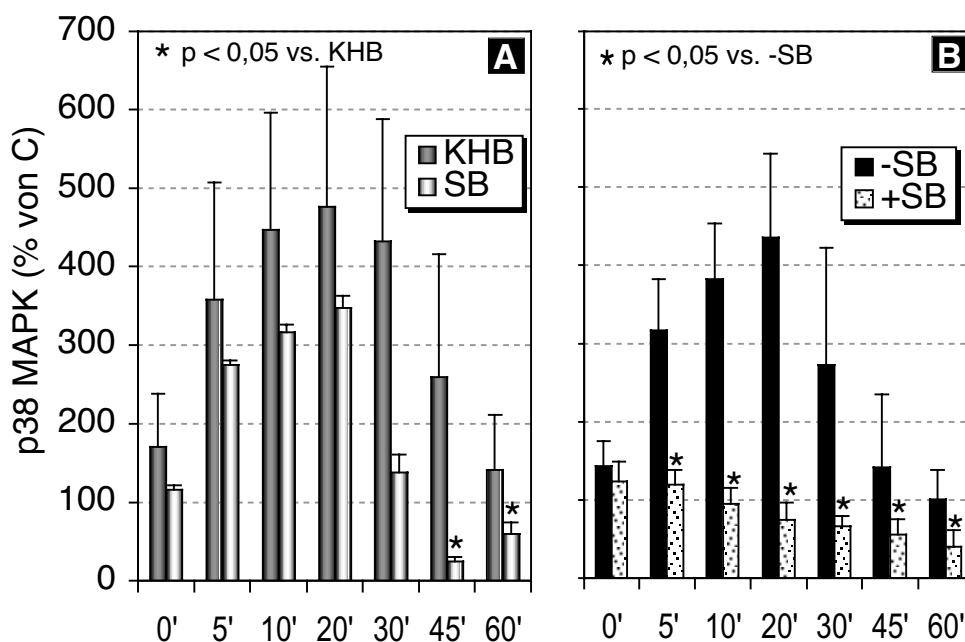


Abb. 39: Quantifizierung der p38-MAPK Aktivität. Die Werte zeigen den prozentualen Anstieg während der genannten Zeitpunkte der Ischämie (min) im Vergleich zur Kontrolle C (Gewebe eines unbehandelten linken Ventrikels). (A) Die grauen Säulen stellen die Werte nach KHB/DMSO-Behandlung dar, die weißen zeigen den Effekt nach SB203580-Behandlung. (B) Die schwarzen Säulen zeigen die Wirkung nach SB203580 Infusion ohne Zusatz des Inhibitors zum Gel, die weiß/schwarz-gemusterten Säulen zeigen den Effekt nach SB203580-Infusion und Zusatz des Inhibitors zum Gel.

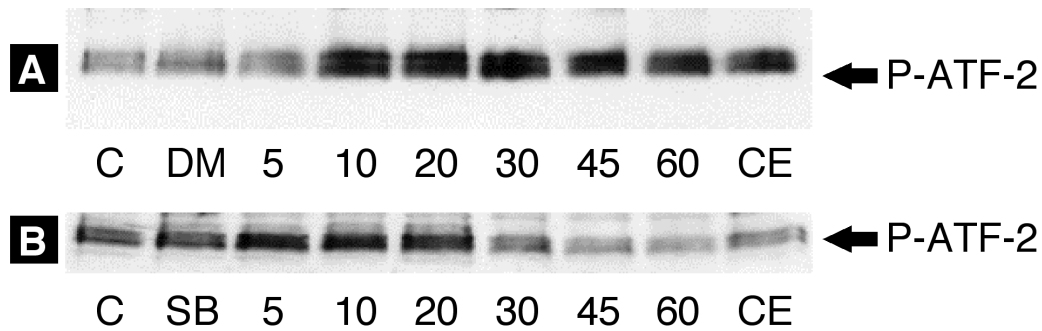


Abb. 40: Western Blot Analyse unter Verwendung des spezifischen Antikörpers, welcher sich gegen die phosphorylierte Form (P) des ATF-2 Transkriptionsfaktors richtete. (A) zeigt die Phosphorylierungsintensität von ATF-2 nach KHB/DMSO-Behandlung, (B) nach SB203580-Applikation. C = Gewebe eines unbehandelten linken Ventrikels, CE = Gewebe des Nicht-Risikogebietes nach Ende des SB203580-Infusionsintervalles, 0., 5., 10., 20., 30., 45. und 60. min = Gewebe entnommen an den entsprechenden Zeitpunkten der Indexischämie. DM = Ende der KHB/DMSO Infusion, SB = Ende der SB203580-Infusion, Start der Ischämie (Stanzbiopsien der Gruppen I und II).

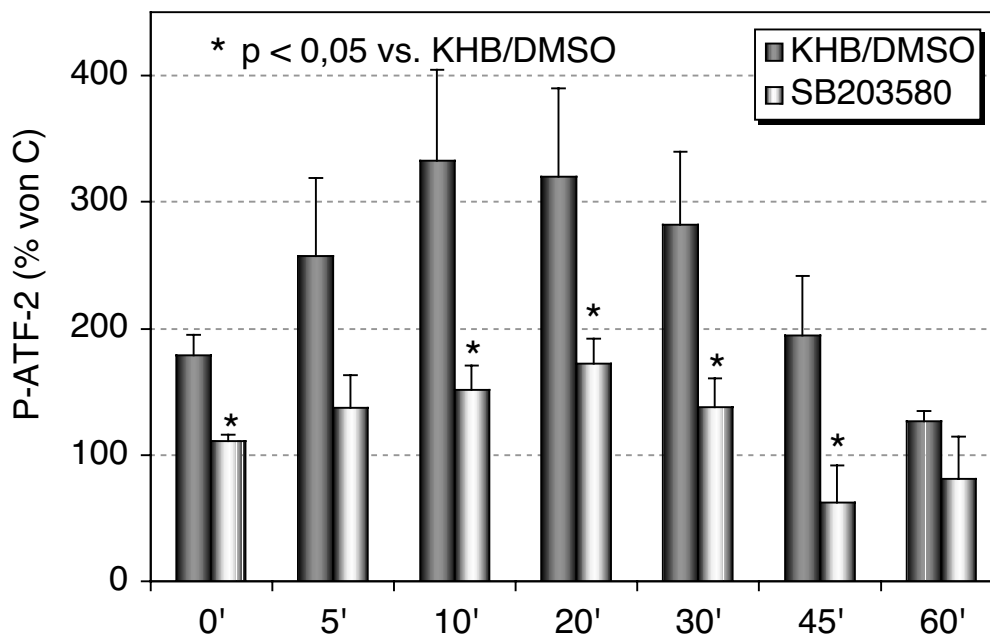


Abb. 41: Quantifizierung der Phosphorylierungsintensität (P) von ATF-2. Die grauen Säulen zeigen die Phosphorylierung während des Ischämieverlaufs nach KHB/DMSO-Behandlung, die weißen Säulen zeigen dies nach SB203580-Applikation. Die Werte berechneten sich aus dem prozentualen Anteil des Kontrollgewebes C. C = Gewebe eines unbehandelten linken Ventrikels, 0., 5., 10., 20., 30., 45. und 60. min = Gewebe entnommen an den entsprechenden Zeitpunkten der Indexischämie (Stanzbiopsien der Versuchsruppen I und II).

Des Weiteren wurde in den SB203580-behandelten Tieren die *in-vivo* Aktivität der p38-MAPKs untersucht, indem die Phosphorylierungsintensität des Transkriptionsfaktors ATF-2 mittels Western Blot-Analyse bestimmt wurde. ATF-2 stellt neben der MAPKAP-K2 ein spezifisches nukleäres Substrat der p38-MAPKs dar.

Es zeigte sich ein Anstieg der Phosphorylierungsintensität des ATF-2 durch Ischämie in KHB/DMSO-behandeltem Myokardgewebe im Vergleich zu unbehandeltem nicht ischämischem Myokard. Das Maximum war zum Zeitpunkt der 10. min der Ischämie festzustellen, eine Reduktion der Phosphorylierung konnte zum Zeitpunkt der 60. min beobachtet werden. SB203580 dagegen verursachte im Risikogebiet im Vergleich zu KHB/DMSO-behandeltem Risikogebiet bis zur 45. min der Ischämie eine signifikante Inhibition der ATF-2-Phosphorylierung ($p < 0,05$; Abb. 40 und 41).

5.2. Effekt der SB203580-Applikation auf die Phosphorylierungsintensität der SAPKs/JNKs-Kaskade

Da es sich bei SB203580 um einen Inhibitor der Stress-aktivierten Proteinkinasen handelt, wurde die Spezifität des Inhibitors SB203580 in seiner Wirksamkeit auf die p38-MAPKs-Kaskade ebenfalls überprüft. Daher wurde die Phosphorylierungsintensität der SAPK/JNK-1/2 (JNK-55/-46) zu den unter Abschnitt 5.1 genannten Zeitpunkten bestimmt. Es konnte kein Phosphorylierungsunterschied der JNK-1/2 in dem SB-, KHB/DMSO- Risikogebiet, in nicht-behandeltem Risikogebiet oder Nicht-Risikogebiet festgestellt werden (siehe Abb. 42). Es zeigte sich in den KHB/DMSO-behandelten Tieren eine geringe Phosphorylierungssteigerung der SAPK/JNKs während der Ischämie.

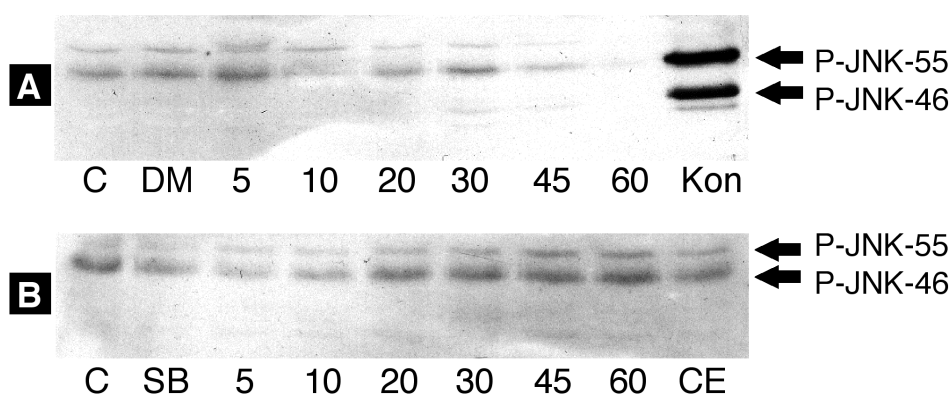


Abb. 42: Diese Western Blot Analysen zeigen den Effekt der systemischen KHB/DMSO- (A) und SB203580 Infusion (B) auf die Phosphorylierungsintensität der JNK-1/2 (JNK 55/46). Kon = positive Kontrolle (Zellenextrakt nach unspezifischer Stimulanz mittels Anisomycin). C = Gewebe eines unbehandelten linken Ventrikels, CE = Gewebe des Nicht-Risikogebietes nach Ende des SB203580-Infusionsintervalles, 0., 5., 10., 20., 30., 45. und 60. min = Gewebe entnommen an den entsprechenden Zeitpunkten der Indexischämie (Stanzbiopsien der Versuchsgruppen I und II).

6. Untersuchung der ERKs-Kaskade mittels der spezifischen Inhibitoren PD98059 und UO126

In diesem Versuchsabschnitt der Studie wurden die Auswirkungen der ERKs-Inhibitoren auf die kardioprotektive Wirksamkeit der ischämischen Präkonditionierung dargestellt. Die Substanz UO126 wurde systemisch und lokal intramyokardial getestet. PD98059 dagegen wurde nur lokal intramyokardial verabreicht. Serumuntersuchungen nach systemischer Gabe von PD98059 zeigten, dass eine Bioverfügbarkeit der Substanz bei dieser Art der Applikation nicht vorhanden war, da ein wirksamer Blutspiegel nicht erreicht wurde. Der Hersteller teilte mit, dass aufgrund des spezifischen Lösungsverhaltens von PD98059 mit der Neigung zur Ausfällung in wässrigen Lösungen, der Inhibitor in den hier verwendeten Konzentrationen nur gelöst in DMSO bei 38°C injiziert werden kann. Daher musste das Substanzgemisch auch für die Dauer der Mikroinfusion konstant auf diesen Wert temperiert werden. In den ersten Versuchen, in denen PD98059 in der Konzentration von 100 µM verwendet wurde, verstarben drei Tiere ($n_{\text{gesamt}} = 31$). Aufgrund dessen wurde in der Versuchsreihe eine maximale PD98059-Konzentration von 50 µM verwendet. Zur Darstellung einer Dosisabhängigkeit wurden die folgenden vier Konzentrationsstufen 50 µM, 25 µM, 12,5 µM und 6,25 µM von PD98059 und drei Konzentrationsstufen 50 mM, 50 µM und 50 nM von UO126 eingesetzt. Bei beiden Substanzen wurden teilweise verschiedene Konzentrationen innerhalb eines Versuches, d.h. an einem Herzen angewendet.

6.1. Auswirkungen der lokalen / intramyokardialen PD98059- und systemischen UO126-Applikation auf die Infarktentstehung nach 40 min Ischämie und 60 min Reperfusion ohne Präkonditionierung

Die lokale intramyokardiale PD98059-Infusion erfolgte 60 min vor der 40 minütig andauernden Indexischämie und der anschließenden Reperfusion von 60 min (siehe Protokoll; Gruppe IV). Die Infarktgröße betrug $59,4 \pm 1,9\%$ (Abb. 43) und zeigte somit keine deutliche Erhöhung zur Kontrollgruppe (IGr: $54 \pm 2,5\%$).

UO126 wurde in dem Indexischämieprotokoll mit 40 min Ischämie und 60 min Reperfusion ohne Präkonditionierung bei systemischer Verabreichung in einer Konzentration von 0,12 mg / kg KGW getestet. Hierbei entstand eine Infarktgröße von $69,8 \pm 3,8\%$. Dies bedeutete einen signifikanten ($p < 0,01$) Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe 2 mit einer Infarktgröße von $54 \pm 2\%$ des Risikogebietes (siehe Abb. 13 und 14). Zwei Tiere dieser UO126-Versuchsreihe mit systemischer Applikation von 0,25 mg/kg KGW verstarben durch auftretende nicht regulierbare Arrhythmien.

6.2. Auswirkungen der lokalen / intramyokardialen PD98059- und UO126-Applikation auf die Infarktentstehung nach 40 min Ischämie / 60 min Reperfusion und dem vorgeschalteten Präkonditionierungsprotokoll 2

Die lokale / intramyokardiale PD98059-Infusion erfolgte während eines 40 minütigen Vorlaufs vor dem ersten Ischämiezyklus des Präkonditionierungsprotokolls und während beider Reperfusionenzyklen des Präkonditionierungsprotokolls 2 (siehe Protokoll, Versuchsgruppe VII), sodass ebenfalls eine Infusionsdauer von 60 min erreicht wurde. Zur Erstellung einer Dosis-Wirkungsbeziehung wurden PD98059-Infusionslösungen mit den Konzentrationen von $50 \mu\text{M}$, $25 \mu\text{M}$, $12,5 \mu\text{M}$ und $6,25 \mu\text{M}$ gewählt. Die Infarktgröße nach mikroinfusierender Applikation von PD98059 mit der Konzentration von $50 \mu\text{M}$ betrug $28 \pm 2\%$, bei einer Konzentration von $25 \mu\text{M}$ wurde eine Infarktgröße von $20,3 \pm 2\%$ festgestellt (Abb. 45).

Abb. 43: Die Abbildung zeigt eine Herzscheibe in basaler Schnittansicht nach lokaler intramyokardialer PD98059-Mikroinfusion ($50 \mu\text{M}$) ohne Präkonditionierung (Gruppe IV). Das Risikogebiet (RG) des linken Ventrikels (LV) grenzt sich vom Nicht-Risikogebiet (NRG) des LV durch die Abwesenheit der orange-fluoreszierenden Mikrosphären ab. Ein massives Infarktgebiet ist im RG des LV zu erkennen.

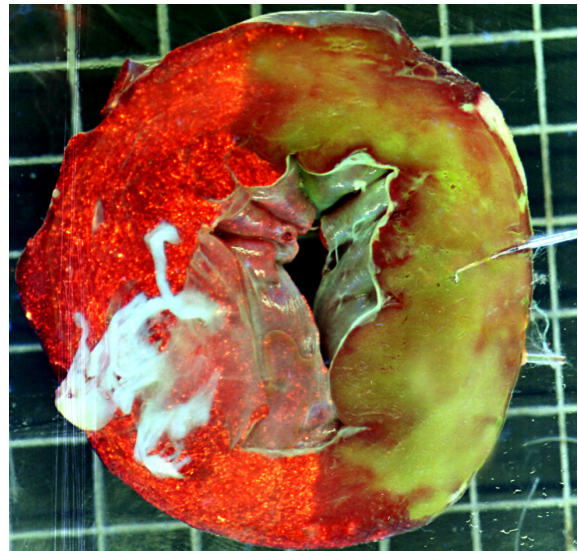
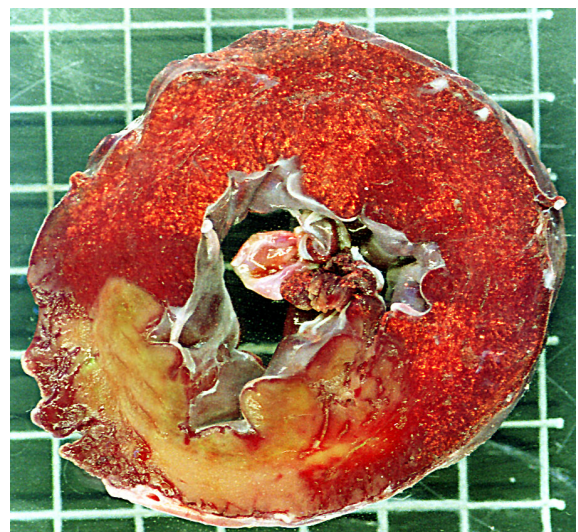


Abb. 44: Die Abbildung zeigt eine Herzscheibe nach systemischer UO126-Infusion ohne ischämische Präkonditionierung. Ein deutlicher TTC-ungefärbter Infarkt zeigte sich im Risikogebiet.



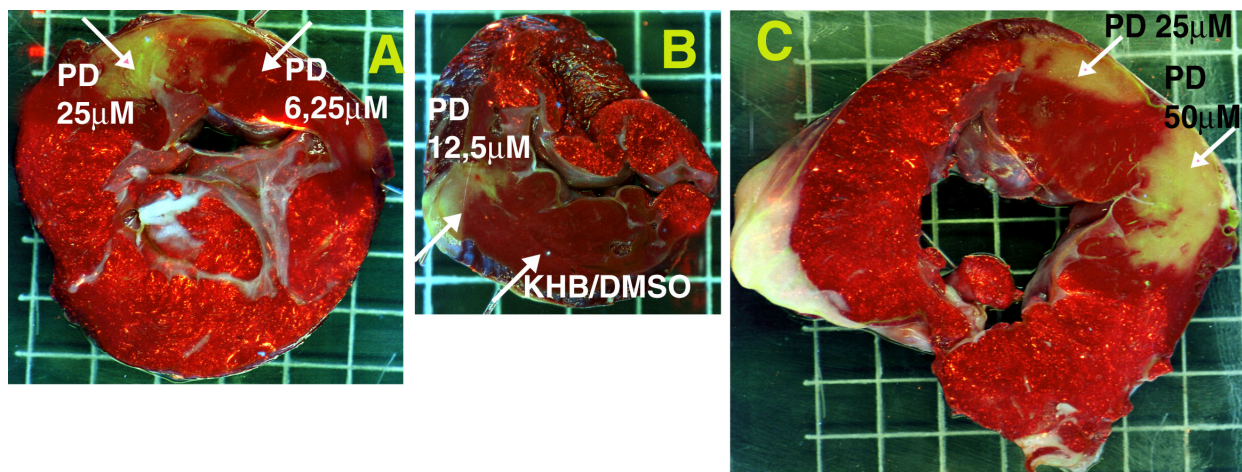


Abb. 45: Herzscheibenfotografien nach lokaler intramyokardialer PD98059-Infusion mit Präkonditionierungsprotokoll 2. (A) Basale Schnittführung. Über die linke Nadel wurde PD98059 in einer Konzentration von $25 \mu\text{M}$ lokal appliziert, über die rechte Nadel erfolgte die lokale Infusion mit einer Konzentration von $6,25 \mu\text{M}$. (B) Apikale Ansicht. Über die linke Nadel erfolgte die Applikation von PD98059 in einer Konzentration von $12,5 \mu\text{M}$, über die rechte Nadel wurde nur das Lösungsmittel KHB/DMSO infundiert. (C) Apikale Ansicht der Herzscheibe, lokale intramyokardiale Infusion des Inhibitors PD98059 in einer Konzentration von $25 \mu\text{M}$ (linke Nadel) und $50 \mu\text{M}$ (rechte Nadel).

Bei weiterer Halbierung der Konzentration konnte eine Infarktgröße von $8,8 \pm 1,3\%$ beobachtet werden und nach Gabe von PD98059 mit der geringsten Konzentration von $6,25 \mu\text{M}$ war nur noch eine Infarktgröße von $3,2 \pm 0,2\%$ zu erkennen (siehe Abb. 11A, B und C und Abb. 18). Die halblogarithmisch dargestellte Dosis-Wirkungs-Regression zeigte unter Einbeziehung der Parameter **Konzentration** (Dosis) und **lokale Wirkungsgröße** des Inhibitors (Integration der quantitativen Parameter Wirkungsstärke und -dauer zum Parameter der Wirkungsgröße) eine Kurve mit geradläufigem mittleren Abschnitt. Das bedeutet, dass die Wirkung bei aufeinander folgender Verdopplungen der Konzentration jeweils um einen konstanten Betrag anstieg (Abb. 48).

Die lokale / intramyokardiale UO126-Infusion erfolgte ebenfalls während eines 40 minütigen Vorlaufs vor dem ersten Ischämiezyklus des Präkonditionierungsprotokolls und während beider Reperfusionenzyklen des Präkonditionierungsprotokolls 2 (siehe Protokoll, Gruppe VI). Es wurden die drei UO126-Infusionslösungen mit den Konzentrationen von 50 mM , $50 \mu\text{M}$ und 50 nM getestet. Die Infarktgröße nach mikroinfusierender Applikation von UO126 mit der Konzentration von 50 mM erstreckte sich auf $36,5 \pm 2\%$ des Risikogebietes. Nach der UO126-Infusion mit einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ betrug die Infarktgröße $32,5 \pm 1\%$. Nach Gabe des Inhibitors in einer Konzentration von 50 nM wurde eine Infarktgröße von $5,5 \pm 0,75\%$ festgestellt. Die Infarktgrößen nach lokaler intramyokardialer UO126-Infusion mit den Konzentrationen 50 mM und $50 \mu\text{M}$ waren im Vergleich zur Kontrolle 2 (IGr: $2,5 \pm 0,1\%$) signifikant erhöht ($p < 0,01$) (siehe Abb. 46A und B und 47). Auch nach lokaler / intramyokardialer UO126-Infusion war eine lineare Korrelation von Konzentration und Infarktgröße festzustellen (Abb. 48).

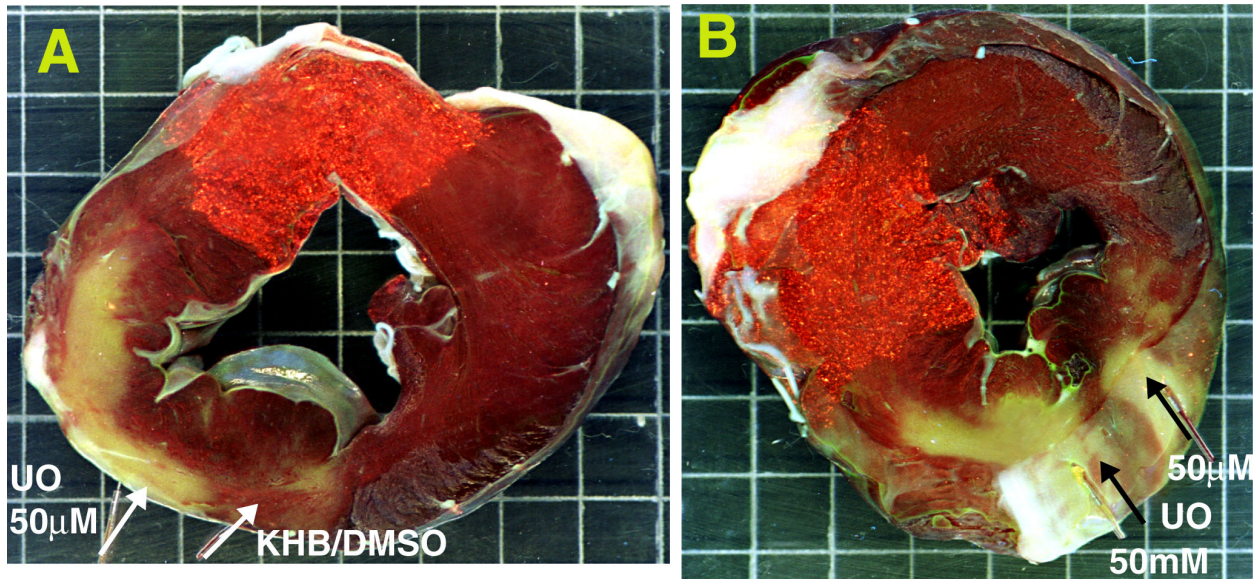


Abb. 46: Herzscheibenfotografien nach lokaler intramyokardialer UO126-Infusion und dem Präkonditionierungsprotokoll 2.

(A) Die Abbildung zeigt eine Herzscheibe in apikaler Schnitfführung. Über die linke Nadel wurde UO126 in einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ appliziert, über die rechte Nadel erfolgte die alleinige Infusion des Lösungsmittels (DMSO in Krebs-Henselleit-Puffer).

(B) Das Bild zeigt eine Herzscheibe in apikaler Ansicht. Über die linke Nadel erfolgte die Applikation von UO126 in einer Konzentration von 50 mM , über die rechte Nadel wurde UO126 in einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ infundiert.

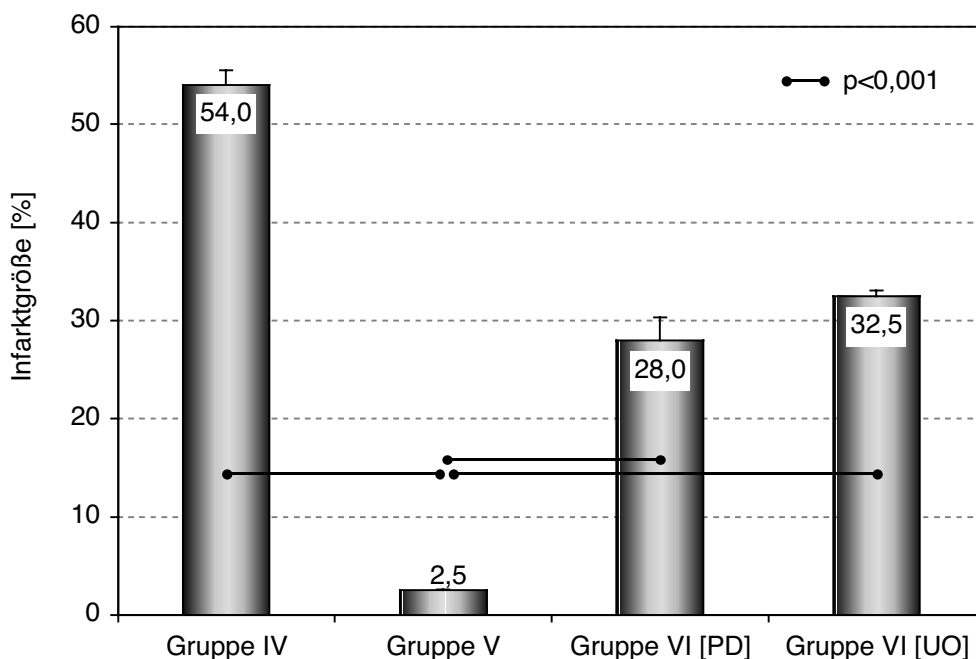


Abb. 47: Grafische Darstellung der planimetrisch quantifizierten Infarktgröße nach dem Indexischämiekontrollprotokoll 2 (Gruppe IV), dem Präkonditionierungsprotokoll 2 (Gruppe V) sowie nach intramyokardialer Gabe von PD98059 ($50 \mu\text{M}$) bzw. UO126 ($50 \mu\text{M}$) und dem Präkonditionierungsprotokoll 2 (Versuchsgruppe VI).

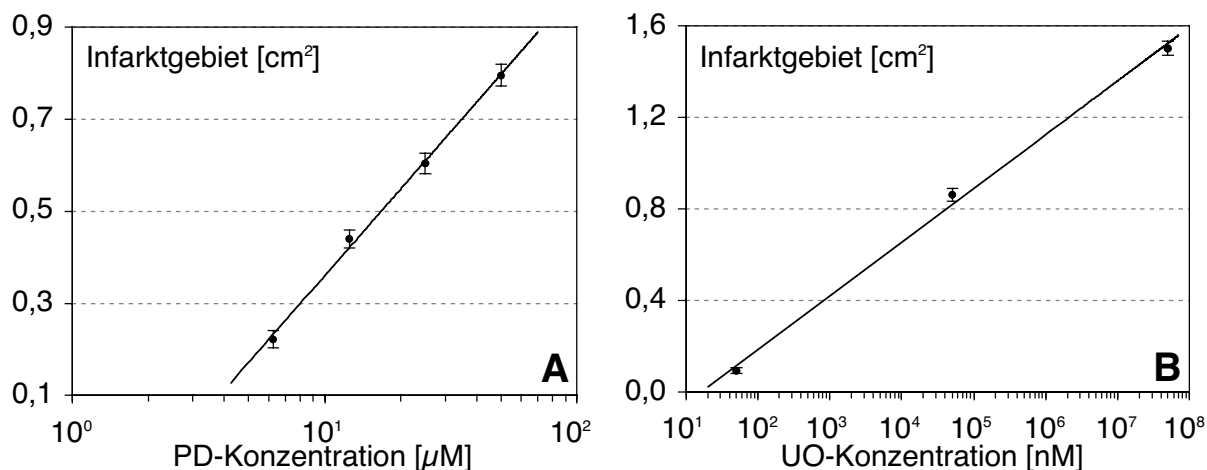


Abb. 48: Semilogarithmische Darstellungen der Dosis-Wirkungsbeziehungen nach PD98059-(A) und UO126-(B) Applikation. Die Substanz- Konzentrationen wurden gegen die Größe des entstandenen Infarktgebietes (cm²) aufgetragen.

6.3. Auswirkungen der systemischen UO126-Applikation auf die Infarktentstehung nach 40 min Ischämie / 60 min Reperfusion und dem vorgeschalteten Präkonditionierungsprotokoll 2

UO126 wurde bei dieser Art der Applikation durch intravenöse Gabe über einen Zeitraum von 40 min vor der ersten Ischämiephase des Präkonditionierungszyklus und während beider Reperfusionperioden des Präkonditionierungsprotokolls 2 verabreicht. In diesem Versuchsabschnitt wurden drei Dosierungen von UO126 untersucht. Die höchste Dosis der Substanz betrug 0,25 mg/ kg KGW und bedingte eine Infarktentstehung von $68,7 \pm 2\%$ des Risikogebietes. Die Gabe von 0,22 mg/ kg KGW verursachte einen Infarkt der Größe $54,6 \pm 0,5\%$ (siehe Abb. 49) des Risikogebietes und nach Applikation von 0,12 mg/ kg KGW entstand eine Infarktgröße von $41,6 \pm 1,2\%$. Alle drei Werte stellten eine signifikante ($p < 0,01$) Erhöhung der Infarktgröße im Vergleich zum Präkonditionierungsprotokoll 2 dar (IGr: $2,5 \pm 0,1\%$; Abb. 50).

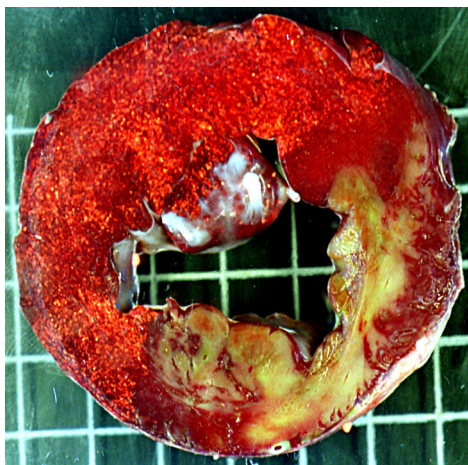
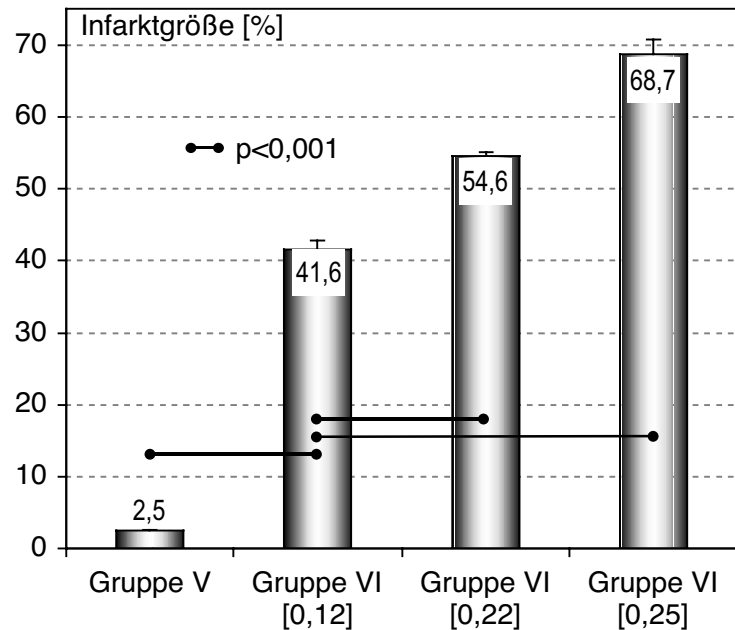


Abb. 49: Basale Schnittansicht einer Herzscheibe nach systemischer UO126-Infusion mit der Dosierung von 0,22 mg/ kg KGW und dem ischämischen Präkonditionierungsprotokoll 2 (Versuchsgruppe VI).

Abb. 50: Infarktgrößen der Versuchsgruppen V (Präkonditionierungsprotokoll 2) und VI (Präkonditionierungsprotokoll mit systemischer Gabe des UO126-Inhibitors in den jeweils angegebenen Dosierungen [mg/kg KGW]).



7. In-vitro-Untersuchungen der PD98059- und UO126-Studie

7.1. Effekt der PD98059- und UO126-Applikation auf die Phosphorylierungsintensität bzw. Aktivität der ERKs-Kaskade

Die in vitro-Aktivität von ERK-1/2 wurde durch „in-Gel-Phosphorylierungen“ ihres spezifischen Substrates „Myelin-Basic-Protein“ (MBP) bestimmt. In der Versuchsgruppe V nach ischämischer Präkonditionierung und systemischer Infusion des Lösungsmittels KHB/DMSO konnte gegenüber dem nicht-präkonditionierten Myokardgewebe des linken Ventrikels ein signifikanter ($p < 0,05$) Anstieg der Aktivität beider zytosolischer ERKs beobachtet werden.

Die lokale intramyokardiale Infusion von KHB/DMSO bedingte einen geringfügigen Anstieg der ERKs Aktivität, was möglicherweise durch den Prozess der Mikroinfusion und der hierdurch bedingten mechanischen Irritationen im Myokard erklärt werden kann.

Durch die intramyokardiale PD98059-Applikation ($50 \mu\text{M}$) wurde die Aktivitätssteigerung der ERKs inhibiert, die in Versuchen ohne Substanzapplikation durch die Präkonditionierung erzielt werden konnte. ERK-1 wurde im Vergleich zu der KHB/DMSO Kontrolle um das 2-fache, ERK-2 um das 1,8-fache in ihrer Aktivität gemindert (siehe Abb. 51 A und B).

Vergleichbare Resultate konnten auch mit dem Inhibitor UO126 ($50 \mu\text{M}$) beobachtet werden. Hierbei wurde sowohl die Aktivität der ERK-1 als auch die der ERK-2 um das 1,4-fache vs. der KHB/DMSO-Kontrolle reduziert (Abb. 52 A und B).

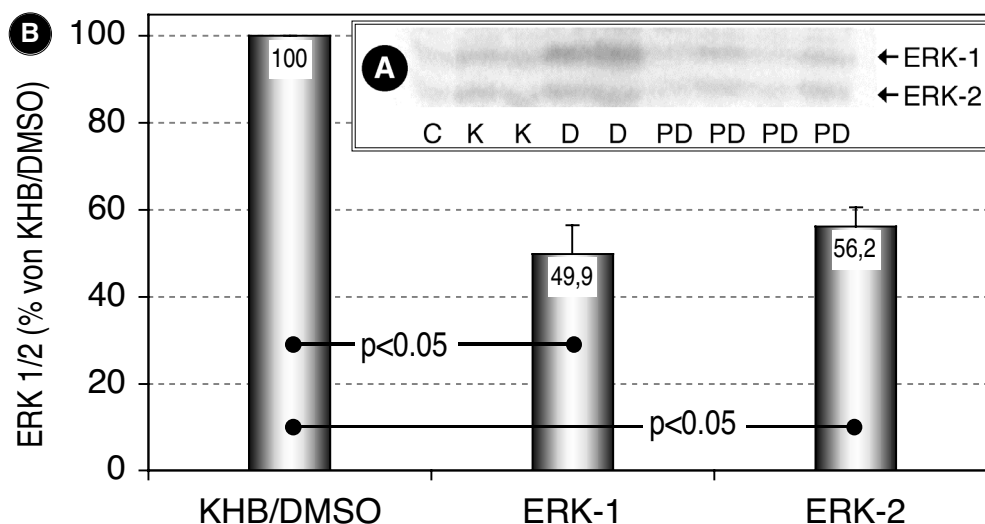


Abb. 51: (A) In-Gel-Phosphorylierung des „Myelin-Basic-Protein“ (MBP) in der zytosolischen Fraktion nach IP2 und lokaler PD98059-Applikation. C: Kontrolle des Nicht-Risikogebietes (NRG); K: Kontrolle des RG (Risikogebiet); PD: PD98059-Inhibition; D: KHB/DMSO Kontrolle. (B) Quantifizierung des „In-Gel-Phosphorylierungs-Effekts“ von PD98059. Kontrolle: KHB/DMSO; ERK-1: extrazellulär-regulierte-Kinase 1 (p44 MAPK); ERK-2: extrazellulär-regulierte-Kinase 2 (p42 MAPK).

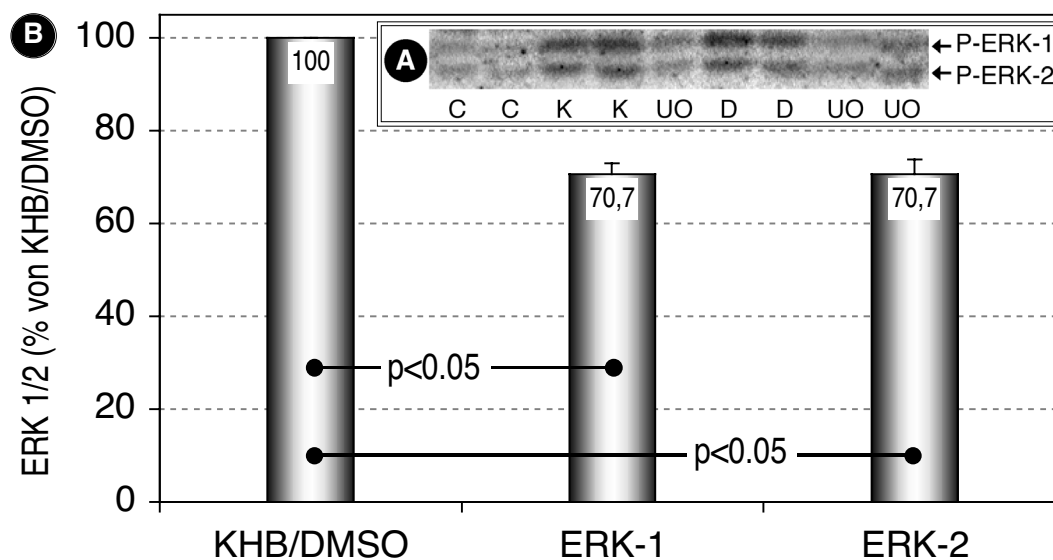


Abb. 52: (A) „In-Gel-Phosphorylierung“ von MBP (Myelin-Basic-Protein) in der zytosolischen Fraktion nach IP2 und lokaler UO126-Applikation. C: Kontrolle des NRG (Nicht-Risikogebiet); K: Kontrolle des RG (Risikogebiet); UO: UO126-Inhibition; D: KHB/DMSO Kontrolle. (B) Quantifizierung des In-Gel-Phosphorylierungseffekts von UO126. Kontrolle: KHB/DMSO; ERK-1: extrazellulär-regulierte-Kinase (p44 MAPK); ERK-2: extrazellulär-regulierte-Kinase (p42 MAPK).

Mit Hilfe des Western Blot Verfahrens wurde nach der lokalen intramyokardialen Infusion von PD98059 bzw. UO126 (siehe Protokoll; Versuchsgruppe VII) sowie nach systemischer Applikation von UO126 (siehe Protokoll; Versuchsgruppe VI) das Phosphorylierungsprofil der ERK-1/2 unter Verwendung des monoklonalen phosphospezifischen Antikörpers (gerichtet gegen die Aminosäuren Thr202/Tyr204) untersucht.

Es zeigte sich bei der Phosphorylierungsbestimmung nach Beendigung des Präkonditionierungsprotokolls 2 im Vergleich zu nicht präkonditioniertem Myokard eine signifikante ($p < 0,05$) Steigerung der Phosphorylierung der ERKs. Die intramyokardiale Infusion des Lösungsmittels bedingte auch hier eine leichte Erhöhung der Phosphorylierungsintensität der Kinasen gegenüber unbehandeltem präkonditioniertem Myokardgewebe. PD98059 inhibierte die Phosphorylierungsintensität der ERK-1 um das 1,7-fache und die der ERK-2 um das 1,6-fache (Abb. 53A und B). Um die erzielten Ergebnisse zu verdeutlichen, wurde bei dem mit PD98059 ($50 \mu\text{M}$) behandelten Myokardgewebe eine Immunopräzipitation der zytosolischen Fraktionen durchgeführt (Abb. 53 Linien rechts 1-4).

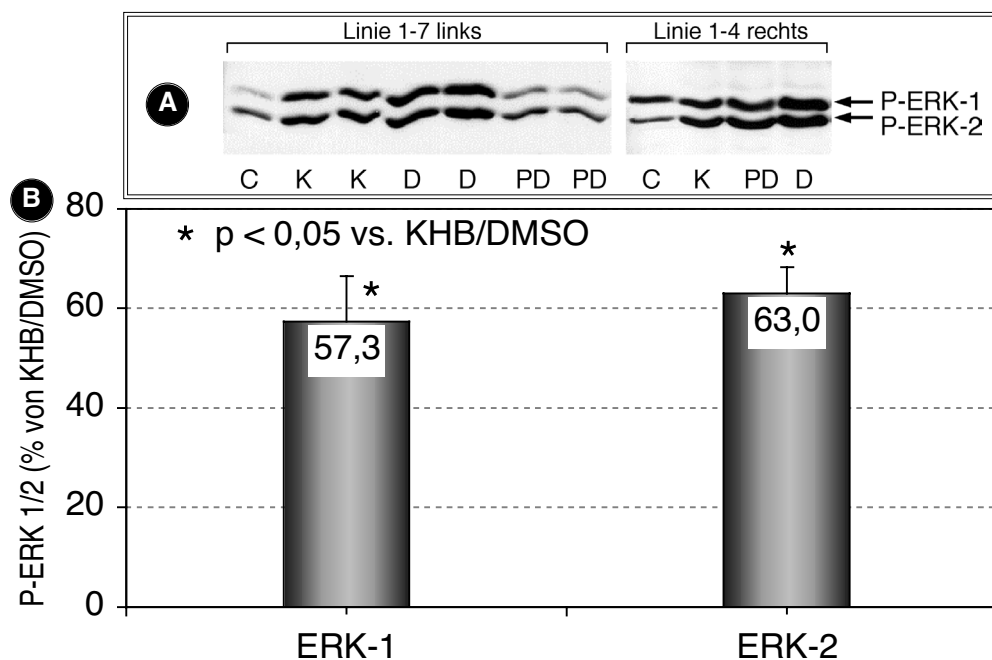


Abb. 53: (A) Western Blot mittels des monoklonalen Antikörpers gerichtet gegen Phospho (P)-ERK-1/2 (zytosolische Fraktion). C: Kontrolle des NRG (Nicht-Risikogebiet); K: Kontrolle des RG (Risikogebiet); PD: PD98059-Inhibition; D: KHB/DMSO Kontrolle. Linien rechts: hier wurden Proben nach Immunopräzipitation aufgetragen. (B) Quantifizierung des Effekts der PD98059-Inhibition auf die Phosphorylierung von ERK-1 und ERK-2. Kontrolle: KHB/DMSO; ERK-1: extrazellulär-regulierte-Kinase 1 (p44 MAPK); ERK-2: extrazellulär-regulierte-Kinase 2 (p42 MAPK).

UO126 zeigte eine deutlichere Inhibition als PD98059. Die ERK-1 wurde in ihrer Phosphorylierungsintensität um das 2,8-fache, die ERK-2 um das 2,3-fache gegenüber der KHB/DMSO-Kontrolle gemindert (Abb. 54 A und B).

Auch die systemische Applikation von UO126 zeigte eine vergleichbare inhibierende Wirkung auf die Phosphorylierung von ERK-1/2. Die Phosphorylierungsintensitäten von ERK-1 und ERK-2 wurden um das 1,5-fache vs. der KHB/DMSO-Kontrolle reduziert (Abb. 55A und B).

Auch erfolgten in diesem Versuchsabschnitt Western Blot Analysen unter Verwendung des nicht-phosphorylierten ERKs-Antikörpers. Dieser Antikörper richtete sich gegen ERK-2 und zeigte eine moderate Kreuzreaktion mit ERK-1. Für die untersuchten zytosolischen und partikulären Fraktionen konnten keine Unterschiede des Gesamtproteinanteils der Kinase dargestellt werden. Es zeigte sich jedoch, dass die zelluläre Verteilung der Kinase in der zytosolischen Fraktion eine größere Menge aufwies als in der partikulären (Abb. 56).

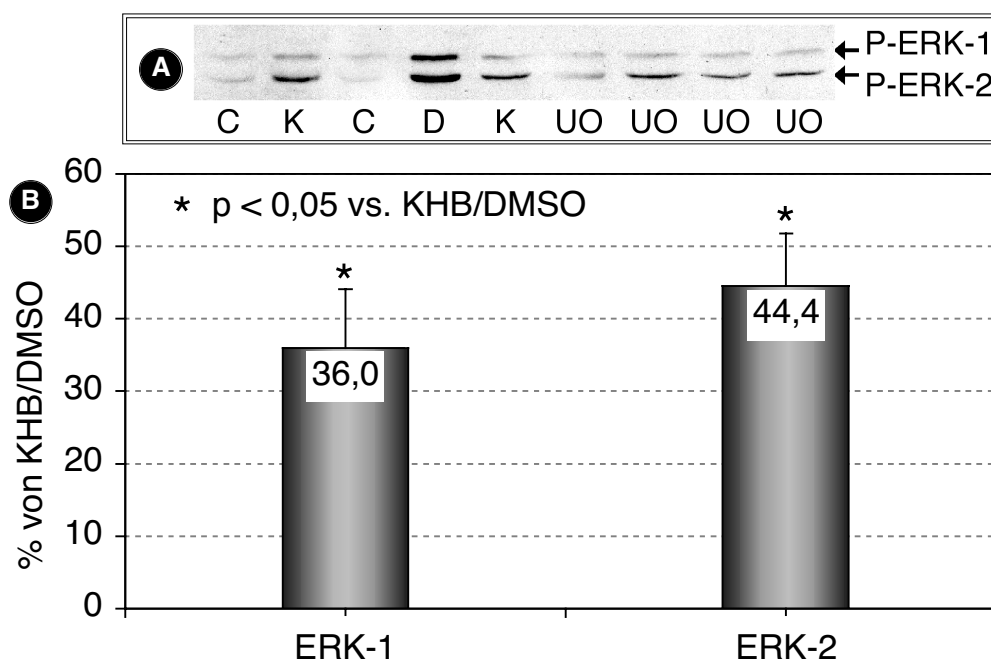


Abb. 54: (A) Die Abbildung zeigt eine Western Blot Analyse unter Verwendung von Myokardproben, die nach lokaler intramyokardialer UO126-Applikation am Ende von IP2 entnommen wurden. Die Phosphorylierungsintensität (P) von ERK-1/2 wurde mittels des monoklonalen Antikörpers, welcher sich gegen Phospho-ERK-1/2 (zytosolische Fraktion) richtete, untersucht. C: Kontrolle des NRG (Nicht-Risikogebiet); K: Kontrolle des RG (Risikogebiet); UO: UO126-Inhibition; D: KHB/DMSO-Kontrolle. (B) Quantifizierung des Effekts der UO126-Inhibition auf die Phosphorylierung von ERK-1 und ERK-2. Kontrolle: KHB/DMSO; ERK-1: extrazellulär-regulierte-Kinase 1 (p44 MAPK); ERK-2: extrazellulär-regulierte-Kinase 2 (p42 MAPK).

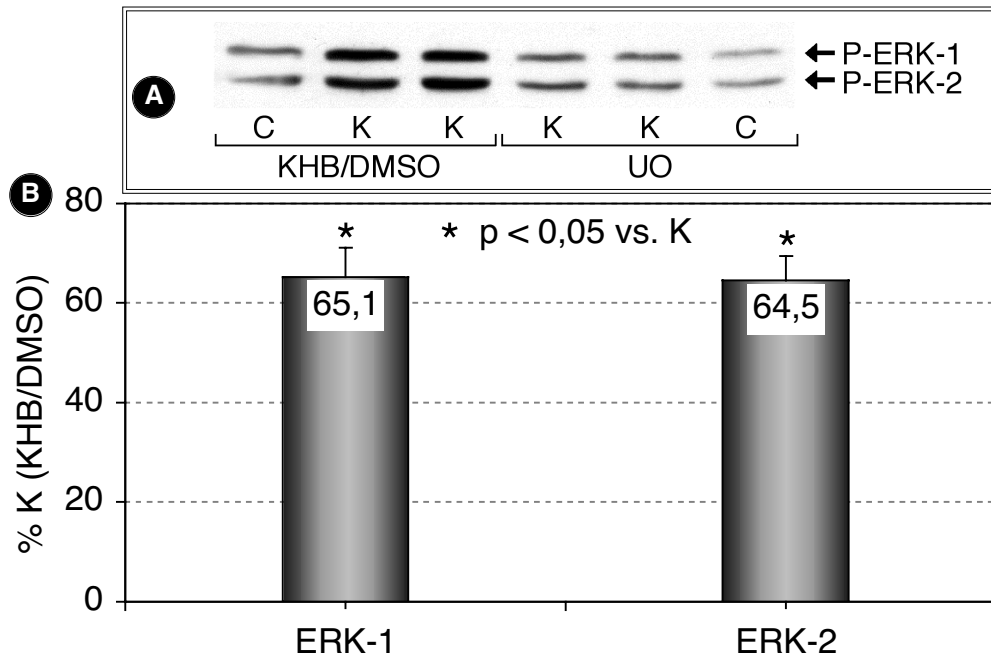


Abb. 55: **(A)** Western Blot Analyse nach systemischer UO126-Applikation am Ende von IP2. Untersucht wurde mittels des monoklonalen Antikörpers, der sich gegen Phospho (P)-ERK-1/2 (zytosolische Fraktion) richtete. C: Kontrolle des NRG (Nicht-Risikogebiet); K: Kontrolle des RG (Risikogebiet); UO: UO126-Inhibition; KHB/DMSO: Gewebe von KHB/DMSO-behandelten Tieren. **(B)** Quantifizierung des Effekts der systemischen UO126-Inhibition auf die Phosphorylierungsintensität von ERK-1 und ERK-2. Kontrolle: KHB/DMSO; ERK-1: extrazellulär-regulierte-Kinase 1 (p44 MAPK); ERK-2: extrazellulär-regulierte-Kinase 2 (p42 MAPK).

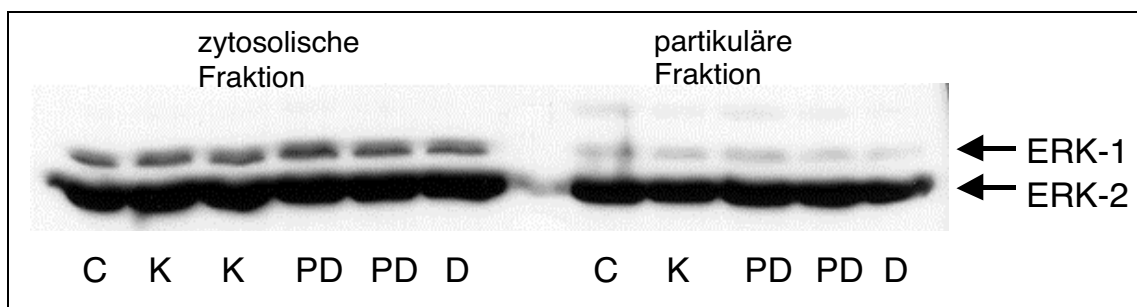


Abb. 56: Western Blot Analyse nach lokaler intramyokardialer PD98059-Infusion am Ende des IP 2 (in der zytosolischen und partikulären Fraktion). Untersucht wurde mit dem polyklonalen Antikörper gerichtet gegen die nicht-phosphorylierte Form von ERK-2 (eine moderate Kreuzreaktion mit ERK-1 ist vorhanden). C: Kontrolle des NRG (Nicht-Risikogebiet); K: Kontrolle des RG (Risikogebiet); PD: PD98059-Inhibition; D: KHB/DMSO-Kontrolle.

7.2. Effekt der PD98059- und UO126-Applikation auf die Phosphorylierungsintensität bzw. Aktivität der SAPKs-Kaskade

Um eine Kreuzreaktion der Inhibitoren auf die anderen Kaskaden der MAPKs auszuschließen, untersuchten wir ebenfalls die Phosphorylierungsintensität der SAPK/JNKs und der p38-MAPK.

Es zeigte sich im Nachweis der SAPK/JNKs (Thr183/Tyr185) in den Myokardbiopsien nach Präkonditionierung sowohl in den PD98059-, UO126-, DMSO/KHB-behandelten und unbehandelten Myokardarealen eine gleichbleibende Phosphorylierungsintensität. Durch die Reperfusionsphasen der ischämischen Präkonditionierung erfolgte übereinstimmend zu unseren früheren Ergebnissen eine Aktivierung der SAPK/JNKs, die jedoch nicht durch PD98059 oder UO126 verhindert wurde (Abb. 48). Eine Kreuzreaktivität der Inhibitoren PD98059 und UO126 auf die anderen SAPK/JNKs-Kaskaden konnte somit ausgeschlossen werden (Abb. 57).

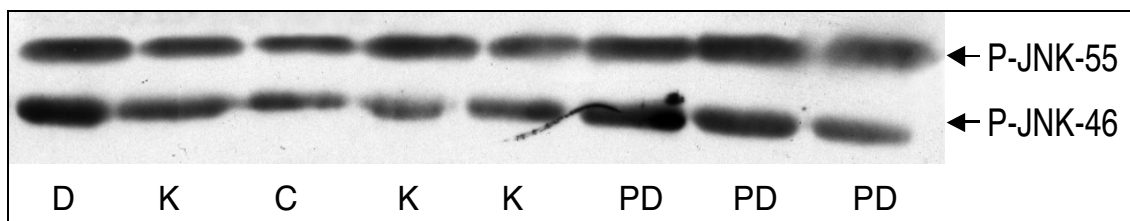


Abb. 57: Dieser Western Blot zeigt den Effekt der lokalen intramyokardialen PD98059-Infusion auf die Phosphorylierung (P) der JNK 55/ 46 (JNK-1/ 2) nach Ende des ischämischen Präkonditionierungsprotokolls 2. C: Kontrolle des NRG (Nicht-Risikogebiet); K: Kontrolle des RG (Risikogebiet); PD: PD98059-Inhibition; D: KHB / DMSO-Kontrolle.

Eine p38-MAPK-Phosphorylierung konnte nach der Präkonditionierung nicht festgestellt werden, d.h während der zweiten Reperfusionsphase des Präkonditionierungsprotokolls hatte bereits eine Deaktivierung der p38-MAPK stattgefunden. Daher untersuchten wir die Phosphorylierungsintensität der p38-MAPK auch noch zum Zeitpunkt der 10. min der folgenden Indexischämie. Hier war im ischämischen Myokard im Vergleich zum nicht-ischämischen Myokard eine signifikant ($p < 0,05$) gesteigerte Phosphorylierung der p38-MAPKs zu beobachten. Es zeigten sich jedoch wiederum keine Unterschiede zwischen den PD98059-, UO126, KHB/DMSO-behandelten und den unbehandelten Myokardarealen (Abb. 58).

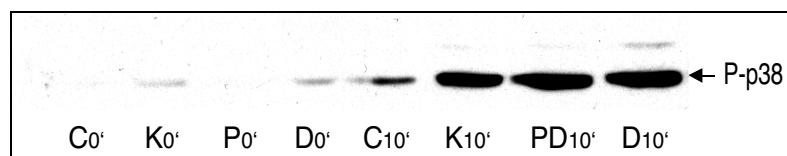


Abb. 58: Dieser Western Blot zeigt den Effekt der lokalen intramyokardialen PD98059-Infusion auf die Phosphorylierung (P) der p38-MAPK am Ende der ischämischen Präkonditionierung 2 (0') und zum Zeitpunkt der 10. min der folgenden Indexischämie (10'). C: Kontrolle des NRG (Nicht-Risikogebiet); K: Kontrolle des RG (Risikogebiet); PD: PD98059-Inhibition; D: KHB / DMSO-Kontrolle.

7.3. Effekt der PD98059- und UO126-Applikation auf die Phosphorylierungsintensität des ERKs Transkriptionsfaktors Elk-1

Ein spezifisches Substrat der ERKs ist der Transkriptionsfaktor Elk-1. Die Bestimmung der Phosphorylierungsintensität des Faktors nach PD98059 oder UO126-Applikation, gab daher Aufschluss, über die noch stattfindende *in-vivo*-Aktivität der ERKs. In der nukleären Zellfraktion konnte nach der Präkonditionierung im Vergleich zu nicht-präkonditioniertem Myokard eine gesteigerte Phosphorylierungsintensität von Elk-1 festgestellt werden. Nach intramyokardialer Applikation des Lösungsmittels wurde eine leichte Zunahme der Phosphorylierung festgestellt. Die Inhibitoren PD98059 und UO126 verursachten jedoch eine vollständige Reduktion der Phosphorylierung auf den nicht-präkonditionierten Ausgangswert (1,7-fache Reduktion vgl. KHB/DMSO-Kontrolle) (Abb. 59).

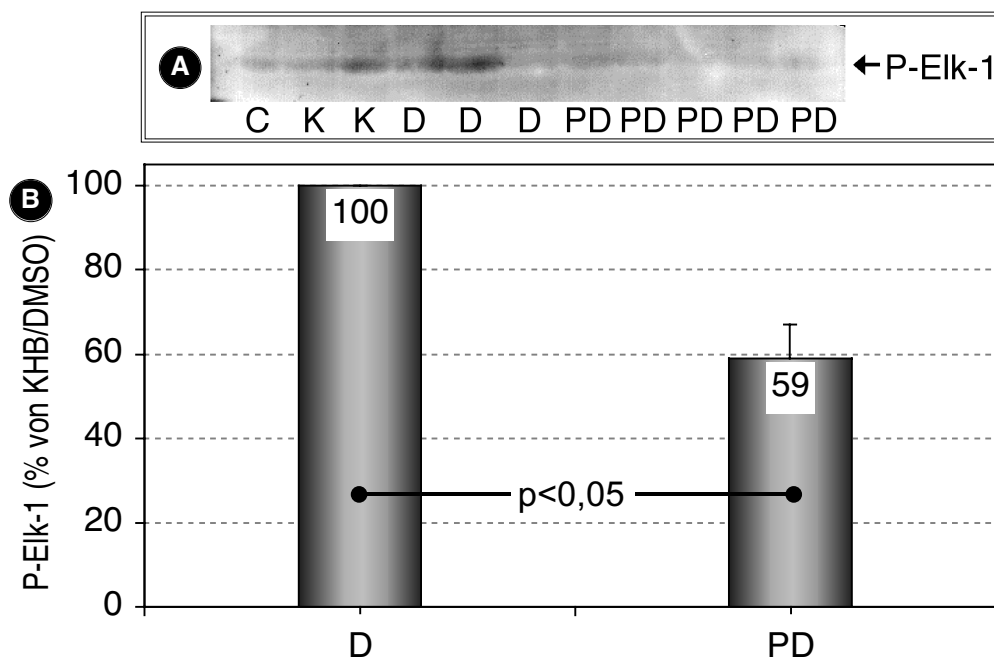


Abb. 59: (A) Western Blot mittels des monoklonalen Antikörpers gerichtet gegen Phospho-Elk-1 (nukleäre Fraktion). C: Kontrolle des NRG (Nicht-Risikogebiet); K Kontrolle des RG (Risikogebiet); PD: PD98059-Inhibition; D: KHB/DMSO-Kontrolle.

(B) Quantifizierung des Effekts des PD98059-Inhibitors auf die Phosphorylierung des nukleären Transkriptionsfaktors Elk-1. Die Werte des PD98059-behandelten Gewebes wurden im prozentualen Anteil zu den Werten des KHB/DMSO-behandelten Gewebes dargestellt.

8. Untersuchung der SAPKs/JNKs-Kaskade mittels des Inhibitors Taxol

In diesem Versuchsabschnitt der Studie wurden die Auswirkungen der Taxol-Applikation auf die Infarktentstehung des Myokards beobachtet. Taxol wurde sowohl auf dem Weg der systemischen als auch lokal intramyokardialen Applikation getestet.

8.1. Effekt der systemischen Taxol-Applikation auf die Infarktentstehung ohne vorhergehende Präkonditionierung

Taxol wurde systemisch mit einer Dosierung von 0,17 mg/kg KGW in dem Indexischämieprotokoll von 40 min Ischämie und 60 min Reperfusion ohne Präkonditionierung getestet (Protokoll Gruppe IV). Hierbei entstand eine Infarktgröße von $65,4 \pm 1,7\%$ (Abb. 60). Dies bedeutete einen signifikanten ($p < 0,001$) Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe 1 mit einer Infarktgröße von $54 \pm 2\%$ des Risikogebietes.

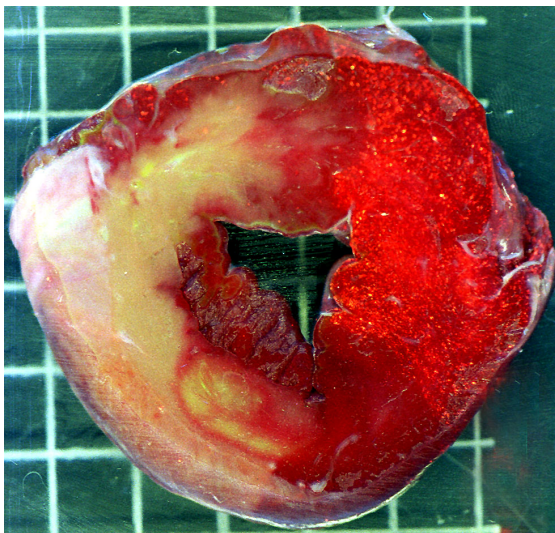
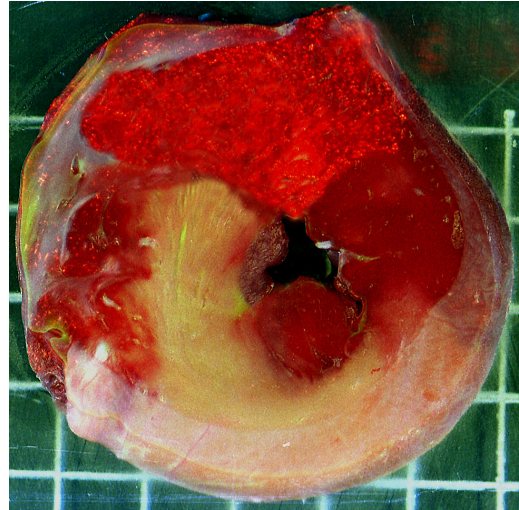


Abb. 60: Die Abbildung zeigt eine Herzscheibenfotografie eines Tieres der Versuchsgruppe IV nach systemischer Infusion von Taxol (0,17 mg/kg KGW) ohne vorgeschaltetes ischämisches Präkonditionierungsprotokoll 2. Die Scheibe wurde in apikaler Schnittansicht aufgenommen.

8.2. Effekt der systemischen Taxol-Applikation auf die Infarktentstehung nach 40 min Okklusion / 60 min Reperfusion mit dem vorgeschalteten Präkonditionierungsprotokoll 2

Taxol wurde bei diesem Versuchsvorhaben durch intravenöse Applikation für die Zeitdauer von 40 min in einer Konzentration von 0,17 mg/kg KGW verabreicht. Die Applikation erfolgte vor der ersten Ischämiephase und während beider Reperfusionsszyklen des Präkonditionierungsprotokolls. Taxol induzierte eine Infarktgröße von $40,1 \pm 4,2\%$ des Risikogebietes. Dieser Wert stellte im Vergleich zum Präkonditionierungsprotokoll 2 eine signifikante ($p < 0,001$) Zunahme der Infarktgröße dar (IGr: $2,5 \pm 0,1\%$) (Abb. 61 und 63).

Abb. 61: Die Abbildung zeigt die apikale Schnittansicht einer Herzscheibe eines Tieres der Versuchsgruppe VI nach systemischer Infusion von Taxol (0,17 mg/kg KGW) und ischämisches Präkonditionierungsprotokoll 2.



8.3. Effekt der lokalen / intramyokardialen Taxol-Applikation auf die Infarktentstehung nach 40 min Okklusion / 60 min Reperfusion und dem vorgeschalteten Präkonditionierungsprotokoll 2

Die lokale intramyokardiale Taxol-Mikroinfusion erfolgte während eines 40 minütigen Vorlaufs vor dem ersten Ischämiezyklus des Präkonditionierungsprotokolls und während beider Reperfusionenzyklen des Präkonditionierungsprotokolls (siehe Protokoll; Versuchsgruppe VII). Es wurden die Molaritäten 100 nM und 50 nM der Substanz getestet. Das nekrotische Myokardgebiet nach mikroinfusierter Applikation von 100 nM Taxol hatte die Größe von $34,1 \pm 2,6\%$ des Risikogebietes. Nach 50 nM Taxol-Infusion betrug die Infarktgröße $28 \pm 3,2\%$. (Abb. 62A und B und 63). Beide Infarktgrößen waren signifikant ($p < 0,001$) größer als die der Präkonditionierungs-Kontrolle 2 (IGr: $2,5 \pm 0,1\%$).

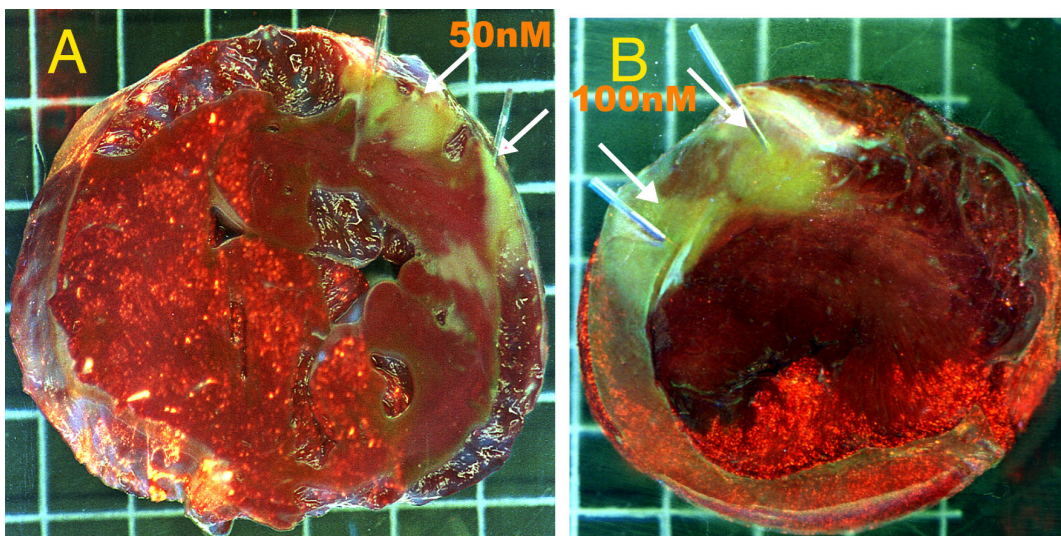


Abb. 62: **A** Basale Schnittansicht einer Herzscheibe eines Tieres der Gruppe VII nach lokaler intramyokardialer Mikroinfusion von Taxol (beide Nadeln mit 50 nM). **B** Apikale Ansicht einer Herzscheibe unter den gleichen Versuchsbedingungen wie unter A, Taxol wurde hier mit 100 nM lokal infundiert.

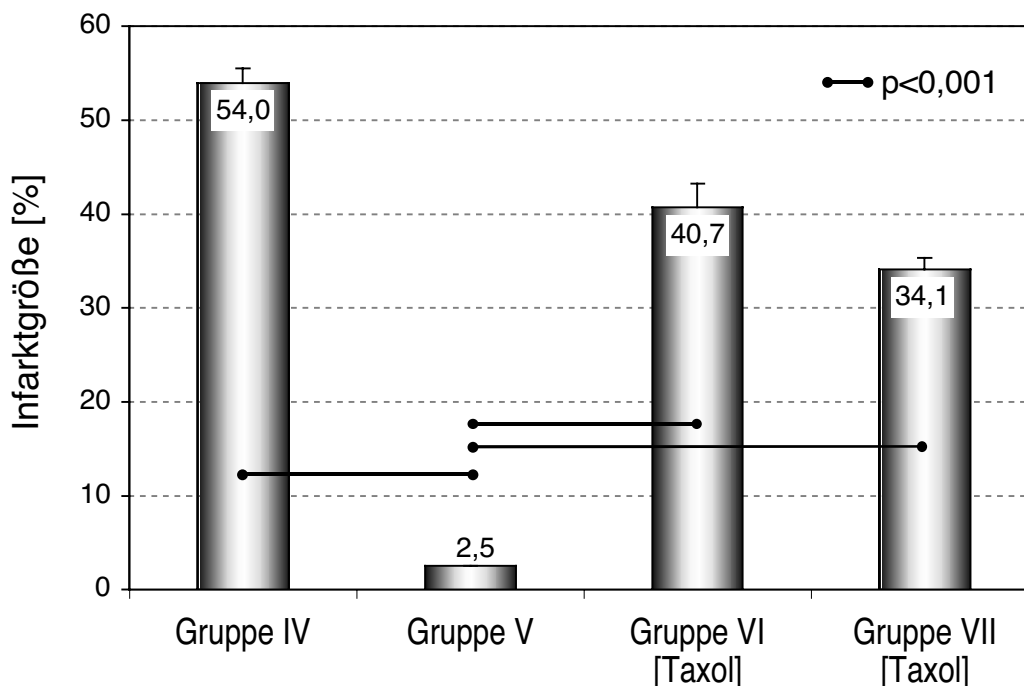


Abb. 63: Grafische Darstellung der Infarktgrößen der Gruppe IV (Indexschämiekontrolle 2), der Gruppe V (Präkonditionierungsprotokoll 2), der Gruppe VI (Präkonditionierungsprotokoll 2 mit systemischer Applikation von Taxol) und der Gruppe VII Präkonditionierungsprotokoll 2 mit lokaler intramyokardialer Infusion von Taxol (100 nM).

9. In-vitro-Untersuchungen der Taxol-Studie

In diesem Versuchsabschnitt der Studie wurde anhand von Western Blot Analysen die Auswirkungen der Taxol-Applikation auf den Phosphorylierungsstatus der SAPKs/JNKs-Kaskade dargestellt.

9.1. Effekt von Taxol auf die Phosphorylierungsintensität / Aktivität der SAPKs/JNKs-Kaskade

Es wurden Myokardproben nach Beendigung des Präkonditionierungsprotokolls verarbeitet, die mit einer vorgeschalteten systemischen Taxol-Bolusgabe und einer Simultangabe während der Reperfusionzyklen der Präkonditionierung behandelt wurden (0,17 mg/kg KGW). Es konnte im Risikogebiet des behandelten Herzwebes eine 1,5-fache Verminderung der Phosphorylierung der JNK-1 und eine 2-fache Minderung der JNK-2 (Thr183/Tyr185) im Vergleich zu den KHB/DMSO-Werten festgestellt werden (Abb. 64 und 65).

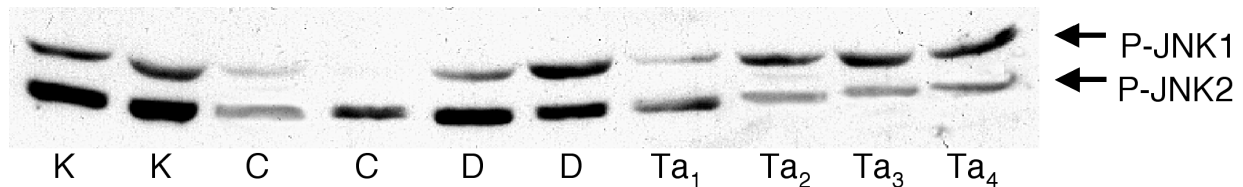


Abb. 64: Die Abbildung zeigt mittels einer Western Blot Analyse den Effekt der lokalen intramyokardialen Taxol-Infusion auf die Phosphorylierung (P) der JNK-1/2 (p 55/ 46) nach Ende des ischämischen Präkonditionierungsprotokolls 2. (zytosolische Fraktion) C: Kontrolle des NRG (Nicht-Risikogebiet); K: Kontrolle des RG (Risikogebiet); Ta: Taxol-Inhibition; D: KHB/DMSO-Kontrolle. 1-4 Taxol-behandeltes Myokardgewebe aus vier verschiedenen Versuchen.

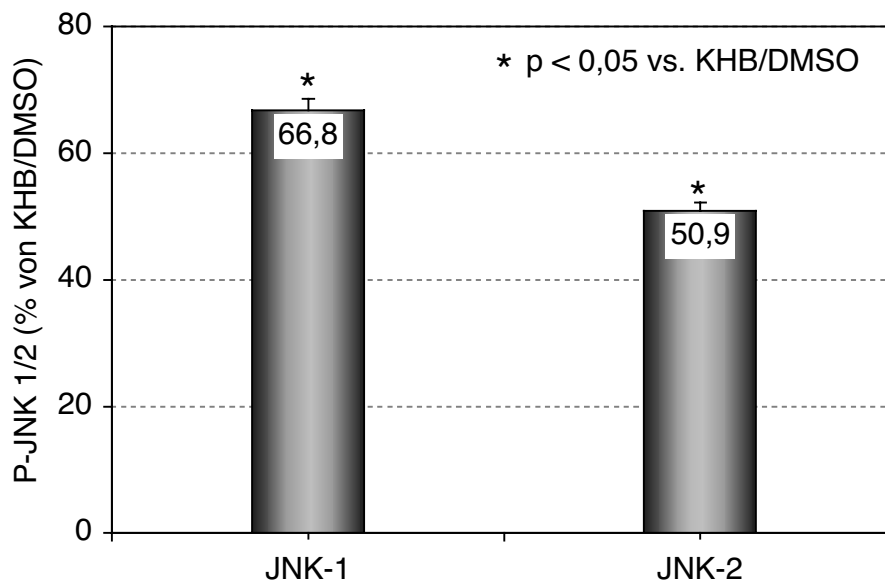


Abb. 65: Die Abbildung zeigt die grafische Darstellung der Quantifizierung der Phosphorylierungsinhibition der JNK-1 und JNK-2 (p55/46) durch Taxol-Applikation (0,17 mg/kg KGW) Werte in Prozent der KHB/DMSO Kontrolle. Es wurden Proben nach dem ischämischen Präkonditionierungsprotokoll 2 entnommen.

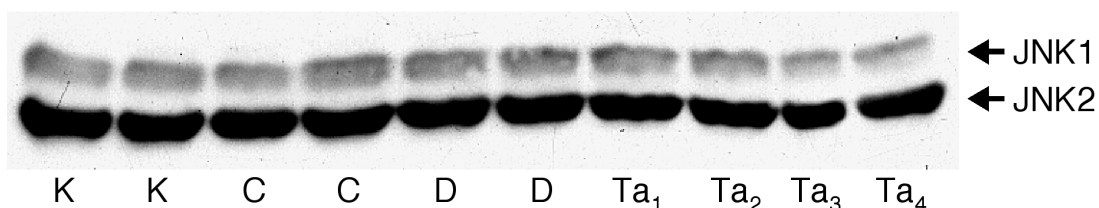


Abb. 66: Western Blot Analyse nach lokaler intramyokardialer Infusion von Taxol. Es wurden Myokardproben verwendet, die am Ende des ischämischen Präkonditionierungsprotokolls 2 (in der zytosolischen Fraktion) entnommen wurden. Sie wurden mit dem polyklonalen Antikörper, gerichtet gegen die nicht-phosphorylierte Form von JNK-2 (eine moderate Kreuzreaktion mit JNK-1 war zu beobachten) untersucht. C: Kontrolle des NRG (Nicht-Risikogebiet); K: Kontrolle des RG (Risikogebiet); Ta: Taxol-Inhibition; D: KHB/DMSO-Kontrolle. 1-4 Taxol-behandeltes Myokardgewebe aus vier verschiedenen Versuchen.

In einem weiteren Versuchsabschnitt wurde die unphosphorylierte Form der JNK-2 mittels Westen-Blot-Analyse untersucht. Es konnte ein gleichmäßiges Proteinverteilungsmuster in allen Proben gezeigt werden (Abb. 66). Dies bedeutet, dass weder der Verlauf der ischämischen Präkonditionierung, noch eine KHB/DMSO- oder Taxol-Behandlung eine Veränderung des Gesamtproteinanteils der JNKs bedingte.

9.2. Effekt von Taxol auf die Phosphorylierungsintensität / Aktivität des SAPKs/JNKs-Transkriptionsfaktor c-Jun

Ein spezifischer Transkriptionsfaktor der SAPKs/JNKs ist der c-Jun-Faktor. Die Phosphorylierung von c-Jun nach der Applikation von Taxol und Komplettierung des Präkonditionierungsprotokolls, zeigte eine verminderte Phosphorylierungsintensität im Vergleich zur KHB/DMSO-Kontrolle. Die KHB/DMSO-Kontrolle wies wiederum gegenüber dem nicht-präkonditionierten Herzgewebe eine erhöhte Phosphorylierung auf (Abb. 67 und 68).

Die Bestimmung der unphosphorylierten Form des Transkriptionsfaktors zeigte keine Unterschiede des nukleären Gesamtanteils des Faktors auf. Dies war unabhängig von der Taxol- oder der KHB/DMSO-Behandlung, in präkonditioniertem oder nicht-präkonditioniertem Myokard.

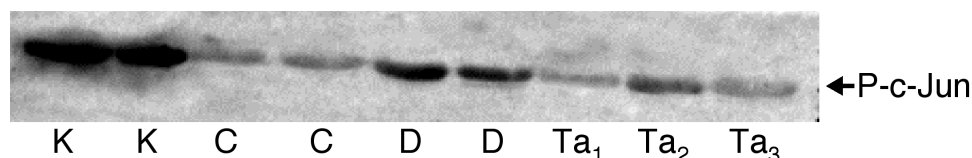


Abb. 67: Western Blot mittels des monoklonalen Antikörpers, welcher sich gegen die phosphorylierte (P)-c-Jun richtete (nukleäre Fraktion). C: Kontrolle des NRG (Nicht-Risikogebiet); K: Kontrolle des RG (Risikogebiet); Ta: Taxol-Applikation; D: KHB/DMSO-Applikation. 1-3 Taxol-behandeltes Myokardgewebe aus drei verschiedenen Versuchen.

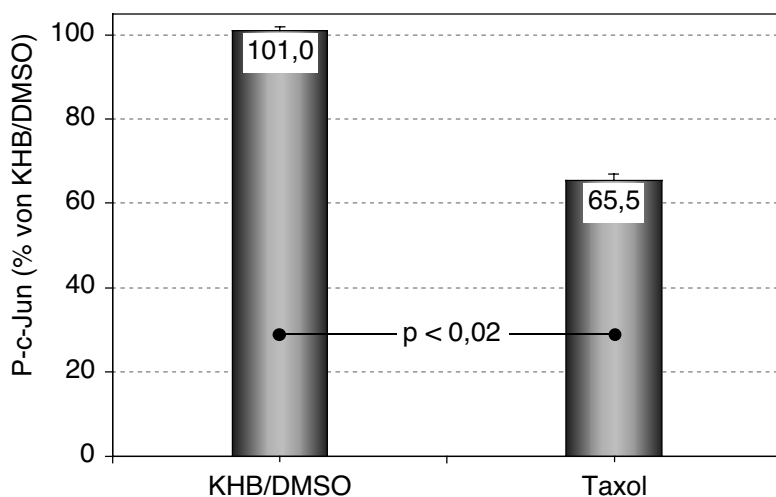


Abb. 68: Quantifizierung des Inhibitionseffekts der Phosphorylierung (P) des nukleären Transkriptionsfaktors c-Jun durch die Taxol-Applikation (17 mg/kg KG). Werte in Prozent der KHB/DMSO-Kontrolle.

10. Untersuchung des nukleären Signaltransduktionsmechanismus der ischämischen Präkonditionierung mittels des Transkriptionsgiftes Actinomycin-D

10.1. Effekt der systemischen Actinomycin-D-Applikation auf die Infarkt-entstehung nach 40 min Ischämie / 60 min Reperfusion ohne Präkonditionierung

In diesem Abschnitt der Arbeit betrachteten wir den Effekt der systemischen und lokalen intramyokardialen Actinomycin-D-Applikation auf die Infarkt-entstehung ohne ein vorangeschaltetes Präkonditionierungsprotokoll.

Actinomycin-D wurde systemisch mit einer Dosierung von 0,05 mg/kg KGW im Indexischämieprotokoll, bestehend aus 40 min Ischämie und 60 min Reperfusion ohne vorangeschaltetes Präkonditionierungsprotokoll getestet (siehe Protokoll; Versuchsgruppe IV). Die Substanz wurde für die Zeitdauer von 60 min vor der Indexischämie appliziert. Die entstandene Infarktgröße von $78,5 \pm 3,8\%$ zeigte einen signifikanten ($p < 0,05$) Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe 1 mit einer Infarktgröße von $54 \pm 2\%$ des Risikogebietes (Abb. 69).

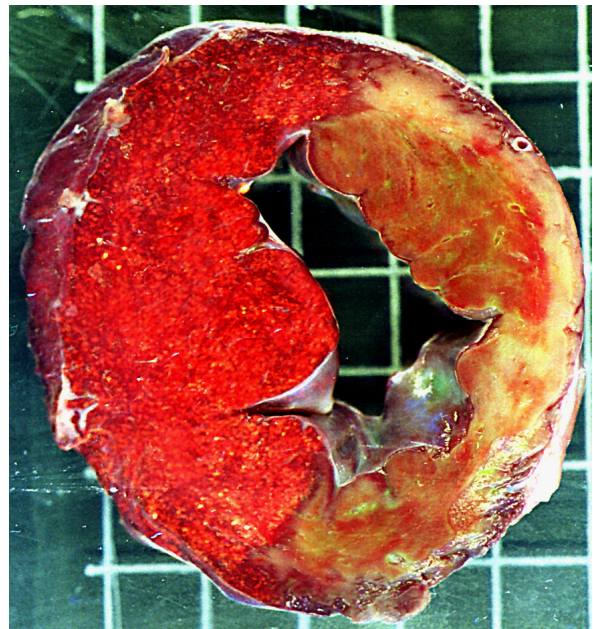


Abb. 69: *Herzscheibe eines Tieres der Versuchsgruppe IV nach systemischer Actinomycin-D-Applikation (0,05 mg/kg KGW) ohne Präkonditionierung. Die Fotografie zeigt die apikale Schnittfläche der Scheibe.*

10.2. Effekt der systemischen Actinomycin-D-Applikation auf die Infarkt-entstehung nach 40 min Ischämie / 60 min Reperfusion und dem vorgeschalteten Präkonditionierungsprotokoll 2

Actinomycin-D wurde bei dieser Art der Applikation durch eine intravenöse Gabe für die Dauer von 40 min in den Dosierungen 0,12 mg/kg KGW oder 0,05 mg/kg KGW vor der ersten Ischämiephase des Präkonditionierungszyklus und während beider Reperfusionen des Präkonditionierungsprotokolls verabreicht (Protokoll Gruppe VI). Die Infarktgröße betrug $88,6 \pm 1,7\%$ und respektive $65,6 \pm 1,5\%$ des Risikogebietes. Diese Werte zeigten im Vergleich zum Präkonditionierungsprotokoll 2 eine signifikante Zunahme der Infarktgröße ($p < 0,001$; Abb. 70 u. 71).

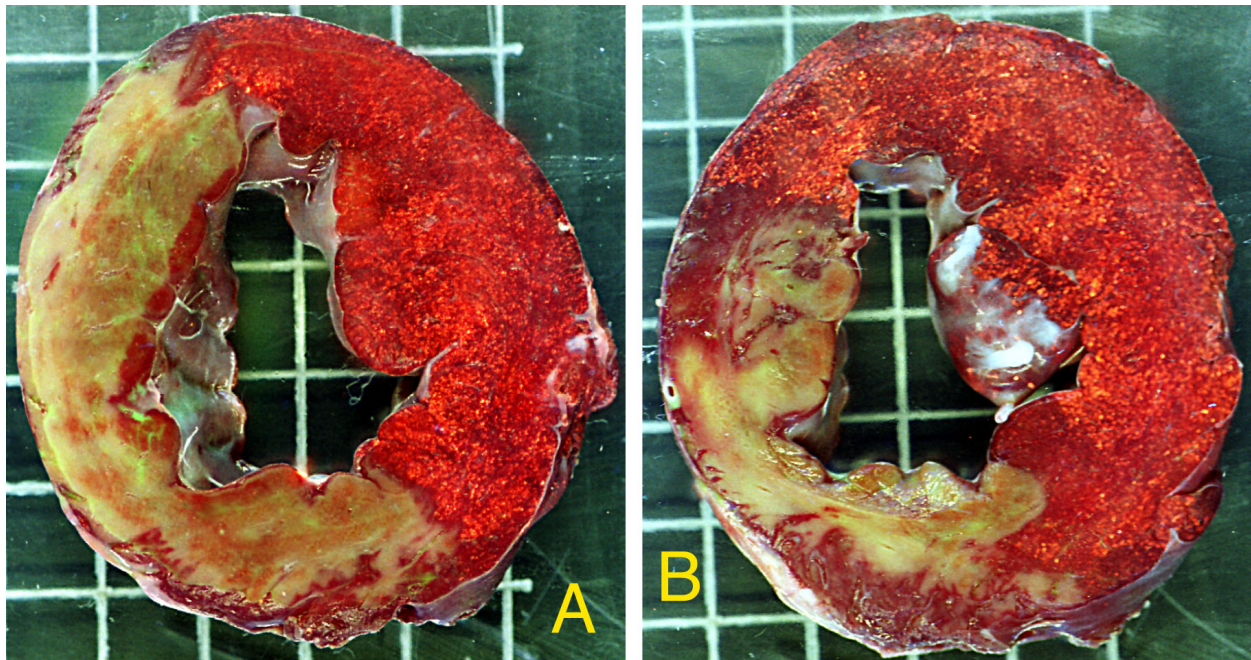


Abb. 70: (A) Herzscheibe eines Tieres der Gruppe VI nach systemischer Actinomycin-D Gabe (0,1 mg/kg KGW) und ischämischem Präkonditionierungsprotokoll 2. (B) Herzscheibe nach der Gabe der niedrigeren Actinomycin-D-Dosierung (0,05 mg/kg KGW). Beide Scheiben sind in basaler Schnittansicht abgebildet.

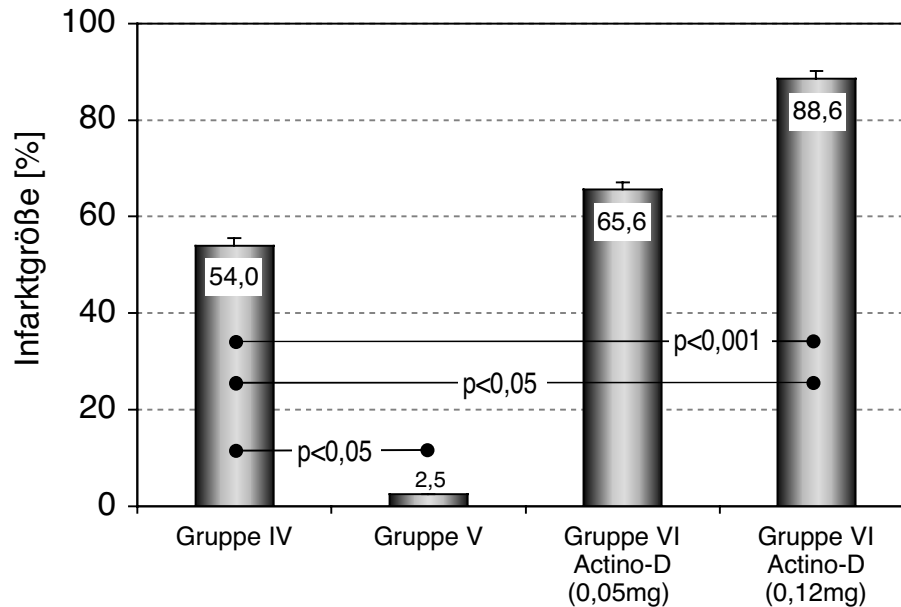


Abb. 71: Darstellung der Infarktgröße der Gruppe IV (Indexischämiekontrollgruppe 2), der Gruppe V (Präkonditionierungsprotokoll 2) sowie der Versuchsgruppe VI nach systemischer Gabe von Actinomycin-D in der Konzentration von 0,05 mg/kg KGW und 0,12 mg/kg KGW.

10.3. Effekt der lokalen / intramyokardialen Actinomycin-D-Applikation auf die Infarktentstehung nach 40 min Ischämie / 60 min Reperfusion und dem vorgeschalteten Präkonditionierungsprotokoll 2

Die lokale / intramyokardiale Actinomycin-D-Mikroinfusion erfolgte ebenfalls während eines 40 minütigen Vorlaufs vor dem ersten Ischämiezyklus des Präkonditionierungsprotokolls 2 und während beider Reperfusionenzyklen des Präkonditionierungsprotokolls (siehe Protokoll; Versuchsgruppe VII). Es wurden die drei Molaritäten des Transkriptionsgiftes Actinomycin-D getestet: 50 μM , 25 μM und 12,5 μM . Die mikroinfusuelle Applikation von Actinomycin-D mit 50 μM verursachte einen Infarkt der Größe $39,7 \pm 4,8\%$ des Risikogebietes (Abb. 72C). Nach Actinomycin-D-Mikroinfusion mit 25 μM betrug die Infarktgröße $26,4 \pm 1,8\%$ (siehe Abb. 72A), die mikroinfusuelle Gabe von 12,5 μM Actinomycin-D bewirkte eine IGr von $15,6 \pm 2,3\%$ des Risikogebietes. (siehe Abb. 72B). Es konnte nach lokaler intramyokardialer Actinomycin-D-Infusion in halblogarithmischer Darstellung eine Dosis-Wirkungsbeziehung linearen Verlaufs erstellt werden (Abb. 74).

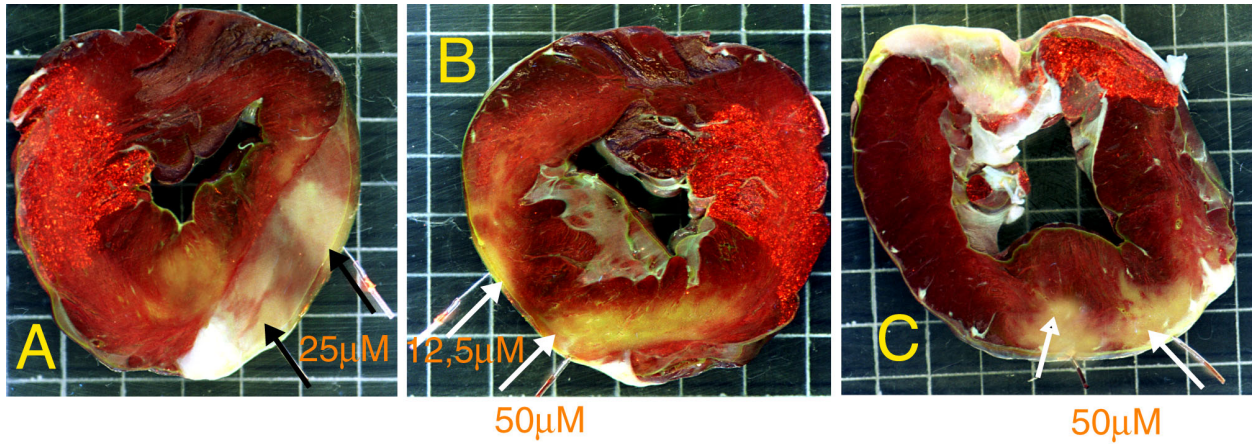


Abb. 72: (A) Apikale Ansicht einer Herzscheibenfotografie nach lokaler intramyokardialer Actinomycin-D-Infusion und Präkonditionierungsprotokoll 2. Über die linke und rechte Nadel wurde Actinomycin-D (25 µM) lokal appliziert. (B) Die Abbildung zeigt eine Herzscheibe in apikaler Ansicht. Über die linke Nadel erfolgte die Applikation von Actinomycin-D mit 12,5 µM, über die rechte Nadel wurde Actinomycin-D mit 50 µM infundiert. (C) Apikale Ansicht der Herzscheibe, lokale intramyokardiale Infusion des Inhibitors Actinomycin-D (50 µM, linke Nadel und rechte Nadel).

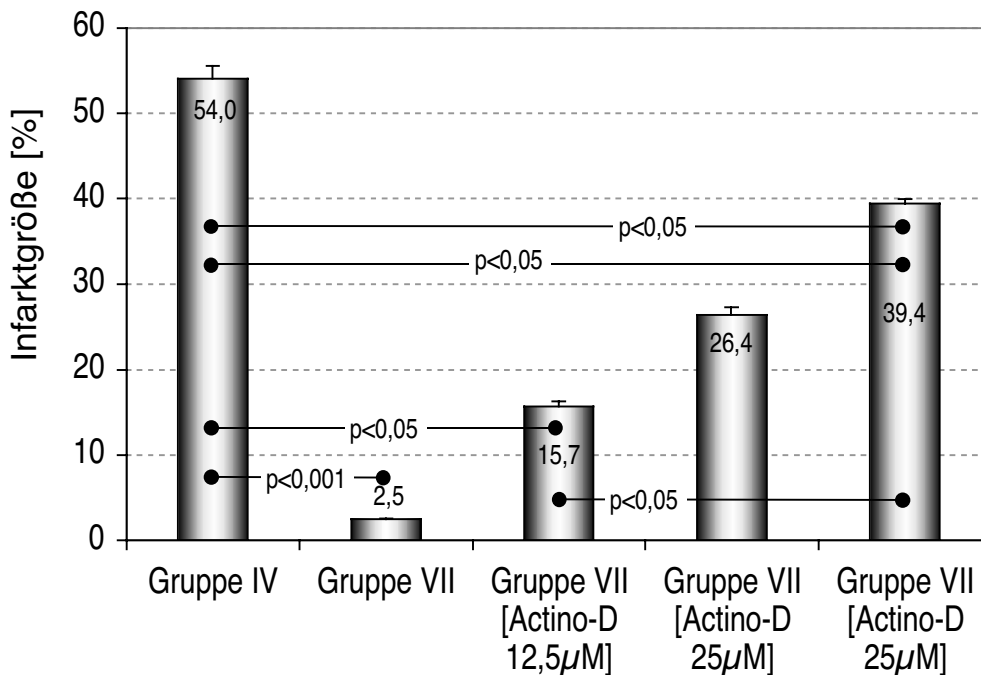


Abb. 73: Die Abbildung zeigt ein Balkendiagramm zur grafischen Darstellung der Infarktgrößen der Gruppe IV (Indexischämiekontrollgruppe 2), der Gruppe V (Präkonditionierungsprotokoll 2) und der Gruppe VII (Präkonditionierungsprotokoll 2 mit lokaler intramyokardialer Infusion von Actinomycin-D in den genannten Molaritäten).

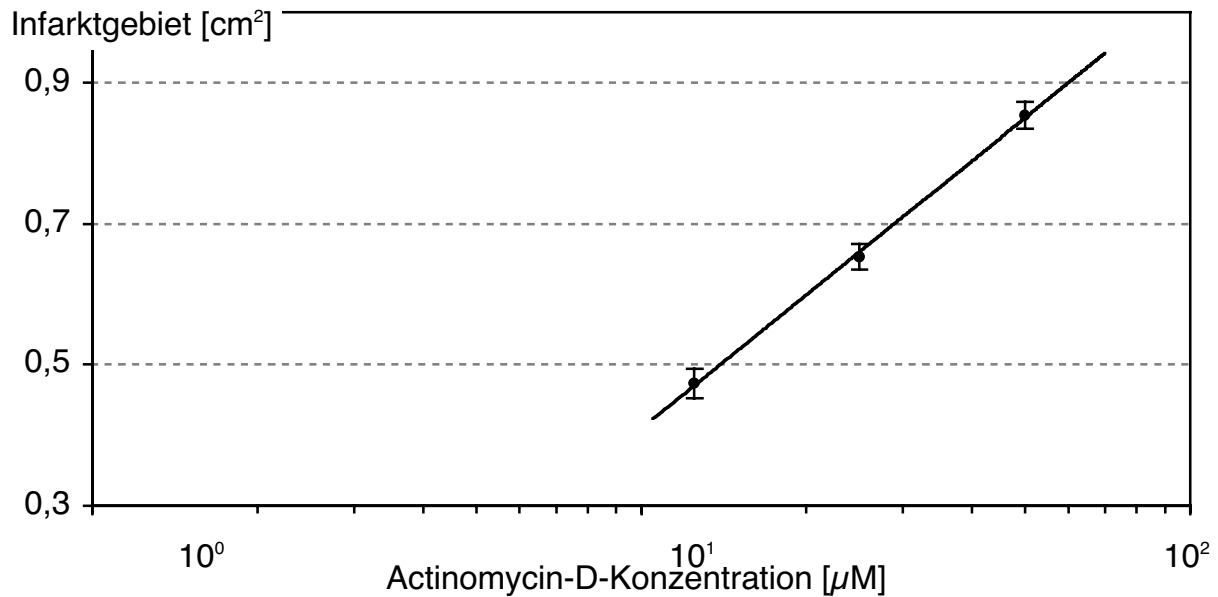


Abb. 74: Dosis-Wirkungsbeziehung der lokalen intramyokardialen Actinomycin-D-Applikation und dem planimetrisch bestimmten Infarktgebiet.

10.4. Effekt von Actinomycin-D auf die Phosphorylierungsintensität / Aktivität der SAPK/JNKs, ERKs und p38-MAPKs sowie die ihrer nachgeschalteten spezifischen Substrate

10.4.1. Auswirkungen der Actinomycin-D-Applikation auf die Transkriptionsfaktoren c-Jun, ATF-2, Elk-1 und c-Myc

Der Phosphorylierungsstatus der Transkriptionsfaktoren c-Jun, ATF-2, Elk-1 und c-Myc zeigte am Ende eines Präkonditionierungsprotokolls im Risikogebiet des Myokards der KHB/DMSO- (siehe Protokoll; Versuchsgruppe V) behandelten Schweine einen signifikanten ($p < 0,05$) Anstieg gegenüber nicht-präkonditioniertem Myokardgewebe. Dieser Anstieg wurde vollständig in den Actinomycin-D-behandelten Tieren verhindert, sodass die Phosphorylierung von ATF-2 um das 15-fache, von c-Myc um das 5-fache, von Elk-1 um das 3-fache und von c-Jun um das 2-fache gegenüber der KHB/DMSO-Kontrolle geringer war. Der zuvor bestimmte Ausgangsphosphorylierungswert des nicht-präkonditionierten Myokards wurde wieder erreicht (siehe Protokoll Versuchsgruppen VI und VII) (Abb. 75 und 76).

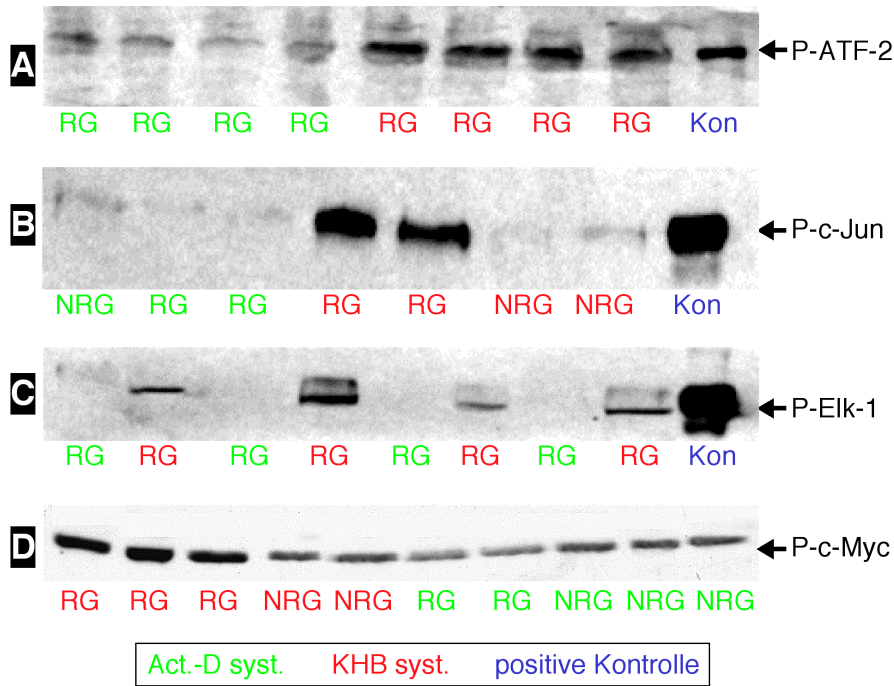


Abb. 75: Diese Western Blots zeigen den Effekt der systemischen Actinomycin-D-Infusion (grüne Beschriftung; Act.-D syst.) und der systemischen KHB/DMSO-Infusion (schwarze Beschriftung; KHB syst.) im Risikogebiet (RG) und Nicht-Risikogebiet (NRG). Es wurden Proben verwendet, die am Ende des ischämischen Präkonditionierungsprotokolls 2 (nukleäre Fraktion) biopsiert wurden. (A) Effekt auf die Phosphorylierungsintensität (P) der Transkriptionsfaktoren ATF-2, (B) c-Jun, (C) Elk-1 und (D) c-Myc.

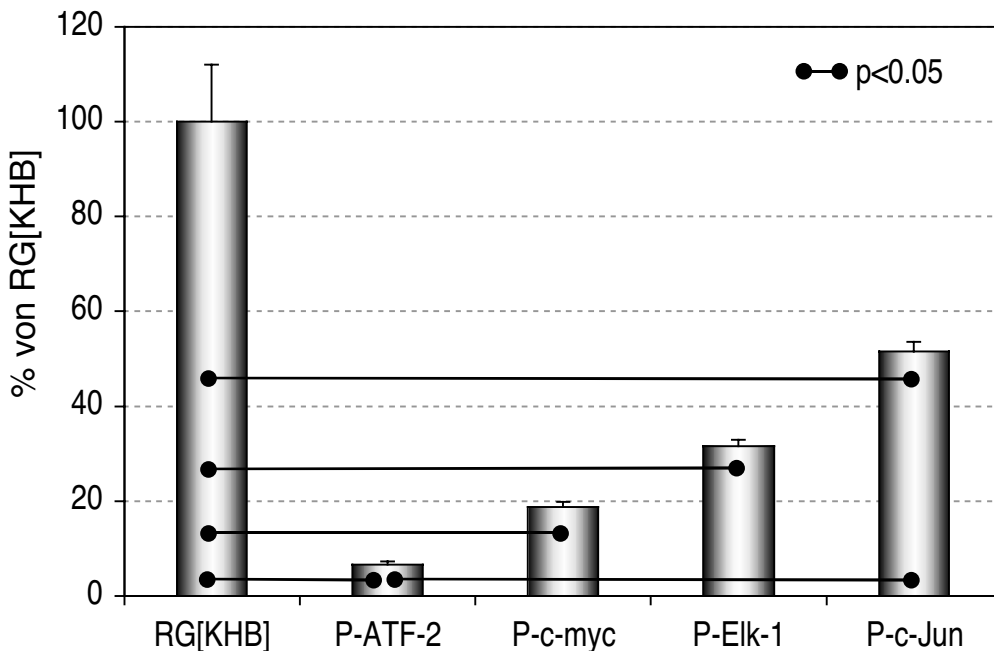


Abb. 76: Quantifizierung der Phosphorylierung (P) der Transkriptionsfaktoren ATF-2, c-Myc, Elk-1 und c-Jun im Risikogebiet (RG) der Actinomycin-D-behandelten Tiere im prozentualen Verhältnis zu den KHB/DMSO-[KHB] behandelten Tieren.

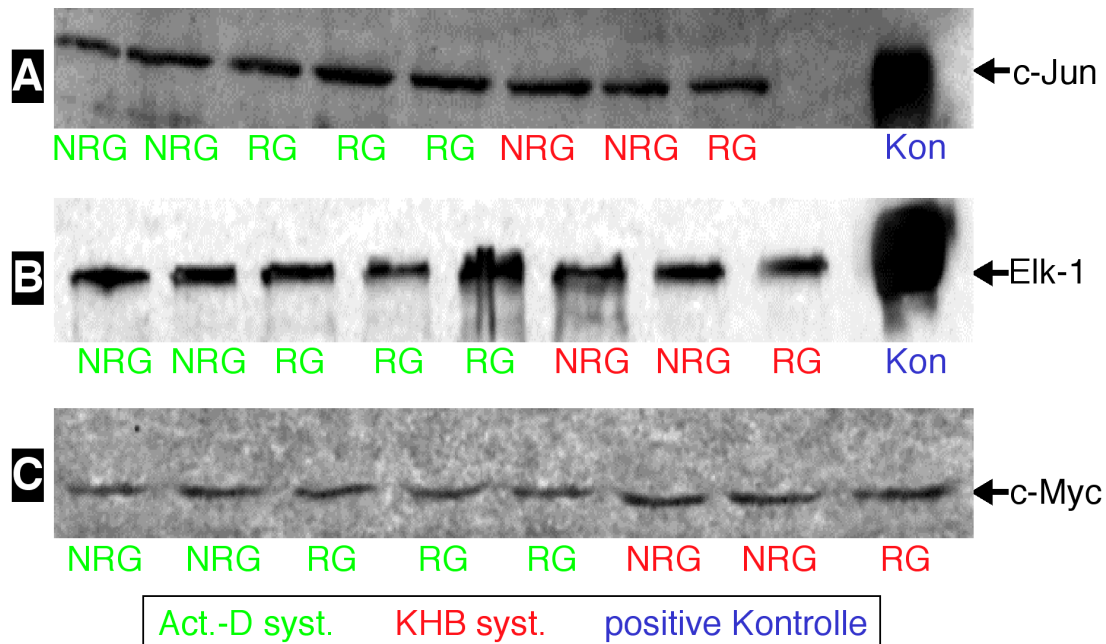


Abb. 77: Auswirkungen der systemischen Actinomycin-D-Infusion (Act.-D syst.) und der systemischen KHB/DMSO-Infusion (KHB syst.) auf den Gesamtproteingehalt einiger beispielhafter Transkriptionsfaktoren der MAPKs-Kaskade. Zeitpunkt der Probenentnahme war am Ende eines ischämischen Präkonditionierungsprotokolls 2 (nukleäre Fraktion) aus dem Risikogebiet (RG) und Nicht-Risikogebiet (NRG).

(A) Auswirkung auf den Transkriptionsfaktor c-Jun.

(B) Effekt auf den Transkriptionsfaktor Elk-1.

(C) Wirkung auf den Transkriptionsfaktor c-Myc.

Analysen der unphosphorylierten Form aller Transkriptionsfaktoren, einschließlich ATF-2, zeigten keine Unterschiede des Gesamtproteinanteils der Faktoren in den untersuchten Proben (Abb. 77 A, B und C).

10.4.2. Auswirkungen der Actinomycin-D-Applikation auf die ERK-1/2

Da die Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren durch die aktivierten, translozierten MAPKs erfolgt, wurde zusätzlich auch der Aktivitätszustand der zytosolischen MAPKs untersucht. Es zeigte sich auch hier eine Inhibition der ERKs sowie der SAPKs durch die systemische Applikation von Actinomycin-D.

Der Anteil der phosphorylierten Form der MAPKs, ERK-1 und ERK-2, nahm im präkonditionierten Myokard während der ersten Ischämieperiode um den Faktor 1,9 bzw. 1,4 gegenüber dem nicht-präkonditionierten Myokardgewebe zu. Ein weiterer Anstieg um die Faktoren 2,1 und 1,7 wurde in der Reperfusion festgestellt. Das Phosphorylierungsmaximum von ERK-1 und ERK-2 konnte am Ende des Präkonditionierungsprotokolls festgestellt werden. ERK-1 zeigte nach Beendigung der Präkonditionierung einen 3,2-fachen, ERK-2 einen 2,6-fachen Anstieg. Diese Phosphorylierungssteigerung der zytosolischen ERKs durch die aufeinander-

folgenden Ischämie- und Reperfusionphasen der Präkonditionierung wurde durch den Einsatz von Actinomycin-D verhindert. Wir beobachteten für beide Kinasen eine stetige Inhibition während des Präkonditionierungsverlaufes sowie am Ende der Präkonditionierung. Es konnte für ERK-1 eine 3,75-fache und für ERK-2 eine 5,8-fache Verminderung der Phosphorylierung gegenüber den präkonditionierten KHB/DMSO-behandelten Tieren (Abb. 78 A und B) festgestellt werden.

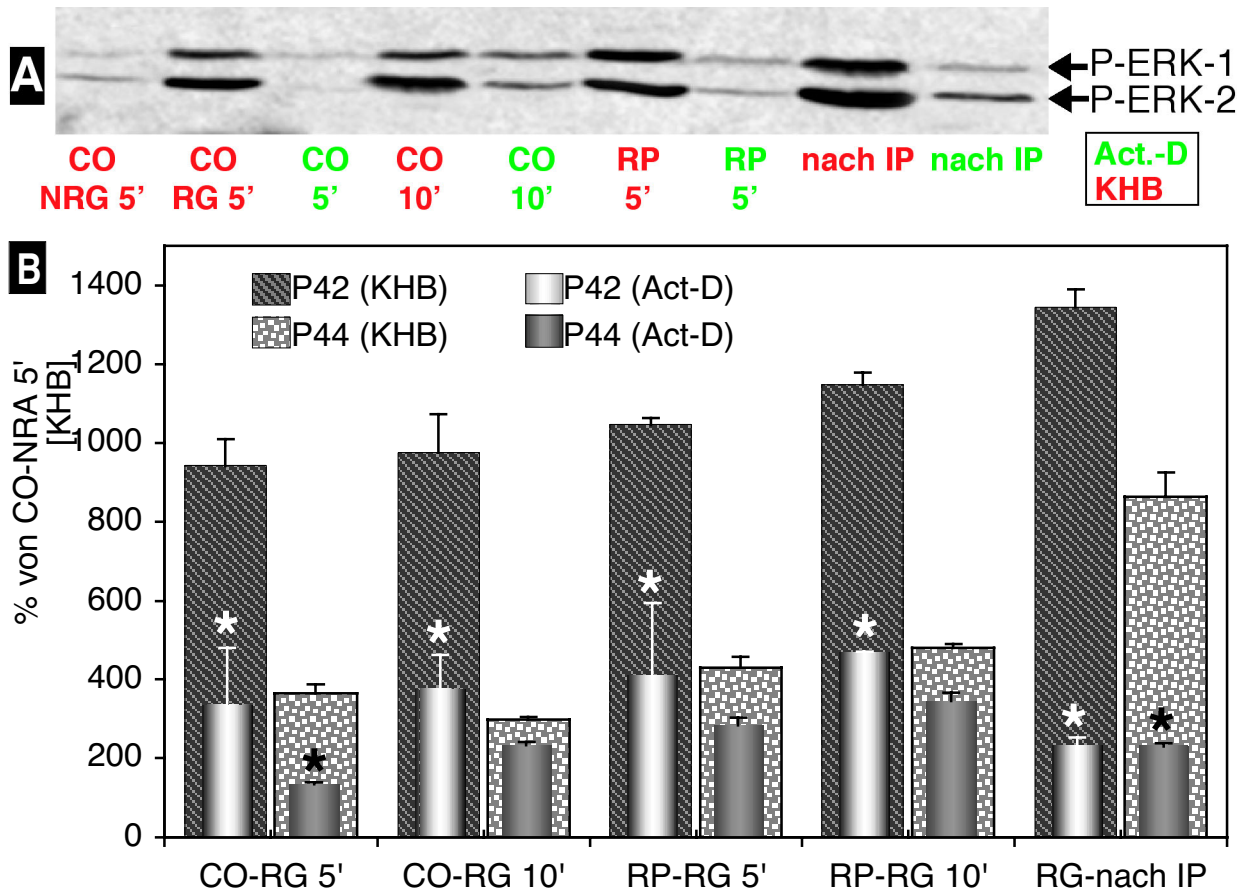


Abb. 78: (A) Dieser Western Blot zeigt im Risikogebiet (RG) und Nicht-Risikogebiet (NRG) die Wirkung der systemischen Actinomycin-D- (grün; Act.-D syst.) und der systemischen KHB/DMSO-Infusion (rot; KHB syst.) auf die Phosphorylierung der ERK-1/2 (MAPK p44 und p42, zytosolische Fraktion). Die Gewebeproben wurden im Verlauf (5' = 5. min und 10' = 10. min) der ersten Okklusionsphase (CO) und zum Zeitpunkt der 5. min (5') der ersten Reperfusionphase (RP) des Präkonditionierungsprotokolls (IP) sowie am Ende des IP (nach IP) entnommen. (B) Quantifizierung der Phosphorylierungsintensität der MAPKs p44/42 (ERK-1/2) nach Actinomycin-D- (hell- und dunkelgraue Säulen) und KHB/DMSO-Behandlung (schwarz und grau gemusterte Säulen) im Risikogebiet (RG). Es wurden Daten zum Zeitpunkt der 5' (5. min), 10' (10. min) der ersten Okklusionsphase (CO), der 5' (5. min) der ersten Reperfusionphase (RP) des Präkonditionierungsprotokolls (IP) sowie am Ende des IP (nach IP = nach ischämischer Präkonditionierung (zytosolische Fraktion) in die Berechnung einbezogen. Der prozentuale Anteil der dargestellten phosphorylierten Form der ERK-1/2 wurde im Vergleich zu den Werten des Nicht-Risikogebietes zum Zeitpunkt der 5. min der Ischämie von KHB/DMSO-behandelten Tieren ermittelt.

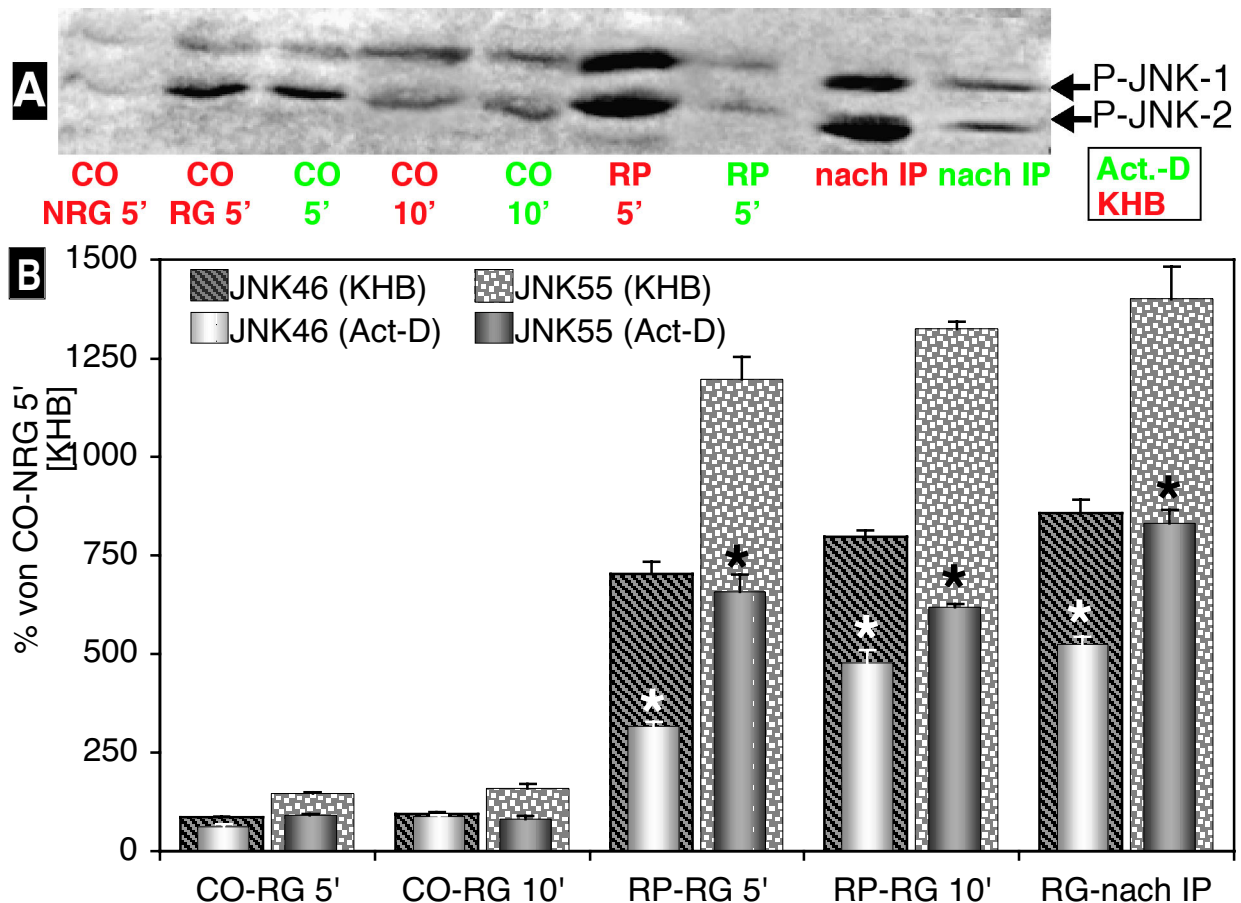


Abb. 79: (A) Dieser Western Blot zeigt die inhibierende Wirkung der systemischen Actinomycin-D-Infusion (grüne Beschriftung; Act.-D syst.) auf die Phosphorylierung der JNK-1/2 (Stress-aktivierte Proteinkinase p55 und p46, zytosolische Fraktion). Es wurden Biopsieproben des Risikogebiets (RG) und Nicht-Risikogebiets (NRG) im Verlauf der ersten Okklusionsphase (CO) (5' = 5. min und 10' = 10. min), zum Zeitpunkt der 5' (5. min) der ersten Reperfusionphase (RP) des Präkonditionierungsprotokolls (IP) sowie am Ende des IP (nach ischämischer Präkonditionierung) untersucht. Die Kontrolle stellt die systemische KHB/DMSO-Infusion (rote Beschriftung; KHB syst.) dar. (B) Quantifizierung der Phosphorylierungsintensität der JNK 55/46 (JNK-1/2) nach Actinomycin-D- (hell- und dunkelgraue Säulen) und KHB/DMSO-Behandlung (schwarz- und grau-gemusterte Säulen) im Risikogebiet (RG). Es wurden die Daten zum Zeitpunkt der 5' (5. min, 10' (10. min) der ersten Okklusionsphase (CO), der 5 (5. min) der ersten Reperfusionphase (RP) des Präkonditionierungsprotokolls (IP) sowie am Ende des IP (nach IP = nach ischämischer Präkonditionierung (zytosolische Fraktion) in die Berechnung einbezogen. Der prozentuale Anteil der dargestellten phosphorylierten Form der JNK-1/2 wurde im Vergleich zu den Werten des Nicht-Risikogebietes zum Zeitpunkt der 5. min Ischämie von KHB/DMSO-behandelten Tieren ermittelt.

10.4.3. Auswirkungen der Actinomycin-D-Applikation auf die JNK-1/2

Die SAPK/JNKs (JNK-1/2 = JNK55/46) zeigten in den mit KHB/DMSO-behandelten Tieren während der ersten Ischämiephase des Präkonditionierungsprotokolls noch keine Aktivitätssteigerung. Erst während der Reperfusion und vor allem nach Abschluss der Präkonditionierung war ein signifikanter ($p < 0,05$) Phosphorylierungsanstieg gegenüber dem nicht-präkonditionierten Myokard (NRG) zu beobachten. Auch hier bedingte die Behandlung mit Actinomycin-D im Risikogebiet (RG) eine Blockade des Phosphorylierungsanstieges der Kinasen (Abb. 79 A und B).

Es erfolgte ebenfalls eine Bestimmung der unphosphorylierten Form des Kinasenproteins. Es konnten keine Differenzen des zytosolischen Gesamtkinasenanteils der ERKs sowie der SAPK/JNKs festgestellt werden. Unabhängig von der Betrachtung der präkonditionierten Proben oder der nicht-präkonditionierten Proben der KHB/DMSO- und Actinomycin-D-behandelten Tiere (Abb. 80) unterschied sich die unphosphorylierte Form der Kinasen in den Proben nicht.

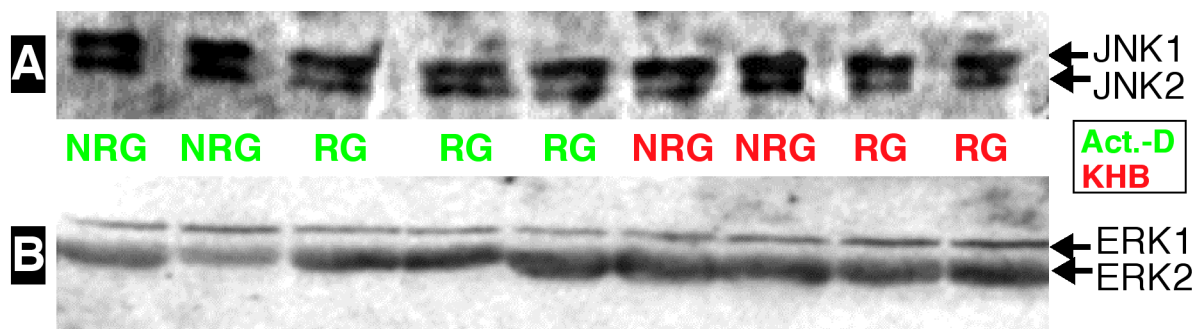


Abb. 80: Western Blot nach systemischer Actinomycin-D- (grün beschriftete Banden, Act.-D syst., aus dem Risikogebiet (RG) und Nicht-Risikogebiet (NRG)) und der systemischen KHB/DMSO-Infusion (rot beschriftete Banden, KHB syst.). (A) Auswirkung der Behandlung auf den Gesamtkinasenproteinanteil der JNKs in den Proben (Stress-aktivierte Proteinkinase p55 und p46, zytosolische Fraktion) am Ende des ischämischen Präkonditionierungsprotokolls 2. (B) Effekt auf den Gesamtkinasenproteinanteil der ERKs-1/2 (extrazellulär-Signal-regulierte Proteinkinase p44 und p42, zytosolische Fraktion). Es wurden Proben von drei verschiedenen Tieren aufgetragen.

10.4.4. Auswirkungen der Actinomycin-D-Applikation auf p38-MAPKs

Es wurde weiterhin der Phosphorylierungsgrad der p38-MAPKs untersucht. Diese Kinasen zeigten in den vorherigen Untersuchungen der Arbeit keine kardioprotektive Wirksamkeit. Es konnte sogar das Gegenteil gezeigt werden, indem der Einsatz ihres spezifischen Inhibitors SB203580 Infarktreaktion

erzielte. Die p38-MAPKs zeigten in den KHB/DMSO-behandelten Tieren maximale Phosphorylierung während der ersten Ischämiephase der Präkonditionierung und bereits Verlust der Phosphorylierung in den folgenden Reperfusionphasen und nach Beendigung des Präkonditionierungsprotokolls. Deutlich war während der IP die moderat inhibierende Wirkung des Actinomycins-D auf die Phosphorylierung der p38-MAPKs. Dies war eine weitere Bestätigung der Hypothese des "death pathways" der p38-MAPKs (Abb. 81 und 82).

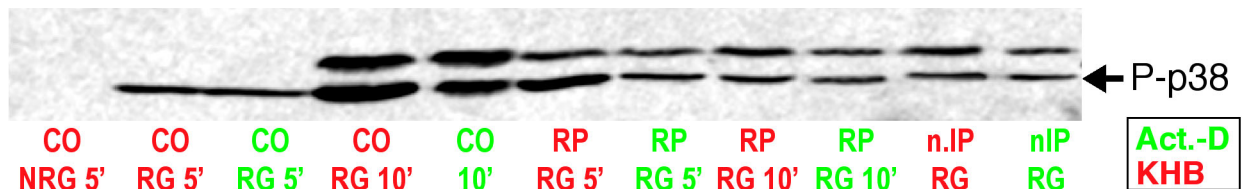


Abb. 81: Diese Western Blot Analyse zeigt die moderat inhibierende Wirkung der systemischen Actinomycin-D-Behandlung (grün; Act.-D syst., im Risikogebiet (RG) und Nicht-Risikogebiet (NRG)) und die Auswirkung der systemischen KHB/DMSO-Infusion (rot; KHB syst.) auf die Phosphorylierung der p38-MAPK (Stress-aktivierte Proteinkinase, zytosolische Fraktion). Untersucht wurde Biopsiematerial zum Zeitpunkt der 5' (5. min), 10' (10. min) der ersten Okklusionsphase (CO), zum Zeitpunkt der 5' (5. min) der ersten Reperfusionphase (RP) des Präkonditionierungsprotokolls (IP) sowie am Ende des IP (nach ischämischer Präkonditionierung) Die Western Blot Analyse zeigte eine zweite Bande im Bereich von ca. 40 kDa, die als weitere Isoform der p38-MAPKs identifiziert wurde.

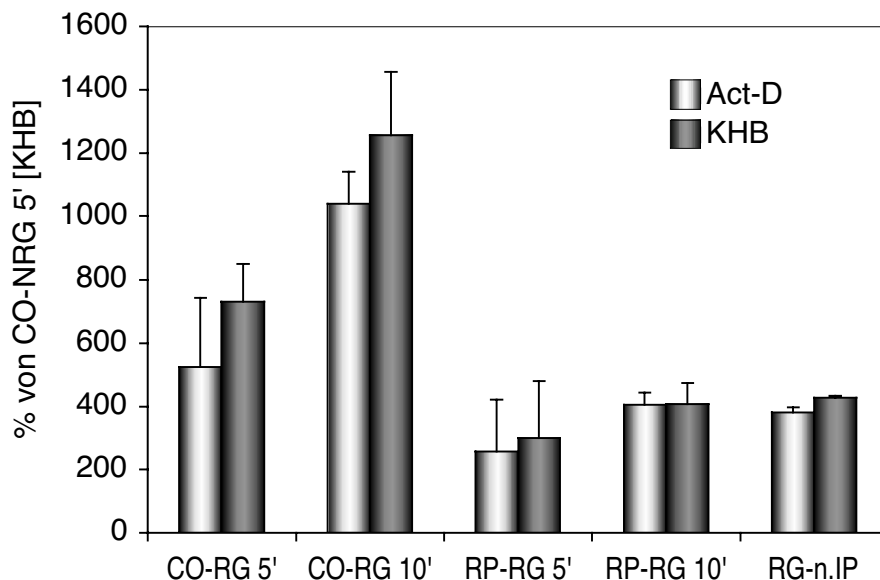


Abb. 82: Quantifizierung der Phosphorylierungsintensität der p38-MAPKs nach Actinomycin-D- (hell-graue Säulen) und KHB/DMSO-Behandlung (dunkelgraue Säulen) im Risikogebiet (RG). Es wurden die Daten zum Zeitpunkt der 5' (5. min), 10' (10. min) der ersten Okklusionsphase (CO), der '5 (5. min) der ersten Reperfusionphase (RP) des Präkonditionierungsprotokolls (IP) sowie am Ende des IP (n IP = nach ischämischer Präkonditionierung (zytosolische Fraktion) in die Berechnung einbezogen. Der prozentuale Anteil der dargestellten phosphorylierten Form der p38-MAPKs wurde im Vergleich zu den Werten des Nicht-Risikogebietes zum Zeitpunkt der 5. min Ischämie von KHB/DMSO-behandelten Tieren ermittelt.

Der Nachweis der unphosphorylierten Form der p38-MAPKs zeigte im Western Blot Verfahren keine Unterschiede, obgleich es sich um Actinomycin-D- oder KHB/DMSO-behandeltes Myokardgewebe des Risiko- oder Nicht-Risikogebietes handelte (siehe Abb. 83).

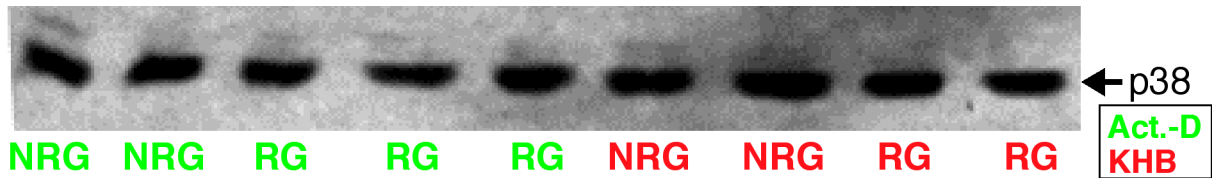


Abb. 83: Western Blot nach systemischer Actinomycin-D (grün; Act.-D syst.) oder systemischer KHB/DMSO-Infusion (rot; KHB syst.). Es wurden die Auswirkungen der Act.-D-Behandlung auf den Gesamtkinasenproteinanteil der p38-MAPKs (Stress-aktivierte Proteinkinase p38, zytosolische Fraktion) in den Proben des Risikogebietes (RG) und Nicht-Risikogebietes (NRG) am Ende des ischämischen Präkonditionierungsprotokolls) aufgezeigt.

10.5. Effekt des Transkriptionsinhibitors Actinomycin-D auf den m-RNA-Gehalt der MAPKs-spezifischen Substrate c-Jun, ATF-2, Elk-1, c-myc und c-fos

Für die Untersuchungen des Northern-Blot-Verfahrens mittels der Sonden der Transkriptionsfaktoren c-Jun, ATF-2, Elk-1, c-fos und c-myc wurde Gesamt-RNA aus präkonditioniertem Herzgewebe (Gewebe des Risikogebiets; RG) sowie unpräkonditioniertes Myokardgewebe (Nicht-Risikogebiet; NRG) nach KHB/DMSO- oder Actinomycin-D Behandlung isoliert. Die zugehörigen Northern-Hybridisierungen ergaben verminderte Signale in Actinomycin-D-behandelten präkonditionierten Herzgewebe gegenüber dem KHB/DMSO-behandelten präkonditionierten Gewebe. Im nicht-präkonditionierten Myokardgewebe sah man in beiden Behandlungsgruppen für die c-Jun-, c-fos- und c-myc-Sonden nur ein schwaches Signal (Abb. 85). Die Hybridisierung der Sonden Elk-1 und ATF-2 war negativ, es konnten keine Signale detektiert werden.

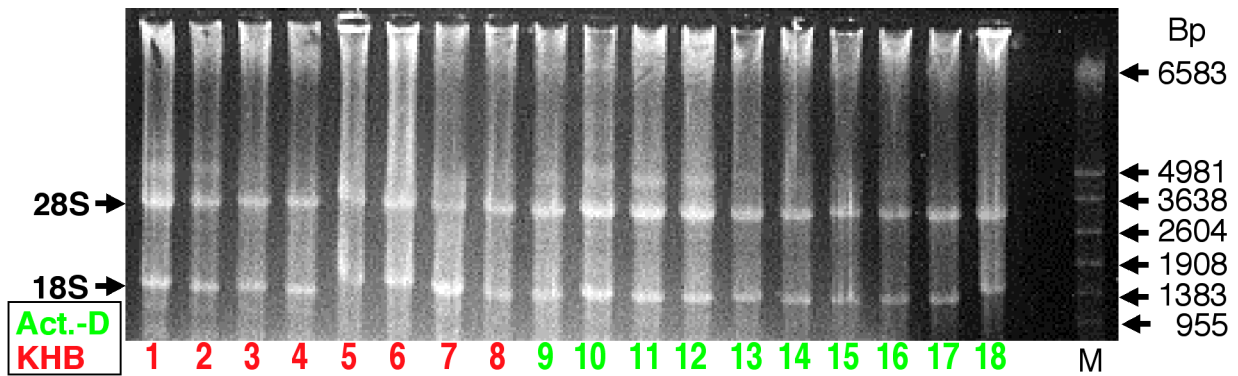


Abb. 84: RNA-Agarosegel. Das Gel zeigt die gleichmässige Verteilung der RNA-Menge und die Intaktheit der RNA mit den charakteristischen Banden im Bereich 28 S und 18 S (Proben nach ischämischer Präkonditionierung 2 mit KHB/DMSO- oder Actinomycin-D-Behandlung).

1 und 2: Nicht-Risikogebiet linker Ventrikel (NRG li) nach Krebs-Henselleit / DMSO

3 und 4: Nicht-Risikogebiet rechter Ventrikel (NRG re) nach Krebs-Henselleit / DMSO

5, 6, 7, 8 und 9: Risikogebiet (RG) nach Krebs-Henselleit / DMSO

10 und 11: Nicht-Risikogebiet links (NRG li) nach Actinomycin-D

12 und 13: Nicht-Risikogebiet rechts (NRG re) nach Actinomycin-D

14, 15, 16, 17 und 18: Risikogebiet (RG) nach Actinomycin-D

M: Marker

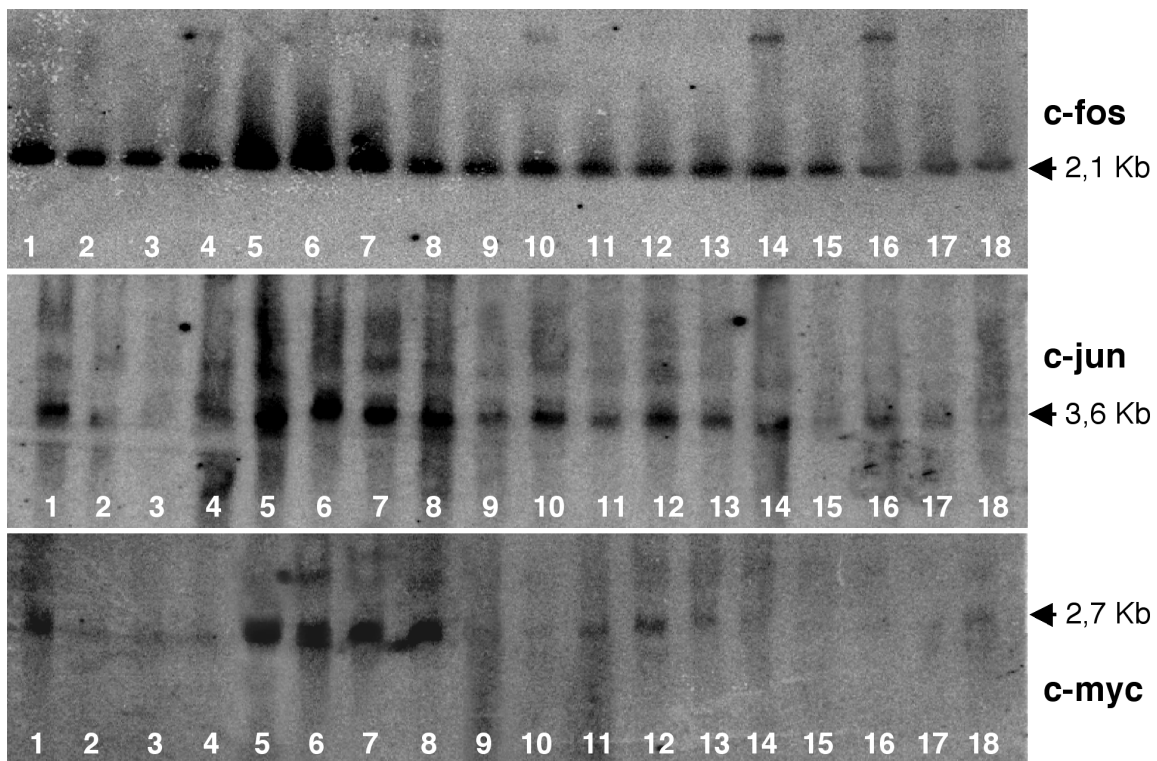


Abb. 85: Northern-Blots des Gels der Abb. 73. Es wurde nach einander mit den c-DNAs Sonden c-fos, c-jun und c-myc hybridisiert. (Bei den fehlenden Hybridisierungssignalen der ATF-2 und Elk-1 Sonden wurde jeweils wieder dehybridisiert).

10.6. Auswirkungen der Actinomycin-D- und UO126-Behandlung auf Phosphoproteine in den durch Säulenionenaustauschchromatografie aufgereinigten Herzgewebeproben

Um einen Zusammenhang zwischen den dargelegten Western Blot Daten der Studie und der Existenz noch unbekannter Phosphoproteine darzulegen, wurden weiterführende Experimente mittels Säulenionenaustauschchromatografie durchgeführt. Durch die Aufreinigung der Herzgewebeproben an Phosphoproteinen, sollte eine mögliche Abhängigkeit zwischen der MAPKs-Aktivierung bzw. -Deaktivierung und der Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung weiterer zytosolischer und nukleärer Proteine dargestellt werden. Dies wurde im Speziellen durch Phosphorylierungsuntersuchungen der Proteine an den Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin vorgenommen. Hierbei handelt es sich um Aminosäuren, die unter anderem die Sequenzabschnitte der Phosphorylierungsstellen der MAPKs bilden. Des Weiteren wurden Proteinbanden betrachtet, die aufgrund der Molekülgröße nicht den hier dargestellten MAPKs zugeordnet werden konnten, jedoch ebenfalls durch den Ischämieereiz Phosphorylierungsunterschiede aufzeigten. Es wurden in diesem Versuchsabschnitt Myokardproben nach KHB/DMSO-, UO126- und Actinomycin-D-Behandlung der präkonditionierten und nicht-präkonditionierten Tiere (Abb. 86 und 87) verwendet.

10.6.1. Darstellung der zytosolischen, Sephadex-gebundenen Myokardproteinfraktion nach Actinomycin-D- und UO126-Behandlung

Die silbergefärbten Gele der zytosolischen, Sephadex-gebundenen Zellfraktion zeigten nach Auftrennung der Phosphoproteine eine Vielzahl an unterschiedlichen Bandenstärken. In dem UO126- und Actinomycin-D-behandelten, präkonditionierten Myokardgewebe konnte im Vergleich zum unbehandelten- und KHB/DMSO-behandelten präkonditionierten Myokard ein deutlich geringerer Gehalt der Phosphoproteine in den Molekulargewichtsbereichen von 50-60 kDa, 40-50 kDa und 25-30 kDa festgestellt werden (Abb. 86; rot umrandete Banden).

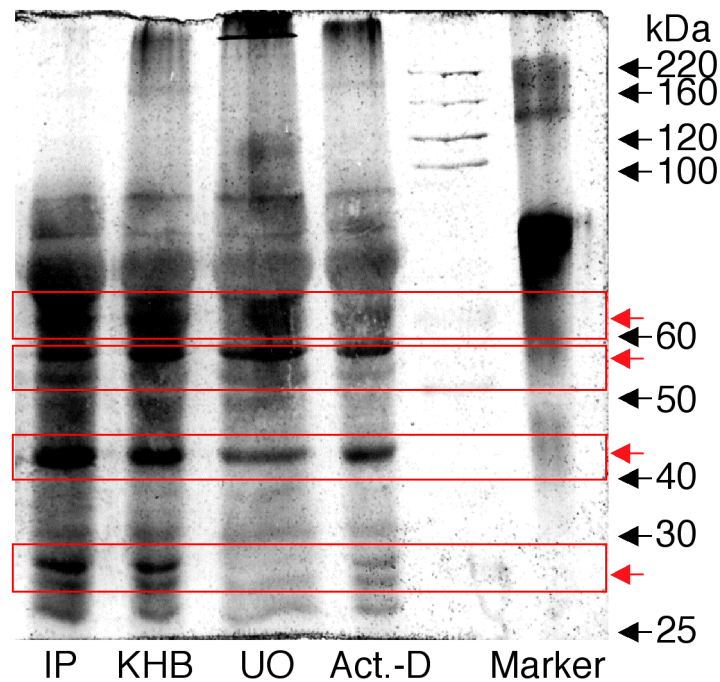


Abb. 86: Silbergefärbtes Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der zytosolischen, CHS-gebundenen Probenfraktion (Chelating Sepharose) nach Abschluss des ischämischen Präkonditionierungsprotokolls 2. RG = Myokardgewebe aus dem Risikogebiet ohne Substanzapplikation; KHB = Myokardgewebe aus dem KHB/DMSO-behandelten Risikogebiet; UO = UO126 systemisch- (0,22 mg/kgKGW) behandeltes Risikogebiet; Act.-D = systemisch Actinomycin-D- (0,012 mg/kg KGW) behandeltes Risikogebiet. Rot gekennzeichnete Proteinbanden in den Molekulargewichtsbereichen von 50-60 kDa, 40-50 kDa und 25-30 kDa.

10.6.2. Darstellung der nukleären und partikulären Sephadex-gebundenen Myokardproteinfraktion nach Actinomycin-D- und UO126-Behandlung

Auch in den partikulären und nukleären Fraktionen zeigten sich, nach Auftrennung der Phosphoproteine, Unterschiede in der Schwärzung der Banden. Die hervorgehobenen rot umrandeten Banden (Abb. 87) zeigen in den gekennzeichneten Molekulargewichtsbereichen (50-60 kDa, 40-50 kDa und 30-40 kDa) eine deutliche Reduktion der Phosphoproteine in den UO126- und Actinomycin-D-behandelten Myokardgewebe gegenüber unbehandeltem (IP)- oder KHB/DMSO-behandeltem präkonditioniertem Gewebe. Die genannten Molekulargewichtsbereiche stimmen mit den Gewichten der MAPKs (JNKs, ERKs, p38-MAPKs) überein und bestätigen somit die Daten der Western Blot Untersuchungen und Aktivitätsbestimmungen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Translokation der zytosolischen Kinasen in den Kern (nukleäre Fraktion) stattgefunden haben muss. Jedoch waren auch eine weitere Anzahl von Proteinen vorhanden, die ebenfalls Unterschiede aufzeigten. Eine weitere Differenzierung erfolgte daraufhin in den Untersuchungen der Fraktionen mittels Immunopräzipitation durch Antikörper anti-Phospho-Serin, anti-Phospho-Tyrosin und anti-Phospho-Threonin.

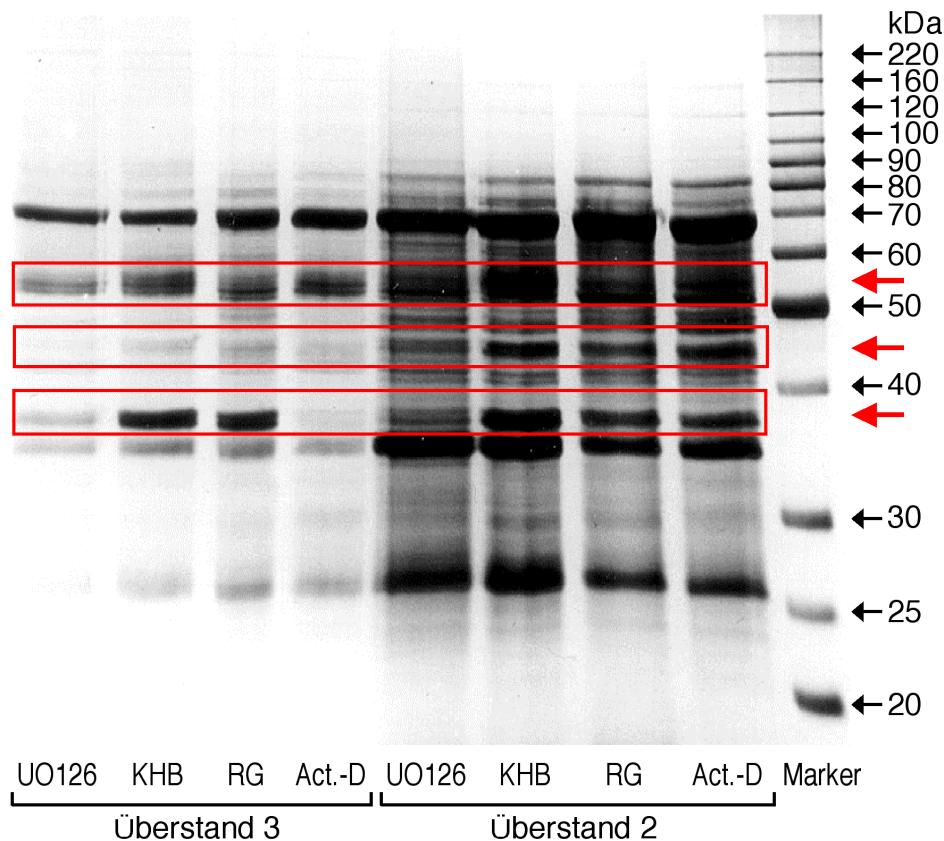


Abb. 87: Silbergefärbtes Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der partikulären (Überstand 2) und nukleären (Überstand 3) CHS-gebundenen (Chelating Sepharose) Probenfraktionen. Die Proben wurden nach Abschluss des ischämischen Präkonditionierungsprotokolls 2 entnommen. RG = Myokardgewebe aus dem Risikogebiet ohne Substanzapplikation; KHB = Myokardgewebe aus dem KHB/DMSO-behandelten Risikogebiet; UO = UO126 systemisch (0,22 mg/kgKGW) behandeltes Risikogebiet; Act.-D = systemisch Actinomycin-D- (0,012 mg/kg KGW) behandeltes Risikogebiet.

10.6.3. Darstellung der zytosolischen, Sephadex-gebundenen Myokardproteinfraktion nach Actinomycin-D- und UO126-Behandlung und Immunopräzipitation

Immunopräzipitationen der Original- und Säulenpräparierten Proben folgten mit den Antikörpern anti-Phospho-Serin (P-Ser), anti-Phospho-Threonin (P-Thr) und anti-Phospho-Tyrosin (P-Tyr) (Abb. 88, 89 und 90). Die immunopräzipitierten Proben wurden danach gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend folgte entweder eine Silberfärbung der Gele oder eine weitere Immunopräzipitation mit den kombinierten Antikörper, anti-P-Tyrosin/P-Threonin, anti-P-(Ser/Thr)Phe und anti-P-Threonin-Proline (Abb. 91). Diese Antikörper richteten sich gegen die spezifisch-dualen, Prolin-abhängigen (directed) Phosphorylierungsstellen der MAPKs.

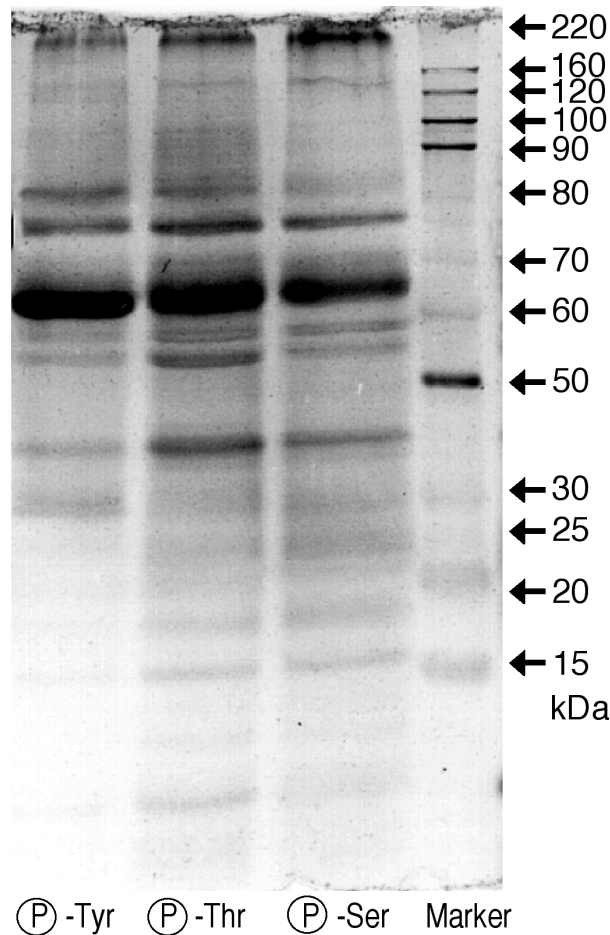


Abb. 88: Silbergefärbtes Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der zytosolischen Fraktion, Originalprobenfraktion nach Abschluss des ischämischen Präkonditionierungsprotokolls 2 und anschließender Immunopräzipitation mit den Phospho-Tyrosin (P-Tyr), Phospho-Threonin (P-Thr) und Phospho-Serin (P-Ser) Antikörpern. RG = Myokardgewebe aus dem Risikogebiet.

10.6.4. Darstellung der zytosolischen, Sephadex-gebundenen Myokardproteinfraction nach Actinomycin-D- und UO126-Behandlung und Immunopräzipitation mit einem Phospho-Threonin Antikörper

Anhand der aufgetrennten zytosolischen Phospho-Threonin-immunopräzipitierten Probenfraktion zeigten sich neben den bereits hervorgehobenen bekannten Banden im Bereich zwischen 50-60 kDa und ~38 kDa auch eine Bande im Bereich zwischen 15-20 kDa und eine Bande im Bereich unter 15 kDa, die unterschiedliche Schwärzungen im Verlauf der Präkonditionierung und durch die Substanz-Behandlungen aufwiesen (Abb. 89). Die Bande unter 15 kDa zeigt eine deutlich starke Färbung in der Myokardprobe des Risikogebiets des linken Ventrikels und eine Verminderung der Bandenstärke nach Actinomycin-D- und UO126-Behandlung. Dies beweist erneut die Aktivitätssteigerung durch den Prozess der ischämischen Präkonditionierung sowie die inhibitorische Wirksamkeit von Actinomycin-D und UO126 auch auf andere zytosolische Proteine, die nicht zu den drei bekannten MAPKs gehören.

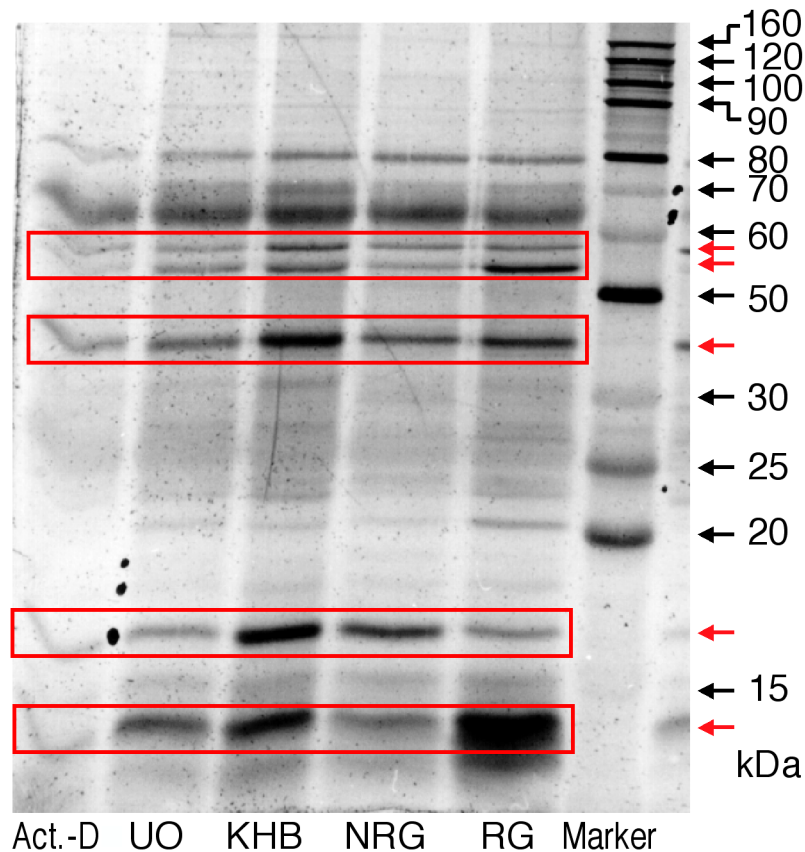


Abb. 89: Silbergefärbtes Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der zytosolischen, CHS-gebundenen Proteinfraktion (Chelating Sepharose Säule gebunden), nach Abschluss des ischämischen Präkonditionierungsprotokolls 2 und anschließender Immunopräzipitation mit dem Phospho-Threonin-(P-Thr) Antikörper. RG = Myokardgewebe aus dem Risikogebiet; NRG = Nicht-Risikogebiet; KHB = Myokardgewebe aus dem KHB/DMSO-behandelten Risikogebiet; UO = UO126-systemisch (0,22 mg/kgKGW) behandeltes Risikogebiet; Act.-D = systemisch Actinomycin-D- (0,012 mg/kg KGW) behandeltes Risikogebiet.

10.6.5. Darstellung der zytosolischen, Sephadex-gebundenen Myokardproteinfraktion nach Actinomycin-D- und UO126-Behandlung und anschließender Immunopräzipitation mit einem Phospho-Tyrosin Antikörper

Die rot umrandeten Banden verdeutlichen die Unterschiede der Proteinmenge der Phosphoproteine in den Molekulargewichtsbereichen von 50-60 kDa, 25-30 kDa und 15 kDa, sowohl in den UO126- als auch Actinomycin-D-behandelten Tieren. Eine gut differenzierbare Doppelbande im Bereich von 44/42 kDa konnte jedoch nicht dargestellt werden (Abb. 90). Die Intention, mittels Phospho-Tyrosin-Immunopräzipitation eine Einschränkung der Proteine auf Proteine mit der Phosphorylierungsstelle Tyrosin zu erreichen, zeigte jedoch nicht die spezifische Inhibition von Actinomycin-D der zuvor betrachteten Banden der MAPKs.

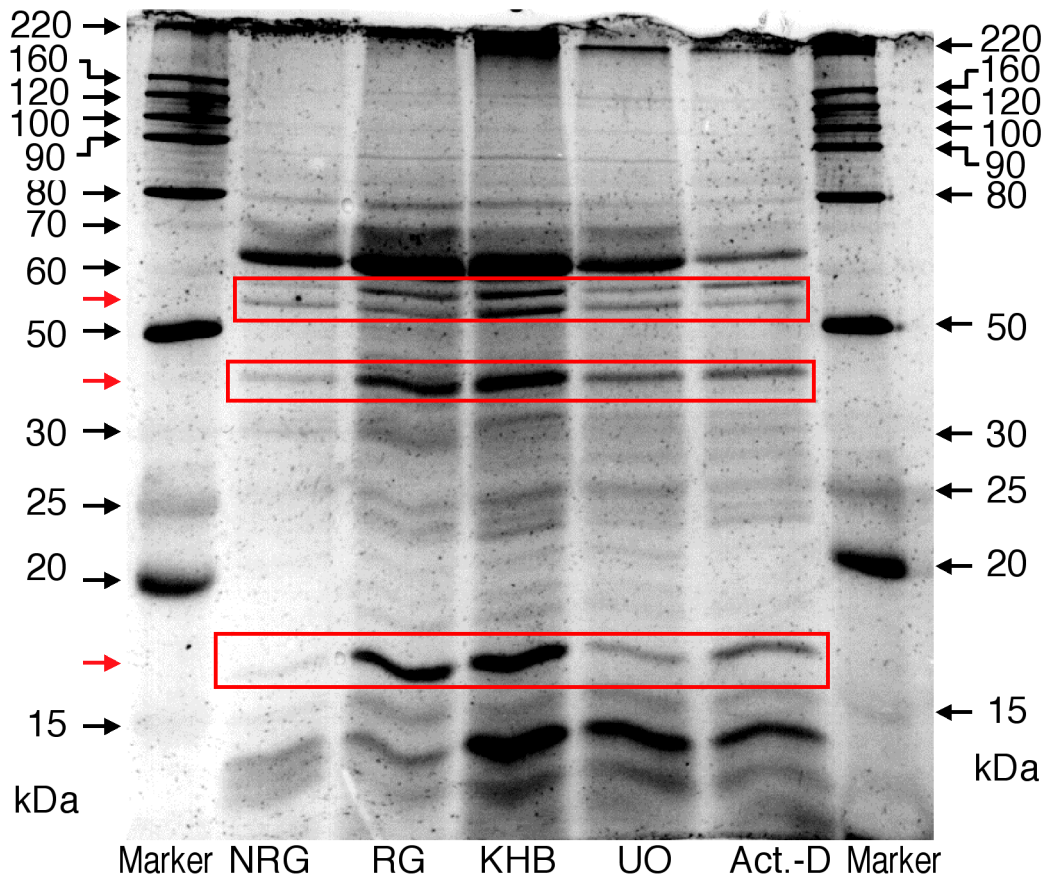


Abb. 90: Silbergefärbtes Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der zytosolischen, CHS-gebundenen Proteinfraktion (Chelating Sepharose Säule gebunden), nach Abschluss des ischämischen Präkonditionierungsprotokolls 2 und anschließender Immunopräzipitation mit dem Phospho-Tyrosin-(P-Tyr) Antikörper. RG = Myokardgewebe aus dem Risikogebiet; NRG = Nicht-Risikogebiet; KHB = Myokardgewebe aus dem KHB/DMSO behandelten Risikogebiet; UO = UO126 systemisch (0,22 mg/kgKGW) behandeltes Risikogebiet; Act.-D = systemisch Actinomycin-D- (0,012 mg/kg KGW) behandeltes Risikogebiet.

10.6.6. Darstellung der zytosolischen, Sephadex-gebundenen Myokardproteinfraktion nach Actinomycin-D- und UO126-Behandlung und anschließender Immunopräzipitation mit Phospho-Threonin/Prolin und Phospho-Serin

Es zeigte sich in allen drei Zellfraktionen in den Bereichen des Molekulargewichtes von 44/42 kDa, 55/46 kDa und 38 kDa, d.h. übereinstimmend mit den untersuchten ERKs, SAPK/JNKs und p38-MAPKs, die bereits zuvor mittels Western Blot Analyse dargestellten Intensitätsunterschiede der phosphorylierten Kinasen (Abb. 91). Das heißt, die durch einen IP-Zyklus gesteigerte Phosphorylierung der 44/42 kDa- und 55/46 kDa-Kinasen und die folgende Minderung durch Actinomycin-D-Behandlung konnte bestätigt werden. Ebenso konnten wir die Inhibition der 44/42 kDa-Kinasen-Phosphorylierung durch UO126 auch durch dieses

Nachweisverfahren demonstrieren. Außerdem detektierten wir in der zytosolischen Fraktion eine Bande zwischen 15-20 kDa, welche eine Steigerung der Threonin- und Tyrosinphosphorylierung durch Ischämie gegenüber nicht-Ischämie zeigte und wiederum konnte diese Phosphorylierungssteigerung durch UO126 und Actinomycin-D gehemmt werden.

Ziel nachfolgender Studien wird es nun sein die weitere Differenzierung der Myokardproteine durch die 3D-Gelelektrophorese und die Massenanalyse der einzelnen Proteinspots durch das Verfahren der Massenspektroskopie zu erreichen. Erst dann kann durch die Sequenzbestimmung gezeigt werden, ob es sich neben den MAPKs um bereits bekannte oder neuartige Proteine handelt, die in den Prozess der Präkonditionierung durch Aktivitätsveränderungen involviert sind.

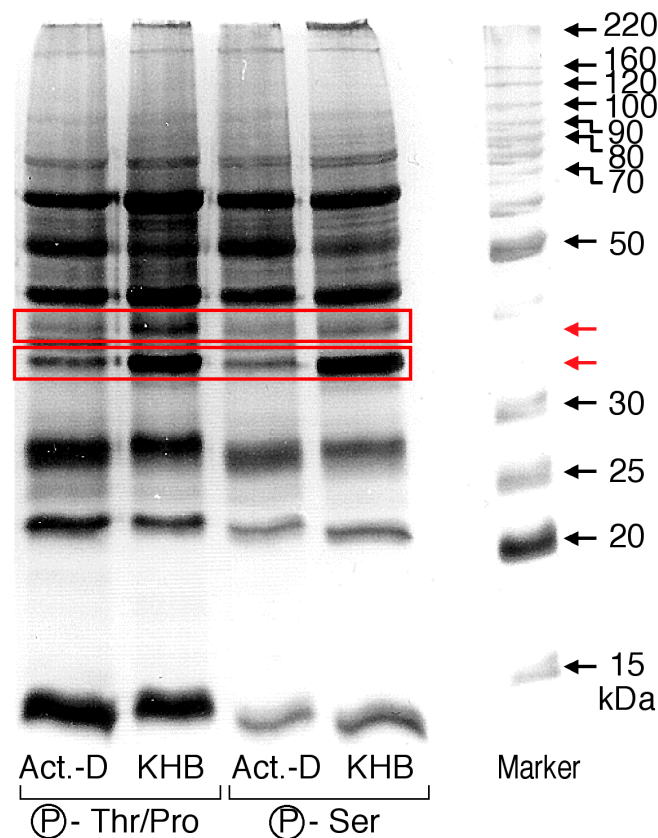


Abb. 91: Silbergefärbtes Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der zytosolischen, CHS-gebundenen Proteinfraction (Chelating Sepharose Säule gebunden). Es wurden Proben nach Abschluss des ischämischen Präkonditionierungsprotokolls 2 und anschließender Immunopräzipitation verwendet und mit dem Phospho-Threonin-Prolin-(P-Thr/Pro) Antikörper oder Phospho-Serin-(P-Ser) Antikörper immunopräzipitiert. KHB = Myokardgewebe aus dem KHB/DMSO-behandelten Risikogebiet; Act.-D = systemisch Actinomycin-D- (0,01 mg/kg KGW) behandeltes Risikogebiet. Die rot umrandeten Banden zeigen die deutliche Reduktion dieser Phosphoproteine, sowohl bei Verwendung des P-Thr/Pro- als auch des P-Ser-Antikörpers (Molekulargewichtsbereich: 30-40 kDa) in den Actinomycin-D-behandelten Tieren gegenüber der KHB/DMSO-behandelten Tieren.

11. Auswirkungen der Präkonditionierung auf die Phosphorylierungsintensität des MAPKs-vorgeschalteten Schaltstellenproteins Ras und Raf-Kinase

11.1. Darstellung der aktivierten Form von H-Ras im präkonditionierten Myokardgewebe

Die Ras-Proteine zählen zu den wichtigsten "upstream" Schaltstellen in der Signalvermittlung der MAPKs-Kaskaden. Sie empfangen in Form einer GTPase Signale der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren oder über die Interaktion mit Adaptorproteinen auch diese von Tyrosinkinase-Rezeptoren. Es ist somit im proximalen Bereich der Kaskadensignaltransduktion angesiedelt, d.h. es kann auch kaskadenübergreifend, unspezifisch in alle drei Wege der MAPKs-Signalweiterleitung involviert sein. Die Bestimmung der aktivierten H-Ras-GTP-gebundenen Form unter Verwendung des polyklonalen H-Ras (259) Antikörpers, zeigt speziell den Schritt der Signalvermittlung an die nachfolgende Raf-Kinase auf. Es konnte im präkonditionierten Herzgewebe der KHB/DMSO-behandelten Tiere eine signifikante ($p < 0,02$) Zunahme des aktivierten H-Ras gegenüber dem nicht-präkonditionierten Herzgewebe dargestellt werden (Abb. 92 und 93).

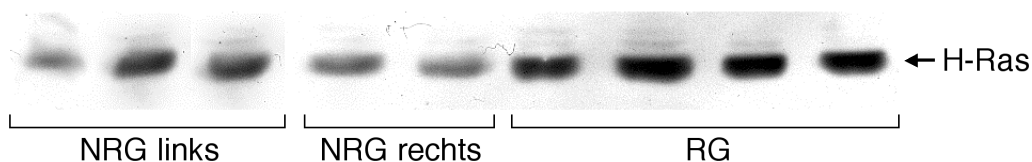


Abb. 92: Repräsentativer Western Blot. Die gesteigerte aktivierte Form des H-Ras im Risiko-Gebiet (RG) nach Beendigung des ischämischen Präkonditionierungsprotokolls 2 gegenüber dem nicht-präkonditionierten Myokardgewebe des linken (NRG li) und rechten Ventrikels (NRG re) wird aufgezeigt; (Biopsien eines Versuchsgruppen V-Tieres).

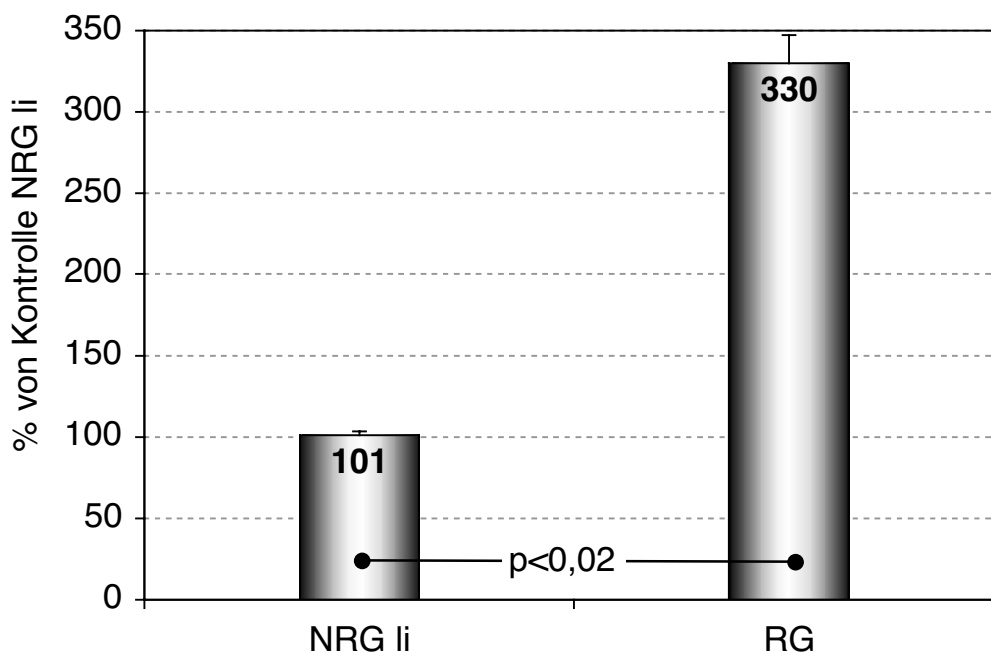


Abb. 93: Grafische Darstellung der aktivierten Form des H-Ras-Proteins. Das Säulendiagramm zeigt den signifikanten Anstieg ($p < 0,02$) dieser Proteinform im präkonditionierten Myokardgewebe (Risikogebiet, RG) gegenüber dem nicht-präkonditionierten Myokard (Nicht-Risikogebiet, NRG).

11.2. Darstellung der aktivierten Form der c-Raf-1-Kinase im präkonditionierten Myokardgewebe

Die Untersuchung der Ras nachgeschalteten c-Raf-1 Serin/Threonin-Kinase erfolgte mit Hilfe des polyklonalen Raf-1-(C-20) Antikörpers, gerichtet gegen das C-terminal lokalisierte Epitop p-74 der Raf-1-Kinase. Dieses Epitop des Kinasenproteins vermittelt die Anlagerung des Ras-GTP-Proteins und somit die Weiterleitung des Signals an die MEK-1/2.

Auch hier konnten wir ein signifikant ($p < 0,02$) erhöhtes Signal der Raf-1-Kinase im präkonditionierten Herzgewebe gegenüber dem nicht-präkonditionierten Herzgewebe der KHB/DMSO-behandelten Tiere feststellen (Abb. 94 und 95).

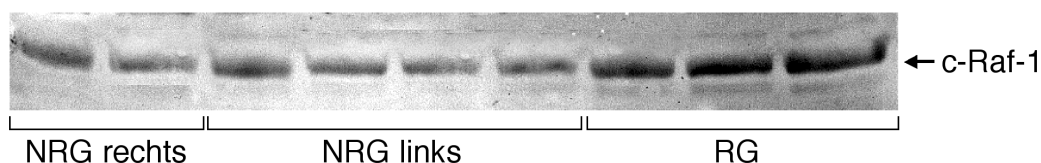


Abb. 94: Dieser Western Blot zeigt ein gesteigertes c-Raf-1-Signal im Risikogebiet (RG) nach ischämischer Präkonditionierung im Vergleich zu nicht-präkonditioniertem Gewebe des linken und rechten Ventrikels (NRG li u. NRG re).

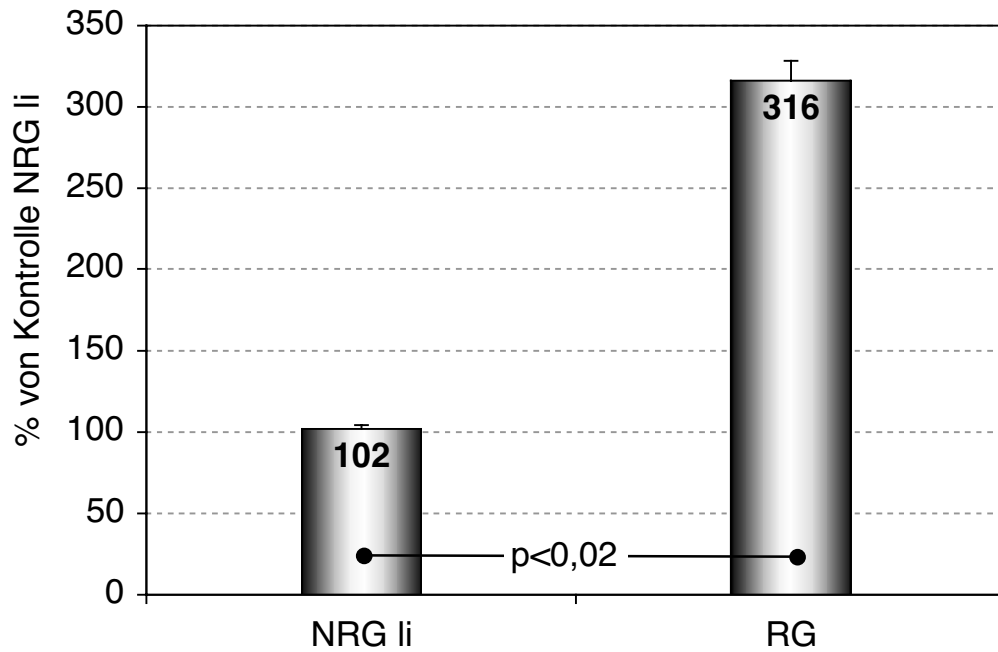


Abb. 95: Das Säulendiagramm zeigt die Quantifizierung der c-Raf-1-Intensität. Ein signifikanter Anstieg der Ras-aktivierten c-Raf-1-Kinasenform konnte im präkonditionierten (RG; Risikogebiet) gegenüber dem nicht-präkonditionierten Myokardgewebe (NRG li; Nicht-Risikogebiet des linken Ventrikels) festgestellt werden.

V. DISKUSSION

In der vorliegenden Studie wurde mit Hilfe von spezifischen MAPKs-Inhibitoren die Hypothese untersucht, ob der Aktivitätsanstieg bestimmter MAPKs die Voraussetzung für das Stattfinden der protektiven ischämischen Konditionierung ist.

Die Ergebnisse belegen erstmals, dass es *in vivo* möglich ist, die MAPKs-Signalkaskade an definierten Phosphorylierungsschritten zu inhibieren und dass dies folgend zu einer Störung des kardioprotektiven Prozesses einer ischämischen Konditionierung führt.

Des weiteren wird im Wesentlichen die in der Literatur bereits geäußerte Meinung unterstützt, dass die Signaltransduktionsschritte der MAPKs die aufeinanderfolgenden Ereignisse der Signalwege von Ischämie- und Reperfusionstress am Herzen mitbeeinflussen.

In der Literatur finden sich diverse Studien von MAPKs-Untersuchung, jedoch wurden diese Experimente fast ausschließlich an neonatalen Kardiomyozyten in Kultur oder diversen anderen Zelllinien durchgeführt. Die vorliegende Studie präsentiert somit erstmalig an einem standardisierten *in vivo*-Tiermodell des *in-situ* schlagenden Herzens die Auswirkungen von MAPKs-Inhibitoren aller drei Hauptsignalwege.

1. Kritische Aspekte der verwendeten Färbe- und Infusionstechniken

Zu nennen ist hier die Problematik der lokalen/intramyokardialen Mikroinfusion in Bezug auf die relative Infarktgrößenbestimmung, die im Verhältnis zum Risikogebiet erfolgte. Es bestand hierbei die Möglichkeit eines falsch negativen Ergebnisses, da im Gegensatz zur systemischen Applikation nicht davon ausgegangen werden konnte, dass die Diffusion der Substanzen das gesamte Risikogebiet mit gleichwertigen Konzentrationen des Pharmakons absättigte. Man müsste ein eigenes "Diffusions-Risikogebiet" jeder Mikroinfusionsnadel bestimmen können, doch die ligandengekoppelte Infusion der untersuchten Substanzen an einen Farbstoff war nicht möglich⁹²⁹. Die Infarktgrößen bei der Berechnung der Dosis-Wirkungsbeziehung wurden daher in dem Flächenmass [cm²] angegeben und die intramyokardialen Substanzapplikation, trotz Infarktgrößen-Bestimmung, durch den ja/nein Effekt, d.h. das Vorhandensein eines nekrotischen oder nicht-nekrotischen Myokardgebietes bewertet.

2. Die Wirkung von PD98059 und UO126

In in diesem Abschnitt der Studie wurde gezeigt, dass eine spezifische Hemmung der ERKs-Kaskade durch die lokale intramyokardiale Infusion von PD98059 und UO126 sowie die systemische Applikation von UO126 vor und während des IP-Protokolls dem IP-vermittelten Herzschutz entgegenwirkte. Es konnte ebenfalls demonstriert werden, dass die verwendeten experimentellen Substanzen, die Phosphorylierungskaskade der ERKs (p44/42 MAPKs) in einer konzentrations-abhängigen Weise hemmten, ohne eine Beeinflussung der p38-MAPKs- oder SAPK/JNKs-Kaskaden hervorzurufen. Die Resultate unterstützten die zugrunde liegende Arbeitshypothese des ERKs- und JNKs-abhängigen Signalweges ischämischer myokardialer Protektion.

In anfänglichen Aktivitätsscreenings konnte festgestellt werden, dass myokardiale Ischämie die p38-MAPKs und die ERKs aktivierte⁶³, während Reperfusion die Aktivität der SAPK/JNKs stimulierte und lediglich eine folgende moderate Steigerung der ERKs-Aktivität bedingte. Weiterhin verursachte Reperfusion bereits Deaktivierung der p38-MAPKs. Das Aktivitätsmaximum der ERKs war im dargestellten experimentellen Modell zum Zeitpunkt der 10-15 min der Ischämie zu beobachten, danach nahm die Aktivitätskurve wieder gleichförmig bis zum Ausgangswert ab. In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe konnte des weiteren gezeigt werden, dass eine Aktivitätssteigerung der Protoonkogene c-jun und c-fos durch kurzzeitige Verschlüsse der linken absteigenden Koronararterie hervorgerufen werden konnte^{57,930}.

Angaben über die exogene Stimulierung der Tyrosinkinase-Rezeptoren (TKR) mittels der Liganden IGF-2, aFGF und bFGF^{64,398} und einem daraus resultierenden kardioprotektiven Effekt machte es offensichtlich, dass die aktivierten Proteinkinasen, im Besonderen die ERKs, Anteil an der TKR-vermittelten Kardioprotektion haben.

Untersuchungen von *Favata et al.*⁹³¹ zeigten eine weitestgehende Übereinstimmung der Wirkungsmechanismen der Substanzen PD98059 und UO126, sodass eine bestimmte Anzahl der Versuche der PD98059 Studie nicht nochmals mit UO126 wiederholt wurden.

PD98059 [2-(2-Amino-3-methoxyphenyl)-4H-1-Benzo-Pyran-4-one] stellt einen nichtkompetitiven, spezifischen Inhibitor von MEK-1/2 (MAPKK-1/2) dar. *UO126* (1,4-Diamino-2,3-Dicyano-1,4-bis [2-Aminophenyl-Thio] Butadiene) übt ebenfalls nichtkompetitive Inhibitor auf MEK-1/2 aus, zusätzlich jedoch auch direkt auf die ERK-1/2. UO126 und PD98059 zeigen keine Beeinflussung der Aktivitätszustände

der PKC, Abl- Kinasen, Raf- Kinasen, MEKK, SAPK/JNKs, p38-MAPKs, MKK-3 und MKK-6. Die Inhibition nachfolgender zytosolischer und nukleärer Faktoren, wie dem p⁶²TCF (Elk-1)-Faktor, dem c-Myc-Faktor, dem ATF-2-Faktor sowie den Komponenten des AP-1-Komplexes, c-Jun und c-Fos^{932,933} konnte bei beiden Substanzen festgestellt werden⁵⁷⁷⁻⁵⁸⁰.

Ursprünglich wurden PD98059 und UO126 aufgrund ihrer Interaktion mit den "glucocorticoid response elements" (GREs) des AP-1-Genpromotors entdeckt^{931,934}. Es folgte nach Aussetzung der Zellen mit den Substanzen eine Minderung der AP-1-abhängigen Gentranskription der Immunantwort. Diese Fähigkeit teilten die beiden Substanzen mit einer Vielzahl von Glukokortikoid-Hormonen, die breitgefächert aufgrund ihrer antiinflammatorischen Wirkungsweise, Zytokin-, Adhäsionsmolekül- und Metalloproteinaseinhibition zum klinischen Einsatz kommen. Man hatte jedoch in der PD98059- und UO126-Herstellung das Ziel, direkt intrazellulär antagonistisch anzugreifen, die Glukokortikoid-Rezeptoren zu umgehen, um somit eine spezifische und funktionale Inhibition der Gentranskription zu erreichen. UO126 und PD98059 verhindern zwar nicht die Bindung von AP-1 an die DNA, sie unterdrücken vielmehr die Bildung der c-Jun und c-Fos-mRNA-Bildung. UO126 ist hierbei ein stärkerer Inhibitor der MEK-1 und MEK-2 (100-fach höhere Affinität zu MEKs als PD98059), was sowohl in enzymatischen *in-vitro*-Untersuchungen sowie an isolierten Zellen beobachtet werden konnte⁹³⁵. Die Inhibition der MEKs-Proteine durch UO126 erfolgt durch Bindung am bereits aktivierten Enzym, wogegen PD98059 die Aktivierung von MEK-1/2 in der Weise blockiert, dass die Phosphorylierung der MEKs-Enzyme durch die Raf-Kinase verhindert wird. Folglich agiert UO126 einen Phosphorylierungsschritt weiter distal, d.h. weiter nukleär der Kaskade gerichtet als PD98059 und blockiert die Phosphorylierung von ERK-1/2 direkt, PD98059 dagegen indirekt⁹³¹. Die genaue Bindungsstelle von UO126 und PD98059 an den MEK-1/2-Proteinmolekülen ist noch nicht eindeutig geklärt, es kann jedoch mit Bestimmtheit gesagt werden, dass sie nicht mit der der Substratmoleküle ATP und ERK übereinstimmt. Des weiteren ist bekannt, dass beide Substanzen die gleiche Bindungsstelle benutzen, die lediglich strukturelle Konformationsveränderungen durch den Vorgang der Enzymaktivierung bzw. -deaktivierung erfährt.

Die durch PD98059 und UO126 erzielte MEKs-Inhibition beeinflusst unterschiedlichste Signalwege der Zelle. Bedingt durch den Empfang verschiedenster Signale durch eine Vielzahl von Zellenoberflächenrezeptoren können je nach Zelltyp und Entwicklungsstadium der Zelle oftmals entgegengesetzte Wirkungen durch die Substanzverabreichung erzielt werden^{292,609,936}. Einige Beispiele der MEK-1/2-Inhibition durch PD98059 und UO126 sind (1) die Blockade von Wachstums-

Faktoren-vermittelten Proliferationsprozessen, (2) von chemotaktischen Migrationsvorgängen, (3) von mitogenen Angriffen der Zelle sowie (4) die Produktionsinhibition proinflammatorischer Zytokine, wie IL-2, IL-1 β , TNF- α , GM-CSF, Interferon- γ und IL-6^{642,935,937}. Die Aktivierung der Glycogensynthetase oder Lipogenese von Insulin-behandelten Zellen ist⁹³⁸, obwohl Insulin einen der Hauptstimuli der ERKs-Kaskade darstellt, ein weiteres Wirkspektrum der Substanzen. Des Weiteren konnten gegensätzliche Auswirkungen der PD98059 Behandlung an G-Protein-gekoppelten Signalvermittlungen beobachtet werden. PD98059 hemmte z.B. die Angiotensin-II vermittelte ERKs-Phosphorylierung in glatten Muskelzellen, dagegen war in diesen Zellen durch PD98059 keine Inhibition der Angiotensin-II bedingten Aktivierung der Phospholipase C und Phospholipase D zu erkennen⁹³⁹. Auch hemmte PD98059 die Phosphorylierung der ERKs in Myozyten, die dem Alphasympathomimetikum Phenylephrin ausgesetzt waren, jedoch konnte hierbei durch PD98059 nicht die Expression des Atrialen Natriuretischen Faktors (ANF) geblockt werden⁹⁴⁰.

Untersuchungen von *Aoki et al.*⁹⁴¹ beschäftigten sich mit der differentiellen Rolle der MAPKs im Herzen. Sie studierten die Angiotensin-II- bzw. Phenylephrin-bedingte kardiale Hypertrophie von neonatalen Rattenkardiomyozyten. Sowohl Angiotensin-II, als auch Phenylephrin erzeugten eine deutlich signifikante Aktivierung der ERKs, wogegen nur Phenylephrin eine starke und anhaltende Aktivitätssteigerung der p38-MAPKs und SAPK/JNKs verursachte. PD98059 inhibierte auch hier nur die durch Angiotensin-II bedingte Expression des Atrialen Natriuretischen Faktors und nicht diese, welche durch Phenylephrine hervorgerufen wurde. Sofern Inhibition durch PD stattfand, erfolgte sie sowohl auf dem mRNA-, als auch auf dem Polypeptidlevel des Faktors. Eine Beeinflussung anderer Marker der Angiotensin-II- bedingten Hypertrophie, wie α -Aktin-, c-Fos-Expression oder sarkomere Aktinformation konnte durch PD98059 nicht festgestellt werden. Der p38-MAPKs-Inhibitor SB203580, zeigte weder bei der Angiotensin, noch bei der Phenylephrin veranlassten Expression von ANF einen Effekt. Daher wurde postuliert, dass Angiotensin-II nur den ERKs-Signalweg der ANF-Expression nutzt.

Die Auswirkungen der PD- und UO-Substanzapplikation auf die Entstehung myokardialer Infarkte (Nekrose) bzw. Apoptose unter dem Zustand von Ischämie und Reperfusion wurde inzwischen in verschiedensten *in vivo*- und *in vitro*-Modellen untersucht. *Hong et al.* untersuchten an H₂O₂ behandelten kardialen H9c2-Myoblasten die Wirkung des Insulin-Wachstumsfaktors (IGF-1). Sie zeigten, dass die gesteigerte Apoptoserate der Myoblasten nach H₂O₂-Behandlung durch eine Vorbehandlung mit IGF-1 verringert werden konnte. Des Weiteren demonstrierten

sie im Verlauf des IGF-Wirkprozesses eine verminderte Bax-Expression, eine gesteigerte ERKs-Aktivität und eine verminderte JNKs-Aktivität. Die Stagnation der Apoptose, die durch IGF-1 erzielt wurde, konnte durch den MEKs-Inhibitor PD98059 wiederum vollständig aufgehoben werden, sodass die gleiche Apoptoserate der Zellen erreicht wurde, die nur mit H₂O₂ behandelt wurden ⁶³⁹.

Vergleichbar hierzu sind die Ergebnisse von *Yue et al.* ⁶⁸¹. Sie beschrieben ebenfalls in kardialen H9c2-Myoblasten eine gesteigerte Apoptose durch PD98059 von 18,6% (Kontrollzellen behandelt mit dem Lösungsmittel von PD) auf 33,4%. Die Apoptoserate wurde anhand der DNA-Fragmentierung und Caspase-9-Aktivität bestimmt. SB203580 und SB242719, Inhibitoren der SAPK/JNKs und der p38-MAPKs reduzierten wiederum, die durch PD98059 gesteigerte Apoptose um das Vier- bzw. Sechsfache. Auch an perfundierten Rattenherzen zeigte die Gruppe von *Yue et al.* nach globaler Ischämie von 30 min und einer Reoxygenierung von eine Stunde eine verzögerte Erholungsphase des Herzens, bedingt durch PD98059. Koadministration der beiden SB-Substanzen milderte den schädlichen Effekt von PD98059 insofern ab, dass eine signifikant verkürzte Erholungsphase des Herzens nach Ischämie/Reperfusion benötigt wurde ⁹⁴².

Ein weiterer differentieller Wirkungsweg von PD98059 konnte im Verlauf des Thrombin-bedingten Arachidonsäuremetabolismus in Endothelzellen und Blutplättchen beobachtet werden. In den Blutplättchen konnte weder eine Veränderung der Arachidonsäurefreisetzung noch eine Abwandlung der Blutplättchenaggregation festgestellt werden. In Endothelzellen dagegen wurde die Prostazyklin-I₂-Freisetzung gehemmt, während die Sekretion des von-Willebrandfaktors nicht beeinflusst wurde ^{943,944}.

Ein weiteres Augenmerk der PD98059- und UO126-Untersuchungen richtete sich aufgrund der proximalen Beteiligung des Ras-Proteins in der Signalvermittlung der MEK-1/2-ERKs-Kaskade auf den Einsatz der MEK-1/2-Inhibitoren in der Behandlung von Tumorerkrankungen. Eine Vielzahl von Tumoren basieren auf der Existenz mutierter Zellen durch onkogene Ras-Proteine. PD bewirkte in verschiedensten Tumorzelllinien einen signifikanten Rückgang der Mutationsrate ^{932,945}.

3. Die Rolle des ERKs-Aktivitätsverlaufs während Ischämie/Reperfusion und ischämischer Präkonditionierung

Die MAPKs zählen zu den Regulatoren wie auch Akteuren des Myokards im Zustand von Ischämie und Reperfusion. Dies impliziert die Frage: ist

Ischämie/Reperfusion der direkt auslösende Stimulus einer Aktivierungs- bzw. Deaktivierungskaskade der MAPKs oder ist die stattfindende Aktivitätsveränderung der Kinasen lediglich ein Nebeneffekt anderer Transduktionswege der Zelle im Zustand von Ischämie und Reperfusion? Eine Antwort gibt bereits die Definition des Begriffes oxidativer Stresstimulus. Es handelt sich dabei nicht um ein bekanntes extrazelluläres Signalmolekül, worauf die Zelle in charakteristischer und programmierter Weise antworten kann. Er setzt sich vielmehr aus einem komplexen Mediatorengemisch zusammen, das extrazellulär wie auch direkt intrazellulär angreift, sodass die Zelle je nach Zelltyp in ihrer eigenen spezifischen Art reagieren kann. Demzufolge sind die in der Literatur existierenden kontroversen Ergebnisse der verschiedensten Modelle nur allzu sehr verständlich.

Die ERKs, eine Subfamilie der MAPKs werden hauptsächlich durch Wachstumsfaktoren im Vorgang der Proliferation und Differenzierung einer Zelle aktiviert, doch auch der Ischämie- und Reperfusionssreiz bewirkt eine zelluläre Antwort unter Einbeziehung der ERKs-Kaskade. Eine Studie von *Shimizu et al.*⁹⁴⁶ zeigten, dass alle MAPKs, d.h. sowohl die ERKs, JNKs und p38-MAPKs durch Ischämie aktiviert werden. Die Ischämie wurde experimentell durch koronare Okklusion an einem *in vivo*-Infarktmodell der Ratte ausgelöst. Die Arbeitsgruppe ermittelte eine Aktivitätsspitze innerhalb der ersten fünf min des Verschlusses. Nach 30 min anhaltender Ischämie war ein Rückgang der Aktivitätskurve bis zum Basiswert zu beobachten. Vergleichbar diesem Aktivitätsverlauf waren die Ergebnisse unserer Untersuchungen mit der Ausnahme der JNKs, die erst während einer folgenden Reperusionsphase ihre Aktivitätssteigerung erlangten.

Auch in isolierten Rattenmyozyten, die einer Hypoxie und Reoxygenierung ausgesetzt wurden, war eine Aktivierung der 44 kDa und 42 kDa MAPKs (ERKs) durch "in-Gel" Kinasen-Phosphorylierungsuntersuchungen zu beobachten. Die Kinasenaktivitäten erreichten einen maximalen Wert nach 5-10 Minuten Hypoxie sowie nach 15 min Reoxygenierung^{947,948}. Untersuchungen von *Clerk et al.* befassten sich mit der Stimulation der MAPKs und der Phosphorylierung der kleinen Hitzeschock-Proteine (HSP 25/27) durch oxidativen Stress. Exemplarisch an Primärkulturen neonataler Myozyten wurde oxidativer Stress durch H₂O₂ induziert. Sie zeigten maximale Aktivität der p54 und p46 SAPK/JNKs nach 15-30 min. Eine signifikant erhöhte Aktivität im Vergleich zu Kontrollwerten war nach weiteren zwei Stunden zu erkennen, somit konnte von einer anhaltenden Aktivierung gesprochen werden, wodurch ein Unterschied zu der transienten Aktivierung der SAPK/JNKs anderer Studien festgestellt wurde⁹⁴⁹. Der Aktivitätsverlauf der ERKs war dem der SAPK/JNKs ähnlich. Ebenfalls vergleichbar war diese

Aktivitätskurve mit Versuchsergebnissen einer Phorbolmyristate Acetat-(PMA) Studie der Arbeitsgruppe. PMA zählt zu einem der Hauptstimuli der ERKs-Kaskade und bewirkt stets maximalen Aktivitätsausschlag in den Aktivitätsscreenings. Die ERKs-Aktivität konnte auch hier sowohl durch PD98059, wie auch durch den PKC Inhibitor GF109203X vollständig aufgehoben werden^{470,950}. Die untersuchte Phosphorylierung der HSP 25/27 zeigte eine leicht versetzte Phosphorylierungsspitze zu der des zweiten p38-MAPKs-Substrates MAPKAP-K2 und lag somit übereinstimmend mit den vorherigen Resultaten von *Clerk et al.* bereits zur 5 min der H₂O₂-Behandlung. Somit zeigte diese Studie, dass durch Ischämie alle MAPKs eine Hochregulierung ihrer Aktivität erlangen⁷⁰².

Die Rolle der ERKs während des Stresszustandes einer Hypoxie oder Ischämie wurde von *Bogoyevitch et al.* durch ein *in-vitro*-Gewebekulturmodell beschrieben. Sie induzierten myozytäre Ischämie durch Abnahme des zellulären ATP-Levels nach Behandlung der Zellen mit Kaliumzyanid und Deoxyglukose sowie Endothelin-1 oder Sorbitol. Eine Hochregulierung der Aktivität der ERKs konnte mittels jeder verwendeten Substanz des Modells demonstriert werden^{707,951}. Im Gegensatz zu diesen Resultaten, die in Rattenkardiomyozyten erzielt wurden, konnte in Epithelzellen der Hundeniere keine Aktivierung der ERKs durch Zyanid und Deoxyglukose hervorgerufen werden⁹⁵². Mögliche Unterschiede bezüglich der Aktivierung und Regulierung der Proteinkinasekaskade in unterschiedlichen zellulären Systemen verschiedener Tierarten können daher niemals ausgeschlossen werden.

Aikawa et al. zeigten, dass oxidativer Stress durch H₂O₂ die ERKs in kultivierten neonatalen Kardiomyozyten aktivierte⁵⁰⁴. *Adderley* und *Fitzgerald et al.* stellten fest, dass der Tod von Kardiomyozyten nach H₂O₂- und Doxorubicin Behandlung, durch eine Zunahme der Prostazyklinanordnung limitiert wurde. Diese Zunahme reflektierte die Induktion einer erhöhten Cyclooxygenase-2 (COX-2) Expression durch aktivierte ERK-1/2, die jedoch nachfolgend durch PD98059 wieder aufgehoben werden konnte⁹⁵³. Die positive Rolle der ERKs im Prozess der Zellprotektion wurde durch weitere Studien von *Sheng et al.* unterstützt. Die Autoren beobachteten in neonatalen Rattenmyozyten die protektive Wirkung des Herzzytokins Cardiotrophin 1 (CT-1)⁹⁵⁴. Dieser Effekt war mit der Aktivierung von ERK-1 und ERK-2 assoziiert. Die Konzentration von 10 µM PD98059 war wiederum ausreichend, um die Kardioprotektion von CT-1 vollständig zu hemmen.

Im Gegensatz zu den meisten Studien zeigte eine andere Studie *Bogoyevitchs et al.*, dass globale Ischämie und Ischämie mit folgender Reperfusion die p44 und p42 ERKs nicht aktivierte. Eine Erklärungsmöglichkeit der unterschiedlichen Resultate findet man nach wie vor in der Variation der experimentellen Bedingungen und

zum anderen in der Vernetzung aller MAPKs-Signalwege, sodass der lineare Signalverlauf nur selten existent ist und man nach wie vor noch nicht von der kaskadenspezifischen Wirkung sprechen kann^{18,955}.

Die ischämische Präkonditionierung einer Zelle lässt sich mit dem Zustand der Zelladaptation vergleichen. Dies bedeutet, dass Zellen bei nahezu jedem Reiz über einen großen Intensitätsbereich hinweg die gleiche prozentuale Änderung der Reizintensität wahrnehmen können. Auf der Ebene der Zielzellen bedeutet dies, dass die Zellen, die über einen längeren Zeitraum einem Reiz ausgesetzt sind, ihre Fähigkeit verlieren, mit der ursprünglichen Empfindlichkeit auf den Reiz zu reagieren. Durch den Prozess der adaptiven Konditionierung wird die Empfindlichkeit der Zelle in reversibler Weise dem Grad des Reizes angepasst. Für chemische Signale spricht man bei diesem Vorgang auch von einer Desensibilisierung der Zelle^{114,956,957}. Die Arbeitsgruppe von *Punn und Kollegen* untersuchten diese verzögerte Zytoprotektion neonataler ventrikulärer Kardiomyozyten im Verlauf des Phänomens der ischämischen Präkonditionierung. Sie erlangten eine Konditionierung der Zellen durch kurze, subletale Ischämie- und Reperusionszyklen und betrachteten dies im Hinblick einer folgenden letalen Ischämiephase. Der Aktivitätszustand der verschiedenen MAPKs variierte je nach Zeitpunkt des Präkonditionierungsprotokolls. Ischämie erzielte transiente Aktivierung der ERKs und der p38-MAPKs, dagegen nur eine schwache Aktivierung der SAPK/JNKs und keinerlei Aktivitätszunahme der Phosphoinositol-3-Kinase-abhängigen Proteinkinase B (PKB=Akt Kinase). Die folgende Reperfusion bedingte eine weitere transiente Aktivierung der p38-MAPKs, jedoch anhaltende Aktivitätsstimulation der ERKs. Verwendete man spezifische Inhibitoren der MAPKs und der PKB und untersuchte deren Wirkung auf die Überlebensrate der Zellen und den Phosphorylierungsstatus der jeweiligen Kinasen, so konnte nur PD98059 eine Phosphorylierungsminderung der ERKs und zugleich eine verminderte Überlebensrate der Kardiomyozyten auslösen. SB203580, der spezifische Inhibitor der p38-MAPKs und Wortmannin, ein Inhibitor der PKB, erzielten lediglich Phosphorylierungsinhibition der jeweiligen Kinasen ohne eine Auswirkung auf die verzögerte Protektion auszuüben⁹⁵⁸.

4. Die Wirkung von SB203580

SB203580 gehört zu der Gruppe der Pyridinylimidazole. SB203580 wirkt als direkter reversibler Inhibitor der p38-MAPKs, d.h. es blockiert die p38-MAPKs, indem die Kinasentranslokation zum Substrat verhindert wird. Somit wird die Phosphorylierung der Kinase selbst nur geringfügig beeinflusst, die ihrer

nachfolgenden Substrate jedoch annähernd vollständig^{776,959,960}. Es zeigte sich in den hier durchgeführten Aktivitätsuntersuchungen der p38-MAPKs-Kaskade, dass der Inhibitor durch Versuchsschritte der beschriebenen Zellfraktionierung, wie Homogenisierung und Waschschrte des Aktivitätsassays bereits ausgewaschen wurde, sodass eine Reaktivierung der p38-MAPKs im Verlauf der *in-vitro*-Versuchsdurchführung wieder stattfinden musste.

Andere Studien berichteten, dass SB203580 bei höheren Konzentrationen (>10 μM) auch die 54 und 52 kDa SAPK/JNKs, jedoch nicht die 46 kDa JNK-1 blockierte⁷⁷⁷. Betrachtet man den Aktivitätsstatus der SAPK/JNKs der hier vorliegenden Untersuchungen sowie der anderer Forschungsgruppen, d.h. dass die Aktivitäten von SAPK/JNKs durch Ischämie unberührt bleiben und Aktivierung nur während der Reperfusion stattfindet^{955,961-963}, so kann man von einer spezifischen Wirksamkeit der SB203580-Substanz auf die p38-MAPK-Phosphorylierungskaskade ausgehen. Aus diesem Grund sind die SAPK/JNKs wahrscheinlich auch nicht an der erhöhten Phosphorylierung des SAPKs/JNKs-abhängigen Transkriptionsfaktors, ATF-2 während einer Ischämie beteiligt.

Über die Wirkung der SB-Substanz existieren ebenfalls gegensätzliche Standpunkte. Übereinstimmend ist man sich in der Tatsache des Wirkpotenzials der Substanz ausschließlich gegenüber der aktivierten Form der p38-MAPKs. Nur dieser Zustand der Kinase kann inhibiert werden und resultiert in der Reduktion der Phosphorylierungsintensität ihrer Substrate. Somit stehen die Ergebnisse in engem Zusammenhang zu den Aktivitätsverläufen der Kinase im Zustand von myokardialer Ischämie und Reperfusion und werden daher im folgenden Abschnitt diskutiert⁹⁶⁴.

5. Die Rolle der p38-MAPKs während Ischämie/Reperfusion und ischämischer Präkonditionierung

Die wichtigsten Resultate der dargestellten p38-MAPKs-Studie sind:

- (1) Erhöhung der myokardialen p38-MAPKs-Aktivität nach einer Ischämiephase, jedoch Verminderung durch folgende Reperfusion und wiederholte kurze Ischämiezyklen.
- (2) Die Erkenntnis der myokardialen Protektion durch die Gabe des spezifischen p38-MAPKs-Inhibitors, Pyridinylimidazolderivats SB203580, d.h. eine deutlich erhöhte Ischämietoleranz, bei der Anwendung der lokalen intramyokardialen Applikationsform des Inhibitors, sodass geschützte Myokardareale um die Infusionsnadeln zu erkennen waren.

- (3) Keine Beeinflussung der IP-vermittelten Kardioprotektion durch die systemische oder lokale intramyokardiale Anwendung der SB203580-Substanz.

Diese Resultate zeigten somit eine Wechselbeziehung zwischen der p38-MAPKs Aktivierung und dem myokardialen Herzschutz, d.h. geringe p38-MAPKs-Aktivität korrelierte mit einer verbesserten Überlebenschance des ischämischen Myokardgewebes und umgekehrt.

Da anhaltende Ischämie des Myokards die schnellste und sicherste Methodik darstellt, um Tod der Myozyten auszulösen, postulierten wir, dass eine p38-MAPKs-Aktivierung zum Zeitpunkt der Ischämie eine der Hauptursachen des beschleunigten oder vorzeitigen Zelltodes ist.

ATF-2, ein nukleärer Transkriptionsfaktor, der *in vivo* als Substrat der p38-MAPKs Kaskade dient, zeigte im beschriebenen Versuchsmodell erhöhte Phosphorylierung während der Ischämie. Eine erhebliche Verringerung seines Phosphorylierungsstatus konnte als Folge der p38-MAPKs-Signalblockade durch SB203580 festgestellt werden. Somit war auch eine Auswirkung der nukleären Signalvermittlung der p38-MAPKs im gezeigten Versuchsabschnitt zu beobachten.

Ausgehend vom proximalen Signalvermittlungsweg des Ischämie/Reperfusionssreizes und der ischämischen Präkonditionierung, nämlich der Zellmembran und ihrer Rezeptoren, hat sich die Aufmerksamkeit der Forschungsarbeiten mehr und mehr auf den distalen Abschnitt, d.h. in das Zellinnere verlagert. Hierbei spielen Proteinkinasen eine entscheidende Rolle. Im Besonderen wird die Funktion der p38-MAPKs beim Phänomen der IP und der myokardialen Ischämie stark kontrovers diskutiert. Während andere Stimulatoren wie z.B. Adenosin^{708,760,965,966}, Phenylephrin, Endothelin, Endotoxine und PMA^{967,968} als gesicherte Aktivatoren der p38-MAPKs-Kaskade gelten, existieren gegensätzliche Standpunkte in Bezug des Ischämie- und Reperfusionssstimulus. Grundlegende Unterschiede bestehen in der Angabe des Zeitpunktes des Aktivitätsmaximums der p38-MAPKs. Die Mehrheit der Literatur beschreibt den Aktivitätspeak der p38-MAPKs ausschließlich im Verlauf der Ischämie, wobei das Verfahren der "low-flow" Ischämie hierbei keine maximale Aktivität erzielen kann⁹⁶⁹. Andere Studien zeigten nur einen minimalen Aktivitätsanstieg der Kinase durch Ischämie und das Maximum nur während der Reperfusion⁹⁷⁰. Des weiteren diskutiert man den Aktivitätsverlauf. Ist das Aktivitätsmaximum der Kinase erreicht, so kann es von transientem oder dauerhaftem Charakter sein, d.h. einen schnellen Anstieg und Abfall aufzeigen oder über mehrere Stunden anhalten⁹⁷⁰⁻⁹⁷². Ein weiteres Kriterium des Kinasenaktivitätsstatus ist der Verlauf während eines Präkonditionierungs-

prozesses, d.h. die Auswirkungen durch wechselnde Ischämie- und Reperfusionenzyklen. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigte die Mehrheit anderer Studien, dass persistierende Ischämiephasen der IP, d.h. Ischämie, die von Reperusionsperioden unterbrochen wurde, keinen weiteren Aktivitätsanstieg der p38-MAPKs erzielen können^{973,974}.

Die Folge des Aktivitätsanstieges der p38-MAPKs ist ein weiterer Ansatzpunkt der Diskussion. Zum einen wird postuliert, dass die gesteigerte Aktivität der p38-MAPKs einen Schutz des Myokards vor den Zellschädigungen einer Ischämie aufbaut und auch das protektive Potenzial eines ischämischen Präkonditionierungsprotokolls mitbegründet. Die Gegenposition behauptet, dass Ischämie-bedingte Aktivität der p38-MAPKs die Entstehung größerer Infarkt-(Nekrose)gebiete bewirkt und am Aufbau des schützenden Präkonditionierungsprozesses unbeteiligt ist. Erste Veröffentlichungen, die diese Fragestellung behandelten, stammten aus der Arbeitsgruppe um *Downey et al.*. Sie zeigten eine erhöhte Phosphorylierungsintensität der Aminosäure Tyrosin 182 der p38-MAPKs nach einer Indexischämie an präkonditionierten Kaninchenherzen im Vergleich zu Kontrolltieren ohne Präkonditionierung und alleiniger Indexischämie⁹⁷⁵. Diese gesteigerte Phosphorylierung konnte wiederum aufgehoben werden, sofern die Präkonditionierung pharmakologisch durch den Adenosin-Rezeptor-Agonist 8-(p-Sulfophenyl)Theophyllin (SPT) oder mittels SB203580 blockiert wurde. Folgeversuche dieses Modells ermöglichten keine Reproduzierbarkeit und demonstrierten die unsaubere Methodik des Versuchs, da definierte Zeitangaben der Biopsieentnahme fehlten und nicht wirksame Konzentrationen der SB-Substanz verwendet wurden.

Parallele Studien an isolierten adulten Kaninchenmyozyten zeigten, nachdem die Zellen mittels des Modells der Mineralöl-Pelletierung präkonditioniert wurden, eine hohe Resistenz gegen osmotischen Schock. Diese Konditionierung war nicht mehr zu beobachten, sofern die präkonditionierten Myozyten mit dem p38-MAPKs Inhibitor SB203580 behandelt wurden. Gegenteiliges konnte gezeigt werden, wenn die Myozyten mit dem p38-MAPKs/JNKs-Aktivator Anisomycin behandelt wurden. Die Wirkung von Anisomycin war ohne eine vorgeschaltete Präkonditionierung, der Kardioprotektion der Präkonditionierung gleichzusetzen. Hierbei wurde nicht die Phosphorylierung der p38-MAPKs selbst untersucht, sondern die ihres nachgeschalteten Substrates, der MAPKAP-Kinase 2^{976,977}.

Omura et al. zeigten an einem *in vivo*-Rattenmodell keine Aktivitätssteigerung der p38-MAPKs innerhalb einer 30 minütigen Ischämiephase und somit keine Protektion durch aktivierte p38-MAPKs⁹⁷⁸. Bestätigung dieser Ergebnisse wurde von *Maulik et al.* an Rattenherzen und von *Armstrong et al.* in Kaninchenmyozyten

erbracht. *Armstrong et al.* untersuchten jedoch die duale Phosphorylierung der p38-MAPKs am Tyrosin 182- und Threonin 180-Rest sowie die eines weiteren Kinase-Substrates, des "heat shock protein 27" (HSP 27). Die protektive Wirkung der Präkonditionierung konnte durch den Inhibitor SB203580 aufgehoben werden, während durch den Protein-Phosphatase Inhibitor Calyculin A die Protektion der Präkonditionierung potenziert wurde oder sie sogar in ihrer Wirkung vollständig ersetzen konnte⁷⁵⁹. *Maulik et al.*^{583,974,979} zeigten durch einen *in-vitro*-Phosphorylierungsassay eine gesteigerte MAPKAP-K2- und HSP-27-Aktivität nach Präkonditionierung, die durch SB203580 auf Kontrollwertlevel dezimiert wurde. Vergleichbare Resultate wurden von *Dana et al.* an einem *in vivo* Kaninchen-Modell mit "late preconditioning", d.h. verzögerter Präkonditionierung gezeigt. Pharmakologische Präkonditionierung der Kaninchenherzen erfolgte hier durch den selektiven A1-Agonisten, 2-Chloro-N(6)-Cyclopentyladenosin (CCPA), wodurch die Infarktgröße signifikant im Vergleich zu Kontrolltieren reduziert wurde. Nach 30 min regionaler Ischämie/2 Stunden Reperfusion zeigten sich 24 Stunden später signifikant verringerte Infarktgrößen im Vergleich zu den Kontrolltieren. Diese verzögerte Protektion wurde entweder durch den PKC-Inhibitor Chelerythrine-Chloride oder den Tyrosinkinase (TK)-Inhibitor Lavendustin A außer Kraft gesetzt, was zu der Schlussfolgerung führte, dass beide, PKC und TK, eine bedeutsame Rolle in der Präkonditionierung nach A1-Rezeptor-Aktivierung besitzen. Um die Tyrosinkinase mehr zu spezifizieren wurde die Aktivierung der p38-MAPKs untersucht. Sie zeigte eine sieben-fache Phosphorylierungssteigerung nach CCPA Präkonditionierung, die jedoch durch die Inhibitoren der PKC oder TK wieder aufgehoben wurde⁷⁶⁰.

Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe *Nakanos* demonstrierten an Langendorff-perfundierten Kaninchenherzen nach einer globalen Ischämiephase von 20 min nur geringe Aktivität der p38-MAPKs, dagegen in zuvor präkonditionierten Herzen einen vier-fachen Aktivitätsanstieg. Eine Aktivitätsblockade der p38-MAPKs konnte auch hier durch SB203580 und einen Adenosin 1-Rezeptorantagonisten beobachtet werden. Die Anwendung von Anisomycin, einem p38-MAPKs- und JNKs-Aktivator oder die Applikation eines Adenosin 1-Rezeptoragonisten verursachte eine vergleichbare Aktivitätssteigerung der p38-MAPKs nach IP und gleichsam signifikante Reduktion der Infarktgrößen^{976,977}.

Durch Wechsel der Tierart von Kaninchen zu Ratten, jedoch Gebrauch des gleichen Perfusionssystems, zeigten *Mocanu et al.*⁹⁵⁹ grundsätzlich unterschiedliche Ergebnisse der SB203580-Wirkung je nach Wahl des Applikationszeitpunktes der Substanz. Die Intervention von SB in das Ausmaß der entstehenden Infarktgröße war nur dann zu beobachten, sofern die Substanz während der letzten

Reperfusionphase des IP und während der ersten 15 min der globalen Ischämie verabreicht wurde. Nur hier bedingte die Substanz eine Blockade des protektiven Schutzmechanismus von IP. Die Applikation von SB203580 vor und während IP verursachte keine Veränderung der IP-Infarktreaktion. Wurde SB203580 in der Kontrollgruppe verabreicht, die keinem IP-Protokoll unterzogen wurde und nur globale Indexischämie erfuhr, so bedingte SB203580 durch Perfusion vor und während der ersten 15 min der letalen Indexischämie keine Verringerung der Infarktgröße. Fraglich an dieser Studie ist jedoch die Problematik des Aktivitätsverlaufes der p38-MAPKs. Die Autoren demonstrierten nämlich (1) die Abnahme der Kinasenaktivität nach IP, (2) eine erhöhte Aktivität nach Ende der Indexischämie plus vorgeschalteter IP und (3) das gleiche Aktivitätsmaximum der p38-MAPKs zum Zeitpunkt der 10 min Indexischämie, unabhängig eines vorgeschalteten IP-Protokolls. Somit kann die Schlussfolgerung der Autoren, dass die p38-MAPKs an der IP-Vermittlung beteiligt sind nicht aufrecht erhalten werden.

Auch Untersuchungen von *Nagarkatti* und *Sha'afi et al.* zeigten an der Rattenmyoblast-Zelllinie H9C2, dass der schützende Effekt der ischämischen Präkonditionierung in Anwesenheit von SB203580 aufgehoben wurde. In Anwesenheit des MEK-Inhibitors PD98059 war dagegen keine Einschränkung der Protektion zu erkennen⁵⁵⁴. Paradoxaerweise wurde auch hier demonstriert, dass SB203580 nur dann Wirkung zeigte, sofern es während der letalen Indexischämie verabreicht wurde. Vergleichbar zu unseren Resultaten beschrieb die Arbeitsgruppe, dass aufeinanderfolgende Ischämiezyklen der Präkonditionierung bereits Deaktivierung der p38-MAPKs bewirkten. Der p38-MAPKs-Inhibitor konnte daher während der letalen Ischämiephase nicht mehr angreifen, da keine Enzym-Aktivität zur Blockade vorhanden war.

Zusammenfassend demonstrierten diese Arbeiten, dass eine Präkonditionierung die p38-MAPK-Aktivität erhöht, sodass während der folgenden langandauernden, "letalen" Ischämie die noch andauernde Aktivität der p38-MAPK-Kinase Infarkt-Reduktion bewirkt.

Gegensätzliche Ergebnisse zeigten ein gesteigertes Aktivitätsmuster der p38-MAPKs nach Ischämie und Reperfusion, verbunden mit einer Steigerung des Zelluntergangs, d.h. vergrößerten Infarkten und einer verschlechterten kardialen Erholung. Beispielhaft zeigten *Mackay* und *Mochley-Rosen*^{980,981} durch ein Ischämiemodell an neonatalen Rattenkardiomyozyten zwei Phasen der p38-MAPKs-Aktivierung. Die erste Phase begann mit 10 min Ischämie und dauerte weniger als eine Stunde an. Die zweite Phase des Aktivitätsanstieges begann nach zwei Stunden und hielt über die gesamte Ischämie an. Der spezifische p38-MAPKs-

Inhibitor SB203580 bewirkte eine konzentrationsabhängige Protektion der Kardiomyozyten gegenüber langanhaltender Ischämie. Die Protektion konnte jedoch nur beobachtet werden, sofern die SB203580-Gabe während der zweiten anhaltenden Aktivitätsphase der p38-MAPKs erfolgte. Außerdem konnte gezeigt werden, dass SB203580 die Aktivität der Caspase-3, einem Schlüsselenzym der Apoptose, reduzierte. Dies lässt den Rückschluss zu, dass die gesteigerte p38-MAPK-Aktivität während der Ischämie den apoptotischen Zelluntergang von Kardiomyozyten mitbedingt und p38-MAPK-Inhibitoren daher als potentielle Therapeutika gegen ischämische Herzkrankheiten diskutiert werden sollten ⁹⁸². Weitere Untersuchungen dieser Gruppe am gleichen Modell zeigten nach der Gabe des Tyrosin-Phosphatase-Inhibitors Vanadate eine länger anhaltende Aktivierung der p38-MAPKs während der Ischämie, indem ihr Abbau blockiert wurde. Dies resultierte in einer erhöhten Empfänglichkeit der Zelle gegenüber dem Ischämie-induzierten Zelluntergang, was wiederum durch SB203580-Gabe aufgehoben wurde.

Vergleichbare Ergebnisse zeigten *Saurin et al.* ebenfalls an ventrikulären neonatalen Kardiomyozyten. Sie bestimmten die Determinanten CK (Creatin-Kinase-Freisetzung) und LDH (Laktatdehydrogenase-Freisetzung) von neonatalen Rattenkardiomyozyten nach Ischämie. Beide Werte wurden durch SB203580-Gabe im Vergleich zu Kontrollzellen reduziert. Um eine Isoform-selektive Wirkung der p38-MAPKs zu bestimmen, wurden die Zellen mit Wildtyp p38 α oder p38 β adenoviral transfiziert ⁵⁸⁴. Es wurden signifikant unterschiedliche Aktivitätslevel der beiden Isoformen festgestellt, p38 α zeigte Aktivitätsanstieg nach Ischämie, p38 β deaktivierte. Weiterhin zeigten Zellen, die die Expression einer dominant negativen p38 α besaßen, keinen Aktivitätsanstieg durch Ischämie und keine signifikanten Unterschiede in CK- und LDH-Freisetzung gegenüber Kontrollzellen. Dies bedeutete, dass die erhöhte p38-MAPK-Aktivität nach Ischämie und der resultierende vermehrte Zelluntergang, nur durch die Aktivierung der Isoform α bedingt wurde. Da diese beiden p38-MAPK-Isoformen die einzigen sind, die im Myokard exprimiert werden und beide, im Gegensatz zu den Isoformen γ und δ sensitiv gegenüber SB203580 sind, bewirkt nach Ansicht der Autoren ausschließlich p38 α den Zelltod der Kardiomyozyten, p38 β dagegen Wachstum und Überleben ^{769,983}. Diese funktionellen Unterschiede der Isoformen, ist somit neben den tierartlichen und methodischen Differenzen der experimentellen Modelle eine weitere Erklärungsmöglichkeit der gegensätzlichen Resultate. In der Mehrzahl der Untersuchungen erfolgte nämlich eine totale Aktivitätsbestimmung der p38-MAPKs, d.h. die Aktivitäten der Isoformen wurden summiert ⁹⁸⁴. Auch wir können es nicht ausschließen, dass mehrere Isoformen der p38-MAPKs an der dokumentierten Aktivitätsbestimmung beteiligt sind, doch versuchten wir das

Verfahren durch eine vorgeschaltete Immunopräzipitation der Proben mit einem C-20 p38-MAPKs-Antikörper (keine Kreuzreaktion mit der β -Isoform) zu spezifizieren. Geht man von den Ergebnissen *Conrads et al.* aus, so zeigen in PC12-Zellen nur die Isoformen α und γ Aktivitätssteigerung durch Hypoxie⁹⁸⁵. Des weiteren wurde gezeigt, dass die Isoformen γ und δ keine Sensitivität gegenüber der SB203580-Substanz aufzeigen und im Herzen ausschließlich die Isoformen α und β exprimiert werden^{986,987}. Insofern würden sich die diskutierten Resultate der Arbeit auf die α Isoform der p38-MAPK reduzieren und spezifizieren.

Weitere Untersuchungen, die bestätigten, dass die gesteigerte p38-MAPK-Aktivität mit einer Schädigung des Myokards verbunden ist, konnten an einem *in vitro*-Modell von *Ma et al.* gezeigt werden. Die Studie wurde an perfundierten Kaninchenherzen durchgeführt, einem Modell, das dem von *Downey et al.* entsprach⁹⁷³. Ischämie alleine bewirkte nur einen moderaten und transienten Aktivitätsanstieg der p38-MAPKs. Folgte der Ischämie eine Reperfusion, so potenzierte sich die Aktivität der p38-MAPKs. Der maximale Aktivitätslevel (6,3-fach) wurde zur 10. min der Reperfusion erreicht. Wurde SB203580 vor und während der Ischämie verabreicht, so konnten eine Verminderung der myokardialen Apoptose sowie eine Verbesserung im Wiedererlangen der kardialen Funktionen beobachtet werden. Ebenfalls konnten *Ma et al.* eine Abhängigkeit des Zeitintervalles der SB203580-Applikation beobachten. Eine komplette Inhibition der p38-MAPK-Aktivität konnte nur dann gezeigt werden, wenn der Inhibitor vor der Ischämie und während der Reperfusion gegeben wurde, dagegen zeigte die alleinige Administration des Inhibitors zum maximalen Aktivitätslevel der Kinase, d.h. zur 10. min der Reperfusion, keine Wirksamkeit. Grundsätzlich stimmt dieses Studienergebnis mit dem vorliegenden Ergebnis der diskutierten Arbeit überein, jedoch konnten wir kein Aktivitätsmaximum zum Zeitpunkt der Reperfusion feststellen.

Einen vergleichbaren Aktivitätsverlauf der p38-MAPKs während der Ischämiephase zeigten Untersuchungen von *Marais et al.* an perfundierten isolierten Rattenherzen⁹⁷⁰. Sie zeigten übereinstimmend mit den hier beschriebenen Ergebnissen ein Maximum der Kinasenaktivität während der ersten Ischämiephase des IP und einen progressiven Abfall in den folgenden Ischämie- und Reperfusionsphasen. Während der globalen Ischämie war sowohl in den präkonditionierten als auch in den Kontrollherzen das Aktivitätsmaximum zur 15. min festzustellen. SB203580 zeigte keinen Effekt auf IP, jedoch signifikante Verbesserung der im zweiten Studienabschnitt untersuchten Zellvitalität nach Hypoxie.

Versuche von *Rakhit et al.* an isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten demonstrierten übereinstimmend mit unseren Resultaten ein gesteigertes Aktivitätspotenzial der p38-MAPKs nach Ischämie. Dieser Aktivitätsanstieg der p38-MAPKs war im Vergleich zu SB203580-behandelten Zellen mit einer signifikant vermehrten Zellnekroserate verbunden. Der Aktivitätspeak konnte durch die Gabe eines NO-Donors um das Zeitintervall von einer Stunde aufgeschoben, d.h. verzögert werden. Diese Verzögerung ist ein Erklärungsweg der NO-bedingten Kardioprotektion. Untersuchungen an diesem Modell, die sich mittels viraler Transfektionen auf die α - und β -Isoformen-spezifische p38-MAPKs-Reaktion beschränkten, resultierten in einem vermehrten Zelluntergang, der nur durch die α -p38MAPK-bedingt wurde^{102,103}.

Studien von *Maulik et al.* demonstrierten an perfundierten Rattenherzen einen Zusammenhang zwischen der Folge ischämischen Stresses und der Aktivierung bzw. Translokation des nukleären Faktors κ B. Dieser Aktivitäts- und Translokationsvorgang konnte durch die Gabe des Tyrosinkinaseinhibitors Genistein sowie durch SB203580-Applikation blockiert werden^{583,974,979,988}. Die Rolle des nukleären Faktors κ B in Assoziation der p38-MAPKs-Aktivierung wurde ebenfalls durch Studien von *Meldrums et al.* näher erläutert. Sie zeigten eine gesteigerte Produktion des Tumornekrosefaktors α nach Hydrogenperoxid-Perfusion der Rattenherzen. Gleichzeitig konnte eine signifikante Steigerung der myokardialen p38-MAPKs-Aktivität festgestellt werden, was zu einer postischämischen Dysfunktion der Herzen führte. Perfundierte man die Herzen zusätzlich mit einem p38-MAPKs-Inhibitor oder mit einem neutralisierenden TNF-bindenden Proteins, so konnten erhöhte ischämische Toleranzwerte des Herzens erzeugt werden⁹⁸⁹⁻⁹⁹¹.

Die Wirkung der p38-MAPKs im Zusammenhang des myokardialen apoptotischen Zelluntergangs wurde von der Arbeitsgruppe um *Iwakura et al.* untersucht. Sie zeigten an ventrikulären Rattenkardiomyozyten die Stimulation der p38-MAPKs durch die Behandlung der Zellen mit Perikardflüssigkeit ischämisch herzerkrankter Patienten. SB203580 blockierte diesen Aktivierungsvorgang der Kinase und reduzierte die Zahl der Apoptose-positiven Zellen signifikant⁹⁹². Die Untersuchung anderer Zellsysteme im Zusammenhang des p38-MAPKs-Aktivitätsverlaufs und Apoptose erfolgte vor allem durch *Kawasaki et al.* und *Kummer et al.*. Kawasaki und Kollegen konzentrierten sich auf die durch den Neurotransmitter Glutamat induzierte Apoptose zerebraler Granulazellen⁶⁸⁵. Auch hier bewirkte der Einsatz von SB203580 einen deutlichen Rückgang der Apoptoserate der Zellen. Die durch den nerve-growth-factor (NGF) verursachte Apoptosesteigerung von PC12-Zellen konnte ebenfalls in Verbindung mit einer

p38-MAPKs-Aktivitätssteigerung gebracht werden und wiederum durch Pyridinylimidazolbehandlung vermindert werden⁹⁹³.

Die Untersuchung der p38-MAPKs erfolgte ebenfalls an humanen Proben des Herzens. Biopsieproben des rechten Atriums wurden an CABG ("coronary artery bypass grafting") behandelten Patienten entnommen. *Talmor* und seine Kollegen entnahmen die Proben während unterschiedlich lang andauernder Ischämie- und Reperusionsphasen und studierten im Anschluss die Expression und den Aktivitätszustand aller drei MAPKs. Die Expression aller MAPKs änderte sich während des gesamten Verlaufs der Operation in keinem nachweisbaren Maße. Ein Aktivitätsanstieg der c-Jun-NH₂-Kinasen konnte nur während Reperusionsphasen festgestellt werden, Ischämie dagegen erbrachte keine Veränderung der Kinasenaktivität. Eine Verlängerung der Ischämie bewirkte hierbei ebenso keine Reaktion^{994,995}.

6. Die Wirkung von Taxol

Taxol (Paclitaxel), das Gift der *Taxus*-Baumrinde, wird neben anderen Verbindungen des Colchicin-Typs, den Vinca-Alkaloiden (Vinblastin, Vincristine, etc.) und den Anthracyclinen (Daunomycin, Doxorubicin, etc.) hauptsächlich in der Behandlung von Ovarial-, Zervikal- und metastasierenden Lungenkarzinomen eingesetzt^{691,996,997}. Seine antiproliferative Wirksamkeit entsteht durch Inhibition der G₂/M-Phase der mitotischen Zellteilung, indem der bipolare Mitosespindelapparat in seiner Formation aus Mikrotubuli und assoziierten Proteinen (z.B. Myosin) gehemmt wird. Im Speziellen wird durch Taxol der Schritt der Mikrotubulidepolymerisation im Zytoplasma geblockt. Taxol bindet hierbei stark an Mikrotubuli und stabilisiert sie in ihrer polymerisierten Form. Setzt man es Zellen zu, wird ein großer Teil des freien heterodimeren Tubulins in die Mikrotubuli eingebaut, d.h. Polymerisation findet statt. Diese Stabilisierung der Mikrotubulipolymere durch Taxol bedingt eine Stagnation der mitotischen Teilung der Zelle während der Metaphase. Eine folgende Depolymerisation ist notwendig, um das dynamische Gleichgewicht aus polymerisierten und depolymerisierten Mikrotubuli herzustellen. Das Verhalten der dynamischen Instabilität der Mikrotubuli ist für ihre Ausrichtung, d.h. eine Längenveränderungen in der Zelle von großer Bedeutung. Durch Taxol wird somit verhindert, dass die Spindel die zuvor replizierten Chromosomen und die anschließend entstandenen Tochterchromosomen zu den entgegengesetzten Spindelpolen zieht. Die vorübergehende Verhinderung der Bildung der Mitosespindel bedingt bevorzugt einen Untergang von Zellen, die sich abnorm teilen⁹⁹⁸. Aufgrund dessen verwendet

man den Mitosehemmer Taxol vor allem in der Krebstherapie. Der Zelltod, der durch Taxol bedingt wird, ist zumeist ein apoptotischer Zelluntergang⁹⁹⁹.

Die Signalvermittlung der Taxolwirksamkeit wird in der Literatur sehr widersprüchlich diskutiert. Während die Mehrheit der Arbeiten sowohl in Krebszelllinien als auch in unveränderten Lymphoblasten und Makrophagen eine Aktivierung der SAPK/JNKs, der p38-MAPKs und eine Deaktivierung der ERKs nach Taxolgabe feststellten, demonstrierten wiederum andere Gruppen eine Deaktivierung aller Stress-aktivierten MAPKs, eine Unwirksamkeit auf den ERKs-Signalweg¹⁰⁰⁰ sowie eine Deaktivierung der "upstream" Proteinkinase Raf-1¹⁰⁰¹.

Die aktivierenden Eigenschaften des Taxols auf die SAPK/JNKs Signalkaskade zeigen sich vor allem in einer gesteigerten Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren des AP-1 (c-Jun und c-Fos), des nukleären Faktors NF- κ B^{687,1002} und des zytosolischen Mikrotubuli-assoziierten Proteins-2 (MAP-2)⁷⁰⁹. Das Resultat der Aktivierung war zumeist eine vermehrte Apoptoserate der Zellen¹⁰⁰³⁻¹⁰⁰⁸. Untersuchte man in diesem Zusammenhang Bcl-2, eines der stärksten antiapoptotisch wirkenden Proteine, zeigte sich nach Taxolverabreichung ebenfalls eine gesteigerte Phosphorylierung des Proteins, d.h. eine Inaktivierung von Bcl-2, sodass seine antiapoptotische Wirksamkeit (Verhinderung der Lipidperoxidation) aufgehoben wurde^{688,1008,1009}.

Konzentrationsbestimmungen der Zytokine Interleukin-1 und TNF- α zeigten ebenfalls nach Taxolgabe erhöhte Werte. Sie zählen neben einer Vielzahl von Stressestimuli zu den Hauptimpulsen einer aktivierten SAPK/JNKs-Signalkaskade, jedoch stellte Taxol nicht den Auslöser der Zytokinbildung dar, es bewirkte lediglich eine Steigerung der bereits stattfindenden Produktion¹⁰¹⁰.

Des weiteren war auch eine Aktivitätssteigerung der PKC-Isoformen α und γ nach Taxolaussetzung zu beobachten¹⁰¹¹ sowie eine Aufhebung der Taxol-bedingten Apoptose durch die PKC-Inhibitoren, Bisindolylmaleimide (GF109203X), Calphostin C, Staurosporin und Polymyxin B^{1012,1013}. Eine weitere Aufhebung der Taxol-bedingten Apoptoserate konnte in humanen Lungenkarzinomzellen durch den Serin-Protease-Inhibitor N-Tosyl-L-Phenylalanine-Chloromethyl-Keton gezeigt werden¹⁰¹⁴ und andererseits durch den Tyrosin-Kinase-Inhibitor-Lavendustin wieder gesteigert werden.

In unserem *in vivo*-Tiermodell wurde die Wirkung von Taxol bezüglich folgender Fragestellung untersucht: Ist der aktivierende Stimulus des ischämischen Präkonditionierungsprotokolls auf die SAPK/JNKs-Kaskade durch die Taxolverabreichung beeinflussbar?

Zum einen ist die Existenz der großen Vielzahl von Signalkaskaden der MAPKs, die an verschiedensten Punkten Kreuzungsstellen aufweisen, eine Erklärungsmöglichkeit für die differentiellen Ergebnisse der durch Taxol bedingten Phosphorylierungszustände der SAPK/JNKs. Zum anderen sind die Verwendung unterschiedlicher *in vitro*-Zellsysteme sowie die Verabreichung verschiedener Taxolkonzentrationen⁹⁹⁶ ein weiterer Grund der pro- und kontraaktivierenden Wirkungsweise von Taxol⁶⁹¹.

Übereinstimmend war in den proaktivierenden Untersuchungen der SAPK/JNKs-Kaskade, dass Taxol den alleinigen Aktivitätsstimulus der SAPK/JNKs darstellte, ein zweiter simultaner Reiz fehlte.

Untersuchungen, in denen die Zellen einem zweiten additiven Reiz zu Taxol ausgesetzt wurden, zeigten eine Potenzierung der Apoptoserate, zugleich aber eine Verminderung der Phosphorylierungsintensität der SAPK/JNKs und der Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAPs). Beispiele dieser synergistischen Stimuli waren die Gabe des bakteriellen Endotoxins LPS^{997,1015-1017}, die Gabe der Taxol-synergistischen Indolocarbazolen (KT5926, KT5720, K252b, U-98017) oder der dreiwertigen Kalzium-Pyrophosphat-Dihydrat-Kristallen^{1018,1019}. Diese Versuche stellen somit eine vergleichbare Ausgangssituation zu unserem Versuchsmodell dar, da wir ebenfalls einen zweiten Reiz, die Ischämie und Reperfusion, kombiniert zu Taxol verwendeten.

Weitere Versuche von *Duesbery* und *Kollegen* demonstrierten an Oozyten eine durch Inositol-Triphosphat (InsP3)-bedingte Ca²⁺-Freisetzung. Es zeigte sich eine Steigerung der Ca²⁺-Freisetzung durch den Zusatz von 2 µM InsP3. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass die Ca²⁺-Freisetzung durch eine InsP3 vermittelte Phosphorylierung der p42-MAPK bedingt war. Diese Tyrosinphosphorylierung der p42 MAPK konnte durch Taxol verhindert werden, sodass auch die InsP3-gesteigerte Ca²⁺-Freisetzung gehemmt wurde. Durch diese Darstellung der Phosphorylierungshemmung der p42 MAPKs war erstmals der Nachweis erbracht, dass eine Phosphorylierungsinhibition der MAPKs durch Taxol bedingt werden kann¹⁰²⁰.

Versuchsergebnisse von *Jackson et al.* an humanen Neutrophilen demonstrierten die Aktivierung von SAPK/JNKs durch dreiwertige Kalzium-Pyrophosphat-Dihydrat-Kristalle (CPPA). Sowohl die ungebundene, als auch die plasmagebundene Form von CPPA führte zu einer signifikanten Steigerung der SAPK/JNKs Aktivität in Neutrophilen. Das Aktivitätsmaximum wurde nach einer Minute CPPA-Inkubation festgestellt. Eine Präinkubation der Zellen mit 28 µM Taxol verhinderte vollständig den Aktivitätsanstieg der SAPK/JNKs durch CPPA¹⁰²¹.

Die Arbeitsgruppe um *Cruz et al.* untersuchte die Taxolwirkung an proliferierenden bovinen Synoviozyten, Zellen, die hauptsächlich für die Chondropannusbildung der progressiven rheumatoiden Arthritis verantwortlich sind. Die Expression der Kollagenase 1 (Matrix-Metalloproteinase-1) und des Stromelysin 1 (Matrix-Metalloproteinase-3) sind ebenfalls für arthrotische Gelenkszubildungen notwendig. Diese Enzyme wiederum benötigen eine Aktivierung durch den Transkriptionsfaktorkomplex AP-1, der ein spezifisches Substrat der SAPK/JNKs darstellt. Die Autoren zeigten, dass Taxol die Proliferation der Synovialzellen gänzlich stoppte. Die zytotoxischen Auswirkungen des Taxols verursachten eine erhöhte Apoptoserate der Synoviozyten und somit eine Verminderung der arthrotischen Veränderungen. Dies begründete sich in einer Aktivitätsblockade des AP-1 und einer folgenden Syntheseinhibition der Metalloproteinasen ^{1022,1023}.

Eine Studie von *Lee et al.* zeigte an Mäuselymphozyten der Milz selektive Inhibition der LPS-induzierten B-Zellproliferation mittels Taxol. Sie untersuchten im Speziellen die Taxol-bedingte Immunsuppression anhand von Aktivitätsbestimmungen der Raf-1/ERK- und JNKs/p38-MAPK-Signalwege. Hierbei beobachteten sie eine verminderte Aktivität der Raf-1-Kinase nach Taxol-Applikation, jedoch keinen Effekt des Taxols auf den ERKs-Phosphorylierungsstatus, was vermuten lässt, dass die Taxol vermittelte Immunmodulation keine Raf-1-induzierte ERKs-Phosphorylierung aufweist. Des weiteren konnte durch Taxol eine Herunterregulation der SAPK/JNKs-Aktivität aufgezeigt werden, die zuvor durch eine LPS-Bolusbehandlung der Milzlymphozyten angeregt werden konnte. Diese Ergebnisse demonstrierten somit erstmals einen Zusammenhang zwischen der Taxol-bedingten Immunsuppression und der Deaktivierung der Stress-aktivierten MAPKs-Signalvermittlung ¹⁰²⁴.

Chadebech et al. und *Nishio K. et al.* untersuchten die Hochregulierung der Cyclin B/p34cdc2-Kinase an NHIH-Ovarial-3- bzw. humanen Lungenkrebs-(PC-14) Zellen nach Taxolbehandlung. Die Mikrotubulizerstörung durch Taxol bedingte eine Inhibition der Proteosom-abhängigen Degradation des Cyclins B, was in einer anhaltenden Stabilisierung der dephosphorylierten Cyclin B/p34cdc2-Kinase resultierte. Sie zeigten des weiteren, dass die Deaktivierung dieser Kinase notwendig ist, damit Taxol eine gesteigerte Apoptoserate auslösen konnte. Gleichzeitig beobachtete man eine Verminderung der MAP Kinase, ein Substrat der Cyclin B/cdc2p34-Kinase. Die zusätzliche Gabe des Translationsgiftes Cycloheximid inhibierte wiederum die gesteigerte Aktivität der Cyclin B/cdc2p34-Kinase durch Taxol ^{1025,1026}.

Der Zusammenhang zwischen einer vermehrten Apoptoserate, bedingt durch Taxol, und der Aufhebung dieser Taxolwirkung durch den PKC-Aktivator

12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat (TPA) wurde von *Pae* und seinen Kollegen an humanen HL-60 Leukämie Zellen untersucht. Der antiapoptotische Effekt von TPA in Taxol-behandelten Zellen konnte in eine vermehrte Apoptoserate überführt werden, wenn man zusätzlich den PKC-Inhibitor Staurosporin verwendete¹⁰⁰⁶. Diese Ergebnisse deuteten somit auf eine spezifische PKC-Vermittlung der Taxolwirksamkeit. Jedoch betrachteten *Pae et al.* des weiteren auch den distalen Signalweg, vor allem den der ERKs-Kaskade. Nach TPA-Behandlung zeigte sich neben der PKC Aktivierung auch eine Aktivierung der MEK-1/2, einer vorgeschalteten Kinase der ERKs. Ein spezifischer Inhibitor der MEKs, PD98059 verhinderte die antiapoptotische TPA-Wirkung in den Taxol-behandelten Zellen. Somit konnte der Rückschluss gezogen werden, dass MEK ein Mediator des antiapoptotischen PKC-Signalweges darstellt und die Protektion gegen die Taxolbedingte Apoptoseinduktion nicht durch PKC-, sondern nur durch die gemeinsame PKC-ERK-Signalkaskade stattfindet.

Herdeg et al. beobachteten im Rahmen von Patientenstudien nach Stentimplantation eine verminderte Restenosebildung durch Taxol. Die Substanz bewirkte eine allgemeine Reduktion der Zellproliferation, Migration und Signaltransduktion des Gefäßendothels. *Herdeg et al.* betrachteten die Mikrotubulidepolymerisation als einen hochkomplizierten biologischen Prozess, der von der Aktivierung einer Vielzahl von Proteinkinasen abhängig ist. Sie behaupteten daher, dass die Inhibition der Depolymerisation durch Taxol somit auch mit einer Inhibition der Aktivitätszustände von verschiedensten Proteinkinasen gekoppelt ist¹⁰²⁷.

Auffällig war in klinischen Studien der Phase I, dass Taxol-behandelte Krebspatienten eine hohe Inzidenz an Herz-Kreislauf-Beschwerden aufwiesen^{1028,1029}. Noch während der infusierten Gabe von Taxol, (die im Abstand eines Zeitraumes von 21 Tagen für die Dauer von 9-12 Stunden je nach Wirksamkeit 3-5 x verabreicht wurde) konnten erste Symptome, wie infrequente Herzrhythmusstörungen, Sinusbradykardien, Thoraxschmerz, Atembeklemmung und Tachypnoe festgestellt werden¹⁰³⁰. Bei einem Drittel der mit Taxol medizierten Patienten manifestierten sich die anfänglichen Beschwerden und es wurden massive EKG-Veränderungen, wie Erhöhung des ST-Segmentes und eine Verbreiterung des QRS-Komplexes beobachtet. Wiederum bei fünf Prozent dieser Patienten konnten die Krankheitsbilder einer Myokarditis, Kardiomyopathie, myokardialen Infarzierung, eines intraventrikulären Linksschenkelblocks oder einer persistierenden Thrombozytopenie diagnostiziert werden⁹⁹⁹. Prädisponierende Faktoren im Zustandekommen dieser massiven Nebenwirkungen der Taxolbehandlung waren Hypokaliämie, Hypomagnesämie, kardiale

Risikopatienten und ein hohes Alter^{998,1031}. Der Tod trat bei ca. einem Prozent der Patienten durch akutes Herz-Kreislaufversagen ein. Aufgrund dieser schwerwiegenden Nebenwirkungen wurde die Krebsbehandlung mit Taxol bei Patienten mit bestehenden Beschwerden des Herz-Kreislaufsystems untersagt.

7. Die Rolle der SAPK/JNKs während Ischämie/Reperfusion und Prækonditionierung

Die JNKs gehören ebenfalls wie die p38-MAPKs zu den Stress-aktivierten Proteinkinase⁵⁵⁶. Diese Kinasefamilie wird durch ein breites Spektrum unterschiedlicher Stressfaktoren in ihrer Signaltransduktion angeschaltet. Der Ischämie- und Reperfusionstress gehört neben den Auswirkungen des osmotischen Schocks, der UV-Strahlen, mechanischer Zug- und Druckbelastungen sowie Temperaturschwankungen zu diesen Stressfaktoren. Der akut veränderte Aktivitätsstatus der SAPKs, bedingt durch diese Faktoren, war Anlass einer großen Anzahl von Studien, die sich mit diesen Kinasen in verschiedensten Organsystemen beschäftigten. Am Herzen befasste man sich vor allem mit dem pathologischen Zustand der Ischämie sowie ihrer Folgeerscheinung der Nekrose und Apoptose^{692,714,818,1032-1036}. Weitere Ansatzpunkte waren die Erkenntnisse der veränderten SAPK/JNKs-Aktivitätszustände im Zusammenhang der kardialen Hypertrophie und kardialer Kontraktilitätsstörungen¹⁰³⁷. Studien über subzelluläre Veränderungen während der Hypertrophie von Herzmuskelzellen sind wichtig für das Verständnis des Wachstums des Herzens, sowohl in der normalen Entwicklung, als auch in Zuständen adaptiver, kompensatorischer Reaktionen. Im Verlauf dieser Anpassungsreaktionen unterliegt der kontraktile Apparat der Kardiomyozyten *in vivo* und *in vitro* strukturellen Veränderungen aufgrund der Bildung zusätzlicher Sarkomere und teilweisem Abbau und Reorganisation der Myofibrillen. Beide Vorgänge sind maßgeblich durch die Signalvermittlung der SAPK/JNKs bedingt¹⁰³⁸.

Im Gegensatz zu den p38-MAPKs, die auch zur Familie der Stress-aktivierten Proteinkinase gehören, werden die JNKs nur moderat^{373,681} oder gar nicht^{949,955,976,981,994,1039-1041} während einer ischämischen Phase des Myokards aktiviert. Vielmehr ist ein deutlicher Aktivitätsanstieg dieser Kinasen nach einer Reperfusionsphase zu verzeichnen, die einem kurzen ischämischen Stimulus folgt. Eine Aktivierung der SAPK/JNKs durch Ischämie und Reperfusion zeigten *Knight et al.* an Langendorff-perfundierten Rattenherzen nach globaler Ischämie und folgender 60 minütiger Reperfusion. Sie demonstrierten, dass auch in diesem Modell nur durch Reperfusion eine Aktivierung der Kinasen hervorzurufen war. Sie

beobachteten, dass die Dauer der zuvor durchgeführten Ischämiephase die stattfindende Aktivitätssteigerung während der Reperfusion beeinflusste. Verkürzte man die Ischämie auf 2-10 min, so erlangten die SAPK/JNKs keine Aktivierung während der Reperfusion. Verlängerte man die Ischämiephase auf 15 min, so war ein Aktivitätsanstieg der Kinasen während der folgenden Reperfusion zu verzeichnen⁹⁶³. Auch andere Autoren demonstrierten die Aktivierung der SAPKs/JNKs durch Ischämie und Reperfusion¹⁰⁴². Zum einen war eine proximale Aktivierung der Raf-1-Kinase durch Ischämie notwendig^{947,948,1043}, um weiterleitend Aktivität der Kaskadenendkinase zu erreichen. Zum anderen wurden die Aktivitätsveränderungen der vorgeschalteten Kinasen MEKK-1 und SEK-1 untersucht und verschiedene Stimuli, wie PMA und Sorbitol ermöglichten die Abgrenzung zu den anderen MAP-Kinasen^{18,707,955}.

Untersuchungen von *Omura et al.* legten dar, dass die SAPK/JNKs in einem *in vivo*-Rattenmodell bereits während der 30-60 minütigen Okklusionsphase der Koronararterie einen Aktivitätsanstieg aufzeigten und nach 30 min Reperfusion noch eine zusätzliche Steigerung zu beobachten war⁹⁷⁸.

Es existieren nur wenige Anhaltspunkte über die funktionelle Rolle der JNKs im Phänomen der ischämischen Präkonditionierung. Durch den Mangel potenter und spezifischer Inhibitoren des JNKs-Kaskadenweges konnte bisher der eindeutige Beweis nicht erbracht werden, da die Aufhebung des protektiven Potenzials der Konditionierung durch einen JNKs-Inhibitor nicht durchzuführen war. Eine Vielzahl von Substanzen wurde in experimentellen Studien auf ihre JNKs-inhibierende Fähigkeit untersucht. Die Verwendung von Curcumin⁵⁸¹ und einem neu entdeckten D-JKNKI-1-Peptid, zeigten ebenfalls Kreuzreaktivität zur ERKs-Kaskade¹⁰⁴⁴⁻¹⁰⁴⁸. Studien des MPI demonstrierten an einer transgenen Mäuselinie der kardialen Überexprimierung des Zytokins MCP-1 (Monocyte-Chemoattractant-Protein-1), die Abhängigkeit des Konstrukts mit einer gesteigerten JNKs-Aktivität und folgender Reduktion der Infarktgröße nach Indexischämie¹⁰⁴⁹. Die Tiere entwickelten eine chronische Myokarditis mit nachfolgender dekompensierter Herzinsuffizienz, vergleichbar zu Humanpatienten mit dem Krankheitsbild der Myokarditis. Diese Erkenntnisse wurden durch die Arbeit von *Ping et al.* unterstützt. Die Gruppe zeigte an Kaninchen einen PKC- ϵ -abhängigen Stimulationsweg der JNKs im Verlauf eines IP-Zyklus. Sie differenzierten jedoch zwischen der JNK-1 und 2. Die Aktivierung der p46 JNK-2 erfolgte durch Ischämie, die der p54 JNK-1 nur durch die folgende Reperfusionsperiode. Auch die Isolierung der Kinasen differenzierte sich in zwei Zellkompartimente. Die JNK-1 konnte nur im Zytosol bestimmt werden, die JNK-2 dagegen nur in der nukleären Fraktion.

Der PKC-Inhibitor Chelerythrine erzielte eine komplette Aufhebung aller IP-bedingter Aktivitätsveränderungen der Kinasen ³⁷³.

In unserem dargestellten *in vivo*-Schweineversuchsmodell bewirkte eine alleinige Ischämie noch keine Aktivitätssteigerung der myokardialen SAPK/JNKs. Jedoch induzierte die folgende Reperfusionsperiode ein Aktivitätsmaximum der SAPKs ^{383,962,1050}. Auch konnte durch die Inhibition der Serin-Threonin-Phosphatase (PP-2a) mittels Okada-Säure eine indirekte Aktivierung der SAPK/JNKs erzielt werden und ihre Aktivität zum Zeitpunkt der Reperfusion potenziert werden. Ein Effekt der Okada-Säure auf die anderen Mitglieder der MAPKs (p38-MAPKs und ERKs) konnte nicht beobachtet werden, jedoch wurde die Infarktgröße signifikant um 30% verringert. Die essentielle Rolle der SAPKs in der Dezimierung der Infarktgröße und im Zustandekommen des myokardialen Schutzes der ischämischen Präkonditionierung wurde des weiteren durch die Applikation des Proteinsyntheseinhibitors Anisomycin und mittels des Mitosegiftes Taxol geprüft. Anisomycin, ein ähnlich starker Proteinsynthesehemmer und JNKs-Aktivator wie Cycloheximid, verursachte eine signifikante Infarktgrößenabnahme, Taxol dagegen steigerte die Infarktgröße deutlich. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen waren die Daten von *Cano et al.*, sie zeigten Aktivierung aller drei MAPKs durch den Wachstumsfaktor EGF, doch spezifische Stimulation der JNKs durch Anisomycin. Der Einsatz des Zytostatikums Rapamycin bewirkte Deaktivierung der durch Anisomycin aktivierten zytosolischen p70 Kinase, jedoch keinerlei Einfluss auf die JNKs ^{1051,1052}.

Andere Phosphataseinhibitoren, wie Calyculin A, Fostriecin und FK506 zeigten ebenfalls protektive Wirksamkeit an isolierten Kaninchenkardiomyozyten, indem die Infarktreaktion dem eines ischämischen Präkonditionierungsprotokolls gleichzusetzen war ^{384,385,1053,1054}.

8. Die Wirkung von Actinomycin-D

Actinomycin-D (Dactinomycin) ist ein Stoffwechselprodukt verschiedener *Streptomyces*-Bakterienstämme (*Streptomyces chrysomallus*, *Streptomyces antibioticus*) ¹⁰⁵⁵. Seine antibiotische und zytotoxische Wirkung begründet sich in der Einlagerung der Substanz zwischen zwei Guanin-Cytosin-Nukleotidbasenpaaren der DNA-Doppelhelix ¹⁰⁵⁶. Die im Kern befindliche doppelsträngige DNA enthält die genetische Information für alle Proteine. Bei der Transkription wird diese Information auf die einzelsträngige mRNA übertragen, welche anschließend in das Zytoplasma gelangt. Im Translationsschritt wird die Information der mRNA an den Ribosomen in Proteine umgesetzt

(Proteinbiosynthese). Actinomycin-D zählt neben Cycloheximid zu den bekanntesten Zellgiften¹⁰⁵⁷. Es wirkt als Transkriptioninhibitor, indem die DNA-abhängige Synthese der mRNA-Bildung blockiert wird. Cycloheximide blockieren dagegen die Translation der Proteine^{1058,1059}.

Die Ergebnisse der Actinomycin-D-Studie zeigten eine komplette Inhibition des kardioprotektiven Effekts der ischämischen Präkonditionierung, ohne die IP-bedingt gesteigerte Phosphorylierungsintensität der p38-MAPKs zu beeinflussen. Die Phosphorylierungsintensität der ERKs und SAPK/JNKs, die durch IP ebenfalls erhöht wurde, konnte durch Actinomycin-D vermindert werden, sodass für die folgende Indexischämie keine Protektion durch die aktivierten ERKs und SAPK/JNKs bestand. Actinomycin-D bewirkte des Weiteren durch die Applikation vor einer Indexischämiephase eine Infarktgrößenzunahme, ohne einen toxischen-Effekt des nicht-ischämischen Myokards auszulösen. Der Gesamtproteinlevel der untersuchten Proteine wurde durch eine Actinomycin-D-Behandlung nicht verändert. Auf der Ebene der Transkription war jedoch eine signifikante Inhibition der Phosphorylierungsintensität sowie des mRNA-Gehalts aller untersuchten MAPKs-Transkriptionsfaktoren festzustellen, womit die Einbeziehung eines nukleären Weges in die Signalvermittlung der ischämischen Präkonditionierung bewiesen werden konnte.

Dies bedeutet, dass ein Zusammenwirken verschiedenster Aktivierungs- und Deaktivierungszustände der drei MAPKs die Aufhebung der kardioprotektiven Wirksamkeit der ischämischen Präkonditionierung in der Actinomycin-D-Versuchsreihe bedingte. Spekulativ könnten hierbei ebenfalls Protein-Phosphatasen (MKP-1/2) eine Rolle spielen, da der direkte Kinasen-Angriff durch Actinomycin-D in der Literatur nicht bekannt ist. Bisher konnte ausschließlich die Aktivität von Proteinmodulen (SH2 und SH3) der MAPKs-Kaskade oder eines undefinierten Phosphatase-Inhibitors reduziert werden^{1060,1061}. Auch in anderen Zellkompartimenten bewirkte Actinomycin-D oftmals Signaltransduktionsblockade verschiedenster ERKs- und JNKs-Stimuli. In humanen Lungenzellen (A549) verhinderte der Einsatz von Actinomycin-D die durch Interleukin1- β gesteigerte COX-2 Aktivität und Prostaglandin-E2 Synthese¹⁰⁶². Peritoneale Mäusemakrophagen, die nach ERKs- und JNKs-Aktivierung durch PMA und Okada-Säure isoliert wurden, zeigten nach Actinomycin-D Behandlung einen Rückgang der Arachidonsäurefreisetzung¹⁰⁶³. Hierdurch konnte der Wirkmechanismus des Transkriptionsgiftes auch im Zytosol bestätigt und aufgrund seines Diffusionsweges zum Nukleus erklärt werden.

9. Die Rolle der MAPKs-spezifischen Transkriptionsfaktoren während Ischämie/Reperfusion und Präkonditionierung

Die Fähigkeit der MAPKs, bestimmte Transkriptionsfaktoren zu aktivieren, ist seit langem bekannt^{669,670,672,835,1064,1065}. Hierzu gehören die Faktoren ATF-2, Elk-1, c-Fos, c-Jun, MEF-2 und c-Myc^{642,835,1066,1067}. Ist eine MAP-Kinase aktiviert, leitet sie das Signal weiter, indem sie in der Zelle verschiedenartige Proteine, wie andere Proteinkinasen und genregulatorische Proteine, phosphoryliert. Eine Translokation der MAP-Kinase aus dem Zytosol in den Kern leitet die Phosphorylierung eines Transkriptionsfaktors ein, sodass sich dieser an die bestimmte Promotersequenz der DNA binden kann^{376,661,662,665,712,1068-1070}. Bereits innerhalb weniger Minuten nach der Stimulation einer Zelle, z.B. durch Wachstumsfaktoren, kann die Transkription bestimmter Gene, wie der sogenannten „*Immediate-Early-Genes*“, einsetzen. Dies stellt einen Grund dafür dar, dass in der dargestellten IP-Studie bereits Änderungen des mRNA-Levels der untersuchten Transkriptionsfaktoren nachzuweisen waren, jedoch keine Unterschiede ihres Proteingehalts. Die Zeitspanne von 40 min des IP-Zyklus war demzufolge für eine neue Proteintranslation nicht ausreichend⁶⁸². In den Western Blot Untersuchungen wurde die Gesamtproteinmenge der „alten“ präkonditionellen Transkriptionsfaktoren nachgewiesen. Daher konnten auch keine Unterschiede in den Proben des konditionierten gegenüber dem nicht-konditionierten Gewebe aufgezeigt werden.

Die Transkriptionsaktivierung dieser *Immediate-Early-Genes* ist von dem Proteinkomplex, gebildet aus *Serum-response* Faktor (SRF) und Elk-1 abhängig. Der Komplex ist ständig an eine bestimmte DNA-Sequenz (das *Serum-response-Element*) gebunden, die im Regulatorbereich mehrerer Gene liegt. Eines dieser Gene ist das *fos-Gen*^{679,836}. Zusätzlich können die MAP-Kinasen das Jun-Protein phosphorylieren, das zusammen mit dem neugebildeten Fos-Protein ein aktives genregulatorisches Protein, das AP-1 bildet. AP-1 wiederum schaltet weitere Gene an, seine genaue Funktion begründet sich wahrscheinlich in der Stimulation des Zellwachstums⁸¹⁰.

Viele Gene, die für Proteine aus den Signalkaskaden der Rezeptor-Tyrosinkinasen, bzw. der MAP-Kinasen kodieren, wurden ursprünglich als Onkogene in Krebszellen oder in tumorauslösenden Viren identifiziert. Hierbei übernimmt das Ras-Protein eine entscheidende Schaltstelle im intrazellulären Steuersystem der Signalvermittlung von mutierten Zellen, jedoch zählen auch Src, Raf, Fos und Jun zu diesen hyperaktiven Proteinen. Das Prinzip der Onkogeneklaration geht von der Bezeichnung der normalen *Proto-Onkogen* aus^{63,425,1071}. Beispielhaft kodiert das *v-src*-Onkogen für eine verkürzte Form des EGF-Rezeptors mit einer ständig

aktiven intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne. Zellen, die dieses Onkogen ausprägen, zeigen das Verhalten eines dauerhaft angeregten Teilungsvorganges durch den Wachstumsfaktor. Eine ähnliche Auswirkung zeigt das Ras-Onkogen, dessen abnormes Genprodukt nicht inaktiviert werden kann, da das veränderte Ras-Protein kein GTP mehr hydrolysieren kann. Zellen teilen sich ebenfalls abnorm, sofern sie ein Onkogen ausprägen, das für eine ständig aktive Form eines genregulatorischen Proteins wie Fos und Jun kodiert, welche normalerweise über Wachstumsfaktoren aktiviert werden^{57,410,813}. Die Untersuchungsergebnisse der Hauptschaltstellenproteine Ras und Raf der MAPKs-Kaskade mit signifikant gesteigerter Aktivität nach ischämischer Präkonditionierung untermauerte die Arbeitshypothese der Kaskaden-proximalen Startpunkte des MAPKs-Signaltransduktionswege im dargestellten *in vivo*-Modell.

Die Rolle der Proteinsynthese wurde während des Phänomens der Präkonditionierung sowohl mittels der Verwendung von Transkriptions- als auch Translationsinhibitoren untersucht. Weder die präkonditionelle Verabreichung des Translationsgiftes Cycloheximid, noch die Blockade der Transkription durch Actinomycin-D erzielte eine Aufhebung der IP im Kaninchen-Modell¹⁰⁷². Untersuchungen der Gruppe *Rowlands* zeigten dagegen die vollständige Blockade der Präkonditionierung durch Cycloheximid, jedoch nicht durch Actinomycin-D¹⁰⁷³. Übereinstimmend mit den Daten *Rowlands* wurden die Hypothese der translationellen Abhängigkeit der IP und die Unabhängigkeit von neuen Gentranskripten durch weitere Resultate unterstützt¹⁰⁷⁴. Gegensätzliches präsentierte die Gruppe um *Shing et al.*, die an Ratten sowohl durch Cycloheximid als auch Actinomycin-D eine deutliche Abschwächung des infarktreduzierenden Potenzials der „delayed“ IP erzielten¹⁰⁷⁵. Vergleichbar der SB203580-Studie zeigte sich auch in der Actinomycin-D-Studie der funktionelle Zusammenhang zwischen Applikationsdauer und Zeitintervall der folgenden ischämischen Phase. Aufklärend in dieser Hinsicht waren die Resultate *Leprans et al.*. Sie zeigten, dass die Infusion von Actinomycin-D 24 h vor Koronarer Okklusion einen deutlichen Rückgang ventrikulärer Arrhythmien bewirkte, dagegen die Applikation vier Stunden zuvor keinerlei Wirkung erzielte¹⁰⁷⁶. Auch in der hier dargestellten Studie wurde Actinomycin-D nicht nur vor der Okklusionsphase, sondern auch während der Reperforationsabschnitte des IP infundiert. Dies lässt die Vermutung zu, dass mindestens eine Reperforationsphase für die Wirksamkeit von Actinomycin-D essentiell ist.

10. Schlussfolgerung und Zukunftsperspektiven

Zusammenfassend zeigen die Resultate die gesicherte Beteiligung des ERKs- und JNKs-Signaltransduktionsweges am Zustandekommen der ischämischen Präkonditionierung sowie die mögliche Bedeutung eines nukleären Mechanismus des Phänomens. Die Inhibierung des ERKs-Signalweges durch UO126, der am letzten zytosolischen Phosphorylierungsschritt der Proteinkaskade erfolgte, sowie der Einsatz des Transkriptionsgiftes Actinomycin-D, bewiesen die Existenz eines nukleären, transkriptionellen Prozesses der IP. Inwieweit weitere zytosolische oder partikuläre Effektoren in die Signalvermittlung der ischämischen Präkonditionierung involviert sind, müssen folgende Untersuchungen zeigen. Dabei muss insbesondere die massenspektroskopische Analyse neu entdeckter Proteine erfolgen. Unabhängig davon zeigte die große Differenz in der diskutierten Literatur die Notwendigkeit einer strikten methodischen und speziebezogenen Trennung der Forschungsarbeiten. Dementsprechend sind eine Vielzahl weiterer Versuche notwendig, bevor ERKs- und JNKs-Aktivatoren bzw. p38-MAPKs-Inhibitoren zum klinischen Einsatz kommen werden.

Aus den hier vorliegenden Daten kann folgende neue Modellvorstellung der ischämischen Präkonditionierung formuliert werden:

Die Aktivitätssteigerungen der ERKs- und JNKs-Signalkaskade sind mit der Kardioprotektion der IP ursächlich verknüpft und eine Inhibition dieser Proteinkaskaden bewirkt eine vergrößerte Infarktentstehung.

Der Signalkaskadenweg der p38-MAPKs weist große Diskrepanzen zu den beiden anderen MAPKs auf. Die Bezeichnung des „death pathways“ der p38-Kinasenkaskade schildert die Korrelation zwischen p38-Aktivierung und Infarktgrößenzunahme.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Der Hintergrund der Arbeit war die Beobachtung der ischämischen Präkonditionierung (Ischämietoleranz) am Schweineherzen. Unter ischämischer Präkonditionierung (IP) versteht man das Phänomen der kardialen Konditionierung durch kurze vorgeschaltete Ischämie- und Reperfusionen gegenüber einer nachfolgenden längeranhaltenden Ischämie. Dabei verschiebt sich die Beziehung zwischen entstehender Infarktgröße (Ordinate) und Verschlusszeit (Abszisse) nach rechts. Die Erklärung für dieses Verhalten wurde in der vorliegenden Arbeit in der differentiellen Aktivierung der MAP-Kinasen gesucht. Dabei wurden vor allem drei Transduktionswege entdeckt, welche bei Ischämie und anschließender Reperfusion der linken absteigenden Koronararterie in dem minderdurchbluteten Myokardgewebe aktiviert werden. Es handelt sich um die extrazellulär-Signal-regulierten Proteinkinasen (ERKs), die Stress-aktivierten-c-Jun-NH₂-terminalen Proteinkinasen (SAPKs / JNKs) und die p38-MAPKs, die ebenfalls zur Familie der Stress-aktivierten Proteinkinasen gehören. Die Aktivitätssteigerung der ERKs und SAPKs/JNKs durch kurze Ischämie- bzw. Reperusionsphasen bewirkte einen Schutz des Myokards vor Infarktstehung ("survival pathway"). Der sogenannte "death-pathway" wurde über die p38-MAPKs aktiviert, d.h. sie erlangten ebenfalls Aktivitätssteigerung und bereits -maximum während einer Ischämieperiode, weitere wiederholende ischämische Zustände verringerten jedoch ihre Aktivität und ein folgender Reperusionszyklus erzielte bereits Aktivitätsverlust bis zum Basiswert. Ihr Aktivitätsanstieg bedeutete im Gegensatz zu dem von ERKs und SAPKs/JNKs signifikant höhere Infarktgrößen.

Die Auswirkungen der Blockade der Phosphorylierungskaskaden der MAPKs und deren Determinaten auf die Infarktgröße wurde mit Hilfe von spezifisch MAPKs-inhibierenden Substanzen untersucht.

Bestätigung der "in-vivo" erlangten Ergebnisse der Infarktstehung erhielten wir durch proteinbiochemische Untersuchungen von Myokardbiopaten. Hierbei wurde Gewebe zu verschiedenen Zeitpunkten der Ischämie und Reperfusion, mit und ohne Substanzapplikationen in Phosphorylierungs- und Aktivitätsbestimmungen untersucht.

Der Signalweg der ERKs wurde durch die experimentellen Substanzen PD98059 und UO126 spezifisch an zwei Stellen inhibiert.

Eine lokale intramyokardiale Verabreichung der PD- und UO Substanzen mittels einer Mikropumpe direkt in das zu erwartende ischämische Herzgewebe zeigte,

dass die Inhibierung eines Phosphorylierungsschrittes dieser Proteinkinasen eine Aufhebung der kardioprotektiven Wirkung eines vorgeschalteten IP-Zyklus bewirkte. Das heißt, in dem Diffusionsbereich der Substanzen entstanden keilförmige Infarkte, die von nicht-nekrotischem, geschütztem Gewebe umgeben waren. Kontrollversuche ohne Substanzapplikation oder die alleinige Infusion des Lösungsmittels der Substanzen verursachten keine Infarzierung des Herzmuskels. Ebenfalls ermöglichte uns dieses Infusionsverfahren die Verabreichung verschiedener Substanzkonzentrationen und die Erstellung von Dosis-Wirkungsprinzipien, die sich für die genannten Substanzen bei semilogarithmischem Maßstab in linearem Verlauf zeigten.

Wurde die Phosphorylierungskaskade der p38-MAPKs mit SB203580, einem Imidazolderivat, inhibiert, entstand ein signifikant verzögerter Infarkteintritt, ohne dass Auswirkungen auf das Zustandekommen der IP zu beobachten waren.

Die systemische und intramyokardiale Infusion von Taxol zeigte eine signifikant erhöhte Infarktgröße und eine vollständige Aufhebung der Kardioprotektion der IP. Dies wurde durch die Inhibition des SAPKs/JNKs-Signalweges verursacht.

Beide Applikationsarten des Transkriptionsgiftes Actinomycin-D erzielten eine Aufhebung des Schutzmechanismus von IP mit signifikant gesteigerten Infarktgrößen. Hierbei wurde die Phosphorylierungsintensität aller drei zytosolischen MAPKs inhibiert, jedoch konnte zusätzlich eine starke Verminderung des Phosphorylierungsstatus sowie des m-RNA-Levels der MAPKs-spezifischen Transkriptionsfaktoren c-Jun, Elk-1, c-Myc und ATF-2 festgestellt werden.

VII. SUMMARY

Stressful stimuli applied as brief pulse trains, condition most tissues in such a way, that they become more tolerant against longer lasting stresses, significantly delaying the onset of irreversible damage. This endogenous phenomenon, known as ischemic preconditioning (IP), renders the affected myocardium more resistant to a subsequent prolonged coronary occlusion by short transient periods of ischemia. The molecular mechanism of this increase in stress tolerance, especially that towards ischemia, is not entirely clear, but mitogen activated Proteinkinases (MAPKs), that are involved in the signal transduction pathways, may play a role. The MAPKs represent a superfamily of Pro-directed Ser/Thr Proteinkinases, that are involved in signal transduction from the plasma membrane to nuclear and cytoplasmic targets. Since the proto-oncogene based transcription factors are activated by membrane and cytoplasmic signalling cascades we studied the involvement of the three MAPKs pathways. The extracellular signal-regulated kinases: ERKs, the stress-activated/c-Jun N-terminal kinases: SAPKs/JNKs and p38-MAPKs. We found, that they react to brief ischemia and reperfusion in a very specific way. The ERKs activity moderately increased during brief ischemia but markedly during reperfusion, the SAPK/JNKs become active only during reperfusion and the weiß MAPKs were activated only during ischemia and deactivated during the following reperfusion and subsequent period of ischemia. Specific and selective activators and inhibitors have been used to differentiate between the three main MAP kinase pathways and to understand their role in IP. Our previous studies suggested a protective role of the ERKs and the SAPKs/JNKs cascade in the cardioprotective mechanism of IP.

To further test this hypothesis, we studied the influence of the novel specific inhibitors of ERKs, PD98059 and UO126, the SAPKs/JNKs inhibitor Taxol and the transcription inhibitor Actinomycin-D (Act-D) in IP. The substances were infused intramyocardially and with the exception of PD also systemically. The influence of the inhibitors on infarct size was measured after a period of index ischemia and reperfusion with or without infusion of these agents prior and during IP. Biopsies of the areas of drug infusion were taken after IP. By Western blot analysis the phosphorylation of MAPKs and of their down-stream transcription factors were measured and the activities of the MAPKs were tested by "in gel"-phosphorylation assays. Only small infarcts were detected in the control group animals with the IP period. Significant wedge-shaped infarcts were seen around the area of the microinfused tool drugs. The effects of the substances were concentration dependent. At the end of IP we observed in the PD and UO treated animals a significant decrease in phosphorylation and activities of ERKs. In Taxol treated

animals the phosphorylation of SAPKs/JNKs was inhibited and in the Act-D treated animals the phosphorylation state of all three cytosolic MAPKs was decreased. We demonstrated for the first time *in vivo* that the inhibition of ERKs and SAPKs/JNKs resulted in a complete cancellation of IP.

On the other hand, our results with the specific inhibitor of the p38-MAPK pathway, SB203580, have suggested a negative role of p38-MAPKs during ischemia in the same *in vivo* model. When SB203580 was infused systemically infarct size was significantly reduced. Ischemia with and without SB203580 significantly increased phospho-p38-MAPKs with a maximum reached at 20 min but activity was less at 30 and 45 min under the influence of the inhibitor. Measurements of p38-MAPK activities in situations where SB203580 was present during in-gel phosphorylation showed significant inhibition of p38-MAPK activities. We investigated also the effect of local and systemic infusion of SB203580 on the cardioprotection induced by IP. The infusions of SB203580 before and during IP protocol did not influence the infarct size reduction mediated by IP. The observed protection of the myocardium against ischemic damage by SB203580 points to the negative role of the p38-MAPKs pathway during ischemia. We hypothesised, that SB203580 can protect the heart against the consequences of prolonged ischemia.

A common feature of all MAPKs is their ability to phosphorylate the transactivation domain of numerous transcription factors and thereby modulate their transcriptional activities. The transcription factors Elk-1, ATF-2, c-Myc and c-Jun are substrates for the three distinct classes of MAPKs. To test the hypothesis that a nuclear mechanism is involved in IP we studied the influence of the inhibitors on the phosphorylation state of these transcription factors. The application of all tested tool drugs significantly inhibited the ischemia-induced phosphorylation of the nuclear transcription factors and in the case of Actinomycin-D also the m-RNA level of these transcription factors was decreased.

However, it cannot be excluded that MAPKs activations during IP and ischemia/reperfusion do have beside a nuclear mechanism, also important effects outside the nucleus.

VIII. ANHANG

1. Geräte und Instrumente

Agfa-400-Filme	Agfa, Frankfurt
autoradiografische Auswertung und die quantitative Analyse unter Anwendung des Phosphoimager ^{SF} Storm 860	Molecular Dynamics, Krefeld
Aortenklemme, gerieft-gezahnt und gebogen	Medicon, Tuttlingen
Beatmungsgerät (Stephan Respirator ABV)	F. Stephan GmbH, Gackebach
Bechergläser (10 ml, 50 ml und 100 ml)	Merck, Eurolab GmbH, Frankfurt
Biometra Agargel Maxi-/Mini-Kammer	Biomed Analytik, Göttingen
Blutgasmessgerät	Chiron Diagnostics, St. Leon-Rot
Canon-Spiegelreflexkamera	Canon GmbH, Frankfurt
Certomat Inkubationshaube	B Braun, Melsungen
Certomat R Tisch-Rundschüttler	B Braun, Melsungen
Corex® Glasröhrchen, 30 ml	DuPont de Nemours, Bad Homburg
Chirurgisches Operationsbesteck	Medicon, Tuttlingen
Defibrillator (Defi 503)	Bosch, Stuttgart
Einmalpipetten	Merck, Eurolab GmbH, Frankfurt
Elektrokauter (Electrosurgical Generator Force 2)	Valley Lab, Hamburg
Falcon-Röhrchen 2059	Becton-Dickinson, New Jersey
Gel-Elektrophorese-Apparatur GNA-200	Pharmacia, Freiburg
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Elektrophoreseapparatur	BioRad, München
Entwicklungsanlage	Medicine 260, Dürr-Med; Langen
Eppendorfröhrchen 1 ml und 2 ml	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Filmkassette (Dr. Goos suprema Spezial 200)	GLW Gesellschaft für Laborbedarf GmbH, Würzburg
Folie zum Einpacken der Membran (Saran-Dow-Folie)	Roth GmbH und Co KG
Gefäßkatheter mit Einführungsschleuse; Fr. 7	Vasurix, Guerber GmbH, Sulzbach / Ts.
Gelkammer	BioRad, München
Geltrockner	BioRad, München
Glashomogenisator	Merck, Eurolab GmbH, Frankfurt

Glasspritze	Hamilton,
Hybridisierungsöfen	Bachofer, Reutlingen
Hyperfilm (radioaktiv-sensitiv-e Filme)	Amersham Pharmacia biotech, Karlsruhe
IKA Temperierbad TE 2	Jauke & Kunkel, Staufen
IKA-Vibro-Fix VF 2 Vortexer	Jauke & Kunkel, Staufen
Intratrachealtubus der Größe 8	Rüsch AG, Kernen
Knochensäge, Knochenschere	Medicon, Tuttlingen
Kühlzentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
LKB Biochrom Spektralfotometer 4054	Pharmacia, Freiburg
Magnetrührgerät, (IKAMEG RET mit Heizplatte)	Biorad, München
Messer	Zwilling, Solingen
Micro-Amp Reaktionsgefäße; 0,2 ml	Perkin Elmer, Weiterstadt
Mikrofeinwaage	Sartorius, Göttingen
Mikrofilter Sterivex (0,45 µm und 0,22µm)	Millipore, Eschborn
Mikroinfusionspumpe (Minipuls 3)	Abimed-Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Mikrowelle	Panasonic, München
Perfusionsspritze	B Braun, Melsungen
Permahandseide, Perma-Handseide-Nadel-Fadenkombination	Ethicon GmbH, Norderstedt
Pipettenspitzen	Greiner-Labortechnik, Solingen
pH-Meter	Schott, Mainz
Phosphorimager™ SF	Molecular Dynamics
Perfusorgerät für 50 ml Infusionsspritzen	Fresenius, Bad Homburg
Power Supply ST 304	Gibco BRL Lifetechnologies, Eggenstein
Röhrchen mit Schraubverschluss (15 ml und 50 ml Falcons)	Greiner-Labortechnik, Solingen
Schere	Medicon, Tuttlingen
Spritzen (2 ml, 5 ml, 10 ml und 20 ml)	B Braun, Melsungen
Sterican-Einmal-Injektions-Kanülen der Größen: 120 x 40 mm=18 G x 1 1/2 und 0,90 x 40 mm=20 G x 1 1/2	B Braun, Melsungen
Statham-Blutdruckmessanlage (P23XL; Statham)	San Juan, Puerto Rico
Szintillations-Analyzer 1600 TR	Packard

Thermometer	Medicon, Tuttlingen
Thermoschüttler 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischwaage, digital	Mettler, Gießen
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Ultra-Turrox T 25 Mixstab	Jauke & Kunkel, Staufen
Ultraschall Sonifier Branson 250	Heinemann, Schwäbisch Gemünd
Ultrazentrifuge L8-80	Beckmann, München
Vortexer Reax 2000	Heidolph, Kehlheim
Waage	Sartorius, Göttingen
Wasseraufbereitungsanlage Milli RO 15	Millipore, Eschborn
Wasserbad mit Aufsatz R5	Julabco, Seelbach
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus-Instruments, Hanau
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge J 2-21	Beckmann, München
Zentrifugenröhrchen, 15 ml und 50 ml	Cellstar®, Greiner-Labortechnik, Frickenhausen
Zentrifugenrotor SW 50	Beckmann, München

2. Abkürzungsverzeichnis

∅	Durchmesser
(v/v)	(Volumen/Volumen), Volumenverhältnis zweier Flüssigkeiten
(w/v)	(Gewicht/Volumen), Konzentration eines gelösten Stoffes in einer Flüssigkeit
°C	Grad Celcius
μ	my, mikro- (10^{-6})
α	alpha
β	beta
γ	gamma
δ	delta
ε	epsilon
κ	kappa
λ	lamda
-/- Mäuse	“knock out” Mäuse
A	Ampère
Ak	Antikörper

AMP	Adenosin-monophosphat
AP-1	activator protein-1; Transkriptions-Faktoren-Komplex
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-triphosphat
ATF-2	activating transcription factor-2 (Transkriptionsfaktor der SAPK/JNKs)
B	Base
b	bovines Protein
BSA	bovines Serumalbumin
CDC42	Cell division cycle 42 (kleines G-Protein)
C-	Carboxyterminal
CRE	Cyclic AMP response element
CREB	Cyclic AMP response element-binding protein 2 = ATF-2
c-fos	cellular homologous to the Finkel-Biskis-Jinkins (FBJ) murine osteosarcoma virus oncogene
c-Jun	Zelluläres Homolog des Sarcoma Virus 17 Onkogens (cellular homolog of sarcoma virus 17 oncogene; Jun leitet sich von dem japanischen Wort 'ju-nana ab, welches die Nummer 17 bedeutet. Transkriptionsfaktor der JNK-Kaskade
c-myc	Cellular homolog of myelocytomatosis viral oncogene
cm	Zentimeter
d	desoxy-
Da	Dalton
ddH ₂ O	zweifach deionisiertes Wasser
dH ₂ O	einfach deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
Elk-1	Transkriptionsfaktor der ERKs; member of Ets oncogene family. v-Ets: avian erythroblastosis Virus E26 oncogene homologue 2
ERK-1/-2	extrazellulär-Signal-regulierte Proteinkinase 1 und 2 mit dem Molekulargewicht von p44 und p42 kDa
F	Faktor
FGF	fibroblast growth factor
g	Gramm

Grb-2	growth factor receptor bound protein 2 (Adaptorprotein der SH2 Domäne)
h	Stunde(n)
HBS	HEPES-gepufferte NaCl-Lösung
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
HSP	heat shock protein
I.E.	internationale Einheiten
IP	ischämische Präkonditionierung; ischemic preconditioning
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
Ig	Immunglobulin
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
JNK-1/2	c-Jun-NH ₂ -terminale Proteinkinase mit dem Molekulargewicht von p55 und p46 kDa.
k	kilo- (10 ³)
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KHB	Krebs-Henselleit-buffer
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid, Bakterienendotoxin
Lsg	Lösung
m	Meter
m	milli- (10 ⁻³)
M	molar (mol/l)
Mak	monoklonaler Antikörper
MAPKs	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MAPKKs	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen-Kinasen
MAPKKKs	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen-Kinasen-Kinase
MAPKAPK-2	MAPK-aktivierte Proteinkinase
MAD	MAX dimerization protein
MAX	Myc-associated factor X
MAZ	Myc-associated zinc finger protein
MEF-2	myocyte-specific enhancer factor 2
MEK	= MAPKK

MEKK	MEK Kinase
MKK	= MAPK
MEK	= MAPKK
MG	Molekulargewicht
min	Minute(n)
mol	Mol (Stoffmenge)
MNT	MAX-binding protein
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
M _r	relative Molekülmasse
n	nano- (10 ⁻⁹)
N-	Aminoterminal
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
OA	ocadaic acid; Okada Säure
p38-MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase mit einem Molekulargewicht von 38 kDa
p42/44 MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen mit einem Molekulargewicht von 42 und 44 kDa = ERK-2 und 1
p46/55 MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen mit einem Molekulargewicht von 46 und 55 kDa = JNK-2 und 1
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pak	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphatgepufferte NaCl-Lösung
PEG	Polyethylenglykol
pFA	para-Formaldehyd
PKC	Proteinkinase C
PKA	Proteinkinase A
PMA	Phorbol-myristat-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfofluorid
POD	Peroxidase
r-	Ribosomal
Raf	Murines Homolog des viralen Leukämie Onkogens
Ras	Rat sarcoma viral oncogene homologue
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur

ROS	Reactive oxygen species; Sauerstoffradikale
s	soluble, lösliches Protein
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
s.c.	subcutan
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SEK	Proximale Proteinkinase der SAPK/JNK
SEM	Standardfehler
Ser	Aminosäure Serin
SH	Src-homology domain
SOS-Protein	son of Sevenless, sevenless-Gen in der Fruchtfliege; m-SOS = mammalian-SOS
SRE	serum response element
SRF	human serum response factor
t	Zeit
TBS	Tris-gepufferte NaCl-Lösung
TCF	ternary complex factor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Thr	Aminosäure Threonin
TNF (α/β)	tumor necrosis factor, Tumor Nekrose Faktor α und β
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetat
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tyr	Aminosäure Thyrosin
TEY, TGY	TPY, Aminosäuresequenz der dualen Phosphorylierungsstellen, welche eine Aktivierungsreihenfolge der ERKs (Threonin-Glutaminsäure-Tyrosin), SAPK/JNKs (Threonin-Prolin-Tyrosin) und p38-MAPKs (Threonin-Glycin-Tyrosin) darstellt
TTC	Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid
U	Units, Einheiten
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

IX. LITERATURVERZEICHNIS

1. Schaper W. Molecular mechanisms in "stunned" myocardium. *Cardiovascular Drugs & Therapy*. 1991;5:925-32.
2. Schaper W. Pathophysiologie der Ischämie. In: Effert S, ed. *Der akute Myokardinfarkt*. Stuttgart-New York: Georg Thieme Verlag; 1991:23-28.
3. Schaper W. Der aktuelle Stand der experimentellen Herzinfarktforschung. *Z Kardiol*. 1990;79:811-818.
4. Statistisches-Bundesamt-Deutschland. Pressemitteilung der Todesursachenstatistik 2001 in Deutschland. 2001.
5. Schaper W. Ischemic preconditioning, remembrances of things past and future. *Basic Research in Cardiology*. 1996;91:8-11.
6. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74:1124-36.
7. Rohmann S, Braun E, Schott R, Jürgens S, Schaper W. Ischemic preconditioning reduces infarct size in pigs. *Z Kardiol*. 1989;78 (Suppl I):484 (abstr).
8. Schott RJ, Rohmann S, Braun ER, Schaper W. Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *Circulation Research*. 1990;66:1133-42.
9. Schaper W. β -blockade and acute experimental infarction. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1988;12 (Suppl 1):39-40.
10. Hirai S, Hamanaka Y, Miyazaki M, Kumagai H, Nakamae N. A case of saccular aneurysm of the coronary artery post PTCA. *Kyobu Geka*. 2000;53:457-9.
11. Miketic S, Carlsson J, Neuhaus KL, Bonzel T, Grube E, Tebbe U. Percutaneous transluminal coronary angioplasty of left main stenosis-results of the German PTCA registry. *Z Kardiol*. 2000;89:508-12.
12. Reinecke H, Roeder N, Schmid C, Fischer J, Scheld HH, Breithardt G, Kerber S. Outcome of women is impaired in patients undergoing emergency coronary artery bypass grafting for failed PTCA. *Z Kardiol*. 2001;90:729-36.
13. Taguchi H, Kawarabayashi T, Tanaka A, Nishida Y, Sakamoto T, Tahara A, Shimada K, Yoshikawa J. Efficacy and safety of PTCA using brachial approach and low-dose heparin. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2001;54:165-8.
14. Schaper W. Is it possible to reduce infarct size? *J Mol Cell Cardiol*. 1987;19 (Suppl III):247 (abstr).
15. Schaper W. Gefäßverschluß und Herzinfarkt. *Z Kardiol*. 1993;82 (Suppl 2):109-111.
16. Schaper W. Ischämie und Herzinfarkt, pathophysiologische Grundlagen. In: Schaefer H, Jentsch G, Huber E, Wegener B, eds. *Herzinfarkt - Report 2000*. München Jena: Urban & Fischer; 2000:101-110.
17. Szmagala P, Morawski W, Krejca M, Gburek T, Bochenek A. Evaluation of perioperative myocardial tissue damage in ischemically preconditioned human heart during aorto coronary bypass surgery. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 1998;39:791-5.
18. Bogoyevitch MA. Signalling via stress-activated mitogen-activated Protein kinases in the cardiovascular system. *Cardiovascular Research*. 2000;45:826-42.
19. Aharonovitz O, Aboulafia-Etzion S, Leor J, Battler A, Granot Y. Stimulation of 42/44 kDa mitogen-activated Protein kinases by arginine vasopressin in rat cardiomyocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1998;1401:105-11.

20. Fischer TA, Singh K, O'Hara DS, Kaye DM, Kelly RA. Role of AT1 and AT2 receptors in regulation of MAPKs and MKP-1 by ANG II in adult cardiac myocytes. *Am J Physiol.* 1998;275:H906-16.
21. Cook SA, Sugden PH, Clerk A. Activation of c-Jun N-terminal kinases and p38-mitogen-activated Protein kinases in human heart failure secondary to ischaemic heart disease. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology.* 1999;31:1429-34.
22. Schweins T, Langen R, Warshel A. Why have mutagenesis studies not located the general base in ras p21. *Nat Struct Biol.* 1994;1:476-84.
23. Fridman M, Tikoo A, Varga M, Murphy A, Nur EKMS, Maruta H. The minimal fragments of c-Raf-1 and NF1 that can suppress v-Ha-Ras- induced malignant phenotype. *J Biol Chem.* 1994;269:30105-8.
24. Beck WT, Mo YY, Bhat UG. Cytotoxic signalling by inhibitors of DNA topoisomerase II. *Biochem Soc Trans.* 2001;29:702-3.
25. Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Khwaja A, Marte BM, Pappin D, Das P, Waterfield MD, Ridley A, Downward J. Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell.* 1997;89:457-67.
26. Gibbs JB, Oliff A, Kohl NE. Farnesyltransferase inhibitors: Ras research yields a potential cancer therapeutic. *Cell.* 1994;77:175-8.
27. Sassone-Corsi P, Mizzen CA, Cheung P, Crosio C, Monaco L, Jacquot S, Hanauer A, Allis CD. Requirement of Rsk-2 for epidermal growth factor-activated phosphorylation of histone H3. *Science.* 1999;285:886-91.
28. Merienne K, Jacquot S, Pannetier S, Zeniou M, Bankier A, Gecz J, Mandel JL, Mulley J, Sassone-Corsi P, Hanauer A. A missense mutation in RPS6KA3 (RSK2) responsible for non-specific mental retardation. *Nat Genet.* 1999;22:13-4.
29. Biancalana V, Briard ML, David A, Gilgenkrantz S, Kaplan J, Mathieu M, Piussan C, Poncin J, Schinzel A, Oudet C, et al. Confirmation and refinement of the genetic localization of the Coffin-Lowry syndrome locus in Xp22.1-p22.2. *Am J Hum Genet.* 1992;50:981-7.
30. Biancalana V, Trivier E, Weber C, Weissenbach J, Rowe PS, O'Riordan JL, Partington MW, Heyberger S, Oudet C, Hanauer A. Construction of a high-resolution linkage map for Xp22.1-p22.2 and refinement of the genetic localization of the Coffin-Lowry syndrome gene. *Genomics.* 1994;22:617-25.
31. Abidi F, Jacquot S, Lassiter C, Trivier E, Hanauer A, Schwartz CE. Novel mutations in Rsk-2, the gene for Coffin-Lowry syndrome (CLS). *Eur J Hum Genet.* 1999;7:20-6.
32. Trivier E, De Cesare D, Jacquot S, Pannetier S, Zackai E, Young I, Mandel JL, Sassone-Corsi P, Hanauer A. Mutations in the kinase Rsk-2 associated with Coffin-Lowry syndrome. *Nature.* 1996;384:567-70.
33. Marr C. *Cardiology of the horse*: W.B. Saunders; 1999.
34. Keene BW, Hamlin R. *Small Animal Cardiology*: W.B. Saunders; 2002.
35. Abbott J. *Small Animal Cardiology Secrets*: Mosby; 2000.
36. Fox PR, Sisson D, Moise NS. *Canine and Feline Cardiology; Principles and Clinical Practice*: Churchill Livingstone; 1999.
37. Plonait H, Bickhardt K. *Lehrbuch der Schweinekrankheiten.* Parey-Verlag. 1997;Blackwell-Wissenschaftsverlag:XXII, 600 S.
38. Nickel R, Schummer A, Seiferle E. *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Band III; Kreislaufsystem, Haut und Hautorgane.* 1996;3. überarb. Aufl.

39. Doerr W. Ueber die Anwendung des Reduktionsindicators Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) in Histologie und Histophysiologie. *Frankfurter Zeitschrift fuer Pathologie*. 1950;61:557-573.
40. Sandritter W, Jestaedt R. Triphenyltetrazolium chlorid (TTC) als Reduktionsindikator zur makroskopischen Diagnose des frischen Herzinfarktes. *Verl Dtsch Ges Pathol*. 1958;41:165-171.
41. Altman FP. Tetrazolium salts: a consumer's guide. *Histochem J*. 1976;8:471-85.
42. Altman FP. The quantification of formazans in tissue sections by microdensitometry. I. The use of neotetrazolium chloride. *Histochem J*. 1976;8:373-81.
43. Fishbein MC, Meerbaum S, Rit J, Lando U, Kanmatsuse K, Mercier JC, Cordier E, Ganz W. Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique. *Am Heart J*. 1981;101:593-600.
44. Klein HH, Puschmann S, Schaper J, Schaper W. The mechanism of the tetrazolium reaction in identifying experimental myocardial infarction. *Virchows Arch (Pathol Anat)*. 1981;393:287-297.
45. Klein HH, Schaper J, Puschmann S, Kreuzer H, Schaper W. Study on the mechanism of tetrazolium salts in identifying experimental myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 1981;13 (Suppl 1):44 (abstr).
46. Ito WD, Schaarschmidt S, Klask R, Hansen S, Schäfer HJ, Mathey D, Bhakdi S. Infarct size measurement by Triphenyltetrazolium Chloride staining versus in vivo injection of Propidium Iodide. *J Moll Cell Cardiol*. 1997;29:2169-2175.
47. Oktay MH, Mariotti A, Giancotti FG. Assays for kinase activity. *Methods Mol Biol*. 1999;129:51-61.
48. Towbin H, Staehlin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid-gels on nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci*. 1975;76:4350-4354.
49. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-685.
50. Noble RL. The development of resistance by rats and guinea pigs to amounts of trauma usally fatal. *Am J Physiol*. 1943;138:346.
51. Strasser R, Arras M, Vogt A, Elsässer A, Schwarz ER, Schlepper M, Schaper W. Preconditioning of procine myocardium: How much ischemia is required for induction? What is duration? Is a renewal of effect possible? *Circulation*. 1994;90:I-109.
52. Cohen MV, Yang X, Downey JM. Conscious rabbits become tolerant to multiple episodes of ischemic peconditioning. *Circ Res*. 1994;74:998-004.
53. Miura T, gawa T, Iwamoto T, Tsuchida A, Jimura O. Infarct size limiting effect of preconditioning: Its duration and "dose-response" reationship. *Circulation*. 1990;82:III-271.
54. Van Winkle DM, Chien GL, Wolff RA, Soifer BE, Kuzume K, Davis RF. Cardioprotection provided by adenosine by blockade of the K-ATP channel. *Am J Physiol*. 1994;266:H829-H839.
55. Nao BS, McClanahann TB, Groh MA, Schott RJ, K. G. The time limit of effective preconditioning in dogs. *Circulation*. 1990;82:III-271.
56. Ovize M, Przyklenk K, Hale SL, Kloner RA. Preconditioning does not attenuate myocardial stunning. *Circulation*. 1992;85:2247-2254.

57. Brand T, Sharma H, Fleischmann K, Duncker D, McFalls E, Verdouw P, Schaper W. Proto-oncogene expression in porcine myocardium subjected to ischemia and reperfusion. *Circ Res.* 1992;71:1351-60.
58. Kluge A, Zimmermann R, Munkel B, Mohri M, Sack S, Schaper J, Schaper W. Insulin-like growth factor I is involved in inflammation linked angiogenic processes after microembolisation in porcine heart. *Cardiovascular Research.* 1995;29:407-15.
59. Andres J, Sharma HS, noell R, Stahl J, Sassen LMA, Verdouw PD, Schaper W. Expression of heat shock proteins in the normal and stunned porcine myocardium. *Cardiovasc Res.* 1993;27:1421-1429.
60. Frass O, Sharma HS, Knoell R, Duncker BJ, McFalls EO, Verdouw PD, Schaper W. Enhanced gene expression of calcium regulatory proteins in stunned porcine myocardium. *Cardiovasc Res.* 1993;27:2037-2043.
61. Kilian SA, Strohm C, Schaper W. Ischemic preconditioning (IP) is not inhibited by all K-ATP-channel blockers. In: *J Mol Cell Cardiol*; 1999:Fr74 (abstr).
62. Htun P, Barancik M, Maeno Y, Zimmermann R, Schaper W. Stimulation of stress activated Proteinkinases by anisomycin protects ischemic myocardium. In: *Circulation*; 1997:1399 (abstr).
63. Htun P, Barancik M, Schaper W. Brief ischemia/reperfusion activates transcellular signaling cascades and leads to proto-oncogene expression and growth factor production. In: Abiko Y, Karmazyn M, eds. *Protection Against Ischemia / Reperfusion Damage of the Heart.* Tokyo: Springer; 1998:179-192.
64. Htun P, Ito WD, Hoefler IE, Schaper J, Schaper W. Intramyocardial infusion of FGF-1 mimics ischemic preconditioning in pig myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 1998;30:867-877.
65. Htun P, Schaper W. Brief ischemia-reperfusion activates transcellular signalling cascades and leads to protooncogene expression and growth factor production. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29 (7):S-12 (abstr).
66. Bolli R. The early and late phases of preconditioning against myocardial stunning and the essential role of oxyradicals in the late phase: an overview. *Basic Res Cardiol.* 1996;91:57-63.
67. Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, Fuji H, Oe H, Hori M, Kamada T, Tada M. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res.* 1993;72:1293-9.
68. Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation.* 1993;88:1264-72.
69. Qiu Y, Ping P, Tang XL, Manchikalapudi S, Rizvi A, Zhang J, Takano H, Wu WJ, Teschner S, Bolli R. Direct evidence that Proteinkinase C plays an essential role in the development of late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits and that epsilon is the isoform involved. *Journal of Clinical Investigation.* 1998;101:2182-98.
70. Takano H, Tang XL, Bolli R. Differential role of K(ATP) channels in late preconditioning against myocardial stunning and infarction in pig. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279:H2350-9.
71. Takano H, Tang XL, Kodani E, Bolli R. Late preconditioning enhances recovery of myocardial function after infarction in swine myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279:H2372-81.

72. Henrichs KJ, Matsuoka H, Schaper J. Influence of repetitive coronary occlusions on myocardial adenine nucleosides, high energy phosphates and ultrastructure. *Basic Res Cardiol.* 1987;82:557-65.
73. Murry CE, Richard VJ, Reimer KA, Jennings RB. Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during a sustained ischemic episode. *Circulation Research.* 1990;66:913-31.
74. Yellon DM, Baxter GF, Garcia-Dorado D, Heusch G, Sumeray MS. Ischaemic preconditioning: present position and future directions. *Cardiovasc Res.* 1998;37:21-33.
75. Yamashita N, Hoshida S, Taniguchi N, Kuzuya T, Hori M. Whole-body hyperthermia provides biphasic cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in the rat. *Circulation.* 1998;98:1414-21.
76. Yamashita N, Hoshida S, Otsu K, Taniguchi N, Kuzuya T, Hori M. Involvement of cytokines in the mechanism of whole-body hyperthermia-induced cardioprotection. *Circulation.* 2000;102:452-7.
77. Vegh A, Szekeres L, Parratt JR. Transient ischaemia induced by rapid cardiac pacing results in myocardial preconditioning. *Cardiovasc Res.* 1991;25:1051-3.
78. Vegh A, Papp JG, Szekeres L, Parratt J. The local intracoronary administration of methylene blue prevents the pronounced antiarrhythmic effect of ischaemic preconditioning. *British Journal of Pharmacology.* 1992;107:910-1.
79. Vegh A, Komori S, Szekeres L, Parratt JR. Antiarrhythmic effects of preconditioning in anaesthetised dogs and rats. *Cardiovasc Res.* 1992;26:487-495.
80. Maulik N, Watanabe M, Engelman D, Engelman RM, Kagan VE, Kisin E, Tyurin V, Cordis GA, Das DK. Myocardial adaptation to ischemia by oxidative stress induced by endotoxin. *American Journal of Physiology.* 1995;269:C907-16.
81. Maulik N, Watanabe M, Engelman DT, Engelman RM, Das DK. Oxidative stress adaptation improves postischemic ventricular recovery. *Molecular & Cellular Biochemistry.* 1995;144:67-74.
82. Ovize M, Kloner RA, Przyklenk K. Stretch preconditions canine myocardium. *American Journal of Physiology.* 1994;266:H137-46.
83. Ovize M, Aupetit JF, Rioufol G, Loufoua J, Andre-Fouet X, Minaire Y, Faucon G. Preconditioning reduces infarct size but accelerates time to ventricular fibrillation in ischemic pig heart. *American Journal of Physiology.* 1995;269:H72-9.
84. Brown JM, Grobo MA, Terada LS, Whitman GJ, Banerjee A, White CW, Harken AH, Repine JE. Endotoxin pretreatment increases endogenous myocardial catalase activity and decreases ischemia-reperfusion injury of isolated rat hearts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:2516-20.
85. Auchampach JA, Bolli R. Adenosine receptor subtypes in the heart: therapeutic opportunities and challenges. *Am J Physiol.* 1999;276:H1113-6.
86. Auchampach JA, Groß GJ. Adenosine-A1 receptors, K⁺ATP-channels and ischemic preconditioning in dogs. *Am J Physiol.* 1993:H887-H1336.
87. Baxter GF, marber MS, Patel VC, Yellon DM. Adenosine receptor involvement in a delayed phase of protection 24 hours following ischemic preconditioning. *Circulation.* 1994;90:2993.
88. Baxter GF, Yellon DM. Time course of delayed myocardial protection after transient adenosine A1-receptor activation in the rabbit. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1997;29:631-8.

89. Dana A, Jonassen AK, Yamashita N, Yellon DM. Adenosine A(1) receptor activation induces delayed preconditioning in rats mediated by manganese superoxide dismutase. *Circulation*. 2000;101:2841-8.
90. Dana A, Baxter GF, Walker JM, Yellon DM. Prolonging the delayed phase of myocardial protection: repetitive adenosine A1 receptor activation maintains rabbit myocardium in a preconditioned state. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31:1142-9.
91. Bell SP, Sack MN, Patel A, Opie LH, Yellon DM. Delta opioid receptor stimulation mimics ischemic preconditioning in human heart muscle. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36:2296-302.
92. Fryer RM, Wang Y, Hsu AK, Groß GJ. Essential activation of PKC-delta in opioid-initiated cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H1346-53.
93. Fryer RM, Pratt PF, Hsu AK, Groß GJ. Differential activation of extracellular signal regulated kinase isoforms in preconditioning and opioid-induced cardioprotection. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;296:642-649.
94. Fryer RM, Hsu AK, Groß GJ. ERK and p38 MAP kinase activation are components of opioid-induced delayed cardioprotection. *Basic Res Cardiol*. 2001;96:136-142.
95. Huh J, Groß GJ, Nagase H, Liang BT. Protection of cardiac myocytes via delta(1)-opioid receptors, Protein kinase C, and mitochondrial K(ATP) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H377-83.
96. Schulz R, Gres P, Heusch G. Role of endogenous opioids in ischemic preconditioning but not in short-term hibernation in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H2175-81.
97. Maulik N, Engelman DT, Watanabe M, Engelman RM, Maulik G, Cordis GA, Das DK. Nitric oxide signaling in ischemic heart. *Cardiovas Res*. 1995;30:593-601.
98. Das DK, Maulik N, Sato M, Ray PS. Reactive oxygen species function as second messenger during ischemic preconditioning of heart. *Mol Cell Biochem*. 1999;196:59-67.
99. Bolli R. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33:1897-918.
100. Bolli R, Dawn B, Tang XL, Qiu Y, Ping P, Xuan YT, Jones WK, Takano H, Guo Y, Zhang J. The nitric oxide hypothesis of late preconditioning. *Basic Res Cardiol*. 1998;93:325-38.
101. Miller MJ. Preconditioning for cardioprotection against ischemia reperfusion injury: the roles of nitric oxide, reactive oxygen species, heat shock proteins, reactive hyperemia and antioxidants--a mini review. *Can J Cardiol*. 2001;17:1075-82.
102. Rakhit RD, Edwards RJ, Marber MS. Nitric oxide, nitrates and ischaemic preconditioning. *Cardiovasc Res*. 1999;43:621-7.
103. Rakhit RD, Edwards RJ, Mockridge JW, Baydoun AR, Wyatt AW, Mann GE, Marber MS. Nitric oxide-induced cardioprotection in cultured rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278:H1211-7.
104. Shah AM, Vallance P, Harrison D. NO in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*. 1999;43:507-8.
105. Domenech R, Macho P. Non-ischemic myocardial preconditioning. *Mol Cell Biochem*. 1998;186:201-3.
106. Shinmura K, Tang XL, Wang Y, Xuan YT, Liu SQ, Takano H, Bhatnagar A, Bolli R. Cyclooxygenase-2 mediates the cardioprotective effects of the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:10197-202.

107. Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:7240-4.
108. Srivastava S, Chandra A, Wang LF, Seifert WE, Jr., DaGue BB, Ansari NH, Srivastava SK, Bhatnagar A. Metabolism of the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-trans-2-nonenal, in isolated perfused rat heart. *J Biol Chem*. 1998;273:10893-900.
109. Yamashita N, Hoshida S, Otsu K, Asahi M, Kuzuya T, Hori M. Exercise provides direct biphasic cardioprotection via manganese superoxide dismutase activation. *J Exp Med*. 1999;189:1699-706.
110. Yamashita N, Nishida M, Hoshida S, Kuzuya T, Hori M, Taniguchi N, Kamada T, Tada M. Induction of manganese superoxide dismutase in rat cardiac myocytes increases tolerance to hypoxia 24 hours after preconditioning. *J Clin Invest*. 1994;94:2193-9.
111. Maulik N, Engelman RM, Wei Z, Lu D, Rousou JA, Das DK. Interleukin-1 alpha preconditioning reduces myocardial ischemia reperfusion injury. *Circulation*. 1993;88:II387-94.
112. Baxter GF. Ischaemic preconditioning of myocardium. *Ann Med*. 1997;29:345-52.
113. Bolli R. The late phase of preconditioning. *Circ Res*. 2000;87:972-83.
114. Piper HM, Ladilov YV. Ischemic preconditioning on the cellular level. *Basic Res Cardiol*. 1997;92:32-3.
115. Przyklenk K, Kloner RA. Ischemic preconditioning: exploring the paradox. *Prog Cardiovasc Dis*. 1998;40:517-47.
116. Kloner RA, Yellon D. Does ischemic preconditioning occur in patients? *J Am Coll Cardiol*. 1994;24:1133-42.
117. Liu Y, Downey JM. Ischemic preconditioning protects against infarction in rat heart. *Am J Physiol*. 1992;263:H1107-12.
118. Van Winkle DM, Chien GL, Davis RF. Myocardial ischemic preconditioning. *Adv Pharmacol*. 1994;31:99-108.
119. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. New insights into potential mechanisms of ischemic preconditioning. *Circulation*. 1991;84:442-5.
120. Xi L, Hess ML, Kukreja RC. Ischemic preconditioning in isolated perfused mouse heart: reduction in infarct size without improvement of post-ischemic ventricular function. *Mol Cell Biochem*. 1998;186:69-77.
121. Miller DL, Van Winkle DM. Ischemic preconditioning limits infarct size following regional ischemia-reperfusion in in situ mouse hearts. *Cardiovasc Res*. 1999;42:680-4.
122. Karliner JS, Honbo N, Epstein CJ, Xian M, Lau YF, Gray MO. Neonatal mouse cardiac myocytes exhibit cardioprotection induced by hypoxic and pharmacologic preconditioning and by transgenic overexpression of human Cu/Zn superoxide dismutase. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32:1779-86.
123. Guo Y, Wu WJ, Qiu Y, Tang XL, Yang Z, Bolli R. Demonstration of an early and a late phase of ischemic preconditioning in mice. *Am J Physiol*. 1998;275:H1375-87.
124. Kitagawa K, Matsumoto M, Mabuchi T, Yagita Y, Mandai K, Matsushita K, Hori M, Yanagihara T. Ischemic tolerance in hippocampal CA1 neurons studied using contralateral controls. *Neuroscience*. 1997;81:989-98.
125. Deplanque D, Bordet R. Pharmacological preconditioning with lipopolysaccharide in the brain. *Stroke*. 2000;31:1465-6.

126. Hardy KJ, McClure DN, Subwongcharoen S. Ischaemic preconditioning of the liver: a preliminary study. *Aust N Z J Surg*. 1996;66:707-10.
127. Zhang Y, Zhang B, Pan R. Protective effect of ischemic preconditioning on liver. *Chin J Traumatol*. 2001;4:123-5.
128. Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg*. 2001;181:160-6.
129. Schulz R, Walz MK, Behrends M, Neumann T, Gerken G, Heusch G. Minimal protection of the liver by ischemic preconditioning in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H198-207.
130. Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel MA, Duncker DJ, Verdouw PD. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation*. 1996;94:2193-200.
131. Riera M, Herrero I, Torras J, Cruzado JM, Fatjo M, Lloberas N, Alsina J, Grinyo JM. Ischemic preconditioning improves postischemic acute renal failure. *Transplant Proc*. 1999;31:2346-7.
132. Behrends M, Walz MK, Kribben A, Neumann T, Helmchen U, Philipp T, Schulz R, Heusch G. No protection of the porcine kidney by ischaemic preconditioning. *Exp Physiol*. 2000;85:819-27.
133. Konturek SJ, Brzozowski T, Pajdo R, Konturek PC, Kwiecien S, Sliwowski Z, Pawlik M, Ptak A, Drozdowicz D, Hahn EG. Gastric preconditioning induced by short ischemia: the role of prostaglandins, nitric oxide and adenosine. *Med Sci Monit*. 2001;7:610-21.
134. Pajdo R, Brzozowski T, Konturek PC, Kwiecien S, Konturek SJ, Sliwowski Z, Pawlik M, Ptak A, Drozdowicz D, Hahn EG. Ischemic preconditioning, the most effective gastroprotective intervention: involvement of prostaglandins, nitric oxide, adenosine and sensory nerves. *Eur J Pharmacol*. 2001;427:263-76.
135. Mounsey RA, Pang CY, Boyd JB, Forrest C. Augmentation of skeletal muscle survival in the latissimus dorsi porcine model using acute ischemic preconditioning. *J Otolaryngol*. 1992;21:315-20.
136. Mounsey RA, Pang CY, Forrest C. Preconditioning: a new technique for improved muscle flap survival. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1992;107:549-52.
137. Wang WZ, Guo SZ, Anderson GL, Miller FN. The initiating factors of late preconditioning in skeletal muscle. *J Surg Res*. 2001;99:92-9.
138. Janoff A. Alterations in lysosomes (intracellular enzymes) during shock: Effects of preconditioning (tolerance) and protective drugs. *Int Anesth Clin*. 1964;2:251.
139. Andreotti F, Pasceri V, Hackett DR, Davies GJ, Haider AW, Maseri A. Preinfarction angina as a predictor of more rapid coronary thrombolysis in patients with acute myocardial infarction. *N. Engl. J. Med*. 1996;334:7.
140. Dana A, Yellon DM. Angina: who needs it? Cardioprotection in the preconditioning era. *Cardiovascular Drugs & Therapy*. 1998;12:515-28.
141. Ottani F, Galvani M, Ferrini D, Sorbello F, Limonetti P, Pantoli D, Rusticali F. Prodromal Angina limits infarct size. *Circulation*. 1995;91:291.
142. Tomai F, Crea F, Chiariello L, Gioffre PA. Ischemic preconditioning in humans: models, mediators, and clinical relevance. *Circulation*. 1999;100:559-63.
143. Kloner RA, Shook T. Previous angina alters in-hospital outcome in TIMI-4: A clinical correlate to preconditioning. *Circulation*. 1995;91:37.
144. Yellon DM, Alkhalafi A, Pugsley WB. Preconditioning the human myocardium. *Lancet*. 1993;342:276.

145. Deindl E, Schaper W. Gene expression after short periods of coronary occlusion. *Mol Cell Biochem.* 1998;186:43-51.
146. Deindl E, Zimmermann R, Schaper W. Gene expression in the preconditioned heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;S7 (abstr A3).
147. Deindl E, Zimmermann R, Schaper W. Expression of the IGF system in acute and chronic ischemia. In: Doevendans AFM, van Bilsen M, Reneman RS, eds. *Cardiovascular Specific Gene Expression.* Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers; 1999:245-252.
148. Kluge A, Zimmermann R, Munkel B, Verdouw PD, Schaper J, Schaper W. Insuline liek growth factor II is an experimental stress inducible gene in a porcine model of brief coronary occlusions. *Cardiovasc Res.* 1995;29:708-716.
149. Steenbergen C, Fralix T, Murphy E. Role of increased cytosolic calcium concentration in myocardial ischemic injury. *Basic Res. Cardiol.* 1993;88:456.
150. Meldrum DR, Cleveland JC, Sheridan BC, Rowland RT, Banerjee A, Harken AH. Cardiac surgical implications of calcium dyshomeostasis in the heart. *Ann. Thorac. Surg.* 1996;61:1273.
151. Meldrum DR, Cleveland JC, Sheridan BC, Rowland RT, Banerjee A, Harken AH. Cardiac preconditioning with calcium: Clinically accessible myocardial protection. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1996;112:778.
152. Lee JA, Allen DG. Mechanisms of acute ischemic contractile failure of the heart: role of intracellular calcium. *J Clin Invest.* 1991;88:361-367.
153. Cleveland JC, Jr., Meldrum DR, Rowland RT, Banerjee A, Harken AH. Adenosine preconditioning of human myocardium is dependent upon the ATP- sensitive K⁺ channel. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29:175-82.
154. Geshi E, Ishioka H, Nomizo A, Nakatani M, Katagiri T. Biochemical and ultrastructural evaluations of the effect of ischemic preconditioning on ischemic myocardial injury - role of the adenosine triphosphate-sensitive potassium channel (Article). *Japanese Circulation Journal -English Edition.* 1998;62(N12):915-924.
155. Groß GJ, Auchampach JA. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res.* 1992;70:223-233.
156. Grover GJ, Sefl PG, Dzwonczyk S. Role of myocardial ATP-sensitive potassium channels in mediating preconditioning in the dog heart and thier possible interaction with adenosine A1-receptors. *Circulation.* 1992;86:1310-1316.
157. Huang Y, Rane SG. Potassium channel induction by the Ras/Raf signal transduction cascade. *J Biol Chem.* 1994;269:31183-9.
158. Meldrum DR, Cain BS, Meng X, Cleveland JC, Jr., Shames BD, Donnahoo KK, Banerjee A, Harken AH. Calcium preconditioning, but not ischemic preconditioning, bypasses the adenosine triphosphate-dependent potassium (KATP) channel. *Journal of Surgical Research.* 1999;85:77-82.
159. Rohmann S, Weygandt H, Schelling P, Kie Soei, P.D V, Lues I. Involvement of ATP-sensitive potassium channels in preconditioning protection. *Basic Res Cardiol.* 1994;89:563-576.
160. Rohmann S, Fuchs C, Schelling P. In swine myocardium, the infarct size reduction induced by U-89232 is a cardioselective opener of the ATP-snsitive potassium channels. *J Cardivasc Pharm.* 1997;29(1):69-74.
161. Sato T, Sasaki N, O'Rourke B, Marban E. Adenosine primes the opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels: a key step in ischemic preconditioning? *Circulation.* 2000;102:800-5.

162. Lazdunski M, Frelin C, Vigne P. The sodium/hydrogen exchange system in cardiac cells: its biochemical and pharmacological properties and its role in regulating internal concentrations of sodium and internal pH. *J Mol Cell Cardiol.* 1985;17:1029-1042.
163. Murphy E, Cross H, Steenbergen C. Sodium regulation during ischemia versus reperfusion and its role in injury. *Circ Res.* 1999;84:1469-1470.
164. Baines CP, Liu GS, Birincioglu M, Critz SD, Cohen MV, Downey JM. Ischemic preconditioning depends on interaction between mitochondrial KATP channels and actin cytoskeleton. *Am J Physiol.* 1999;276:H1361-8.
165. Fryer RM, Eells JT, Hsu AK, Henry MM, Groß GJ. Ischemic preconditioning in rats: role of mitochondrial K(ATP) channel in preservation of mitochondrial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278:H305-12.
166. Fryer RM, Hsu AK, Groß GJ. Mitochondrial k(atp)channel opening is important during index ischemia and following myocardial reperfusion in ischemic preconditioned rat hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33:831-4.
167. Groß GJ. The role of mitochondrial KATP channels in cardioprotection. *Basic Res Cardiol.* 2000;95:280-4.
168. Groß GJ, Fryer RM. Mitochondrial K(ATP) channels: triggers or distal effectors of ischemic or pharmacological preconditioning? *Circ Res.* 2000;87:431-3.
169. Yao Z, Mizumura T, Mey DA, Groß GJ. K-ATP channels and memory of ischemic preconditioning in dogs: Synergism between adenosine and K-ATP channels. *Am. J. Physiol.* 1997;272:H334.
170. Snabaitis AK, Yokoyama H, Avkiran M. Roles of mitogen-activated Proteinkinases and Proteinkinase C in alpha(1A)-adrenoceptor-mediated stimulation of the sarcolemmal Na(+)-H(+) exchanger. *Circulation Research.* 2000;86:214-20.
171. Kitakaze M, Node K, Takashima S, Minamino T, Kuzuya T, Hori M. Cellular mechanisms of cardioprotection afforded by inhibitors of angiotensin converting enzyme in ischemic hearts: role of bradykinin and nitric oxide. *Hypertension Research.* 2000;23:253-9.
172. Leesar MA, Stoddard MF, Manchikalapudi S, Bolli R. Bradykinin-induced preconditioning in patients undergoing coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol.* 1999;34:639-50.
173. Linz W, Schölkens B. Role of bradykinin in the cardiac effects of angiotension-converting enzyme inhibitors. *Cardiovasc Pharmacol.* 1992;20.
174. Martorana PA, Kettenbach B, Breipohl G, Linz W, Schölkens BA. Reduction of infarct size by local angiotensin-converting-enzyme inhibition is abolished by a bradykinin antagonist. *Eur J Pharmacol.* 1990;182:395-396.
175. Node K, Kitakaze M, Kosaka H, Minamino T, Hori M. Bradykinin mediation of Ca(2+)-activated K+ channels regulates coronary blood flow in ischemic myocardium. *Circulation.* 1997;95:1560-7.
176. Wall T, Sheelhy R, Hartman J. Role of bradykinin in myocardial preconditioning. *J Pharm Exp Ther.* 1994;270:681-689.
177. Yao Z, Groß GJ. Role of nitric oxide, muscarine receptors, and the ATP-sensitive K+channel in mediating the effects of acetylcholine to mimic preconditioning in dogs. *Circ. Res.* 1993;73:1193-1201.

178. Kitakaze M, Minamino T, Node K, Komamura K, Inoue M, Hori M, Kamada T. Activation of ecto-5'-nucleotidase by Protein kinase C attenuates irreversible cellular injury due to hypoxia and reoxygenation in rat cardiomyocytes. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1996;28:1945-55.
179. Kitakaze M, Funaya H, Minamino T, Node K, Sato H, Ueda Y, Okuyama Y, Kuzuya T, Hori M, Yoshida K. Role of Protein kinase C- α in activation of ecto-5'-nucleotidase in the preconditioned canine myocardium. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 1997;239:171-5.
180. Bouma MG, Wildenberg FAJVD, Buurman WA. Adenosine inhibits cytokine release and expression of adhesion molecules by activated human endothelial cells. *Am.J. Physiol.* 1996;270:C522.
181. Bullough DA, Magill MJ, Firestein GS, Mullane KM. Adenosine activates A2 receptors to inhibit neutrophil adhesion and injury to isolated myocytes. *J. Immunol.* 1995;155:2579.
182. Cave AC, Collis CC, Downey JM. Improved functional recovery by ischemic preconditioning is not mediated by adenosine in the globally ischemic isolated rat heart. *Circulation*. 1993;27:663.
183. Downey JM, Cohen MV, Ytrehus K, Liu Y. Cellular mechanisms in the ischemic preconditioning: The role of endogenous adenosine and PKC. *Ann. NY Acad. Sci.* 1994;723:82.
184. Fralix TA, Murphy E, London RE, Steenbergen C. Protective effects of adenosine in the reperfused rat heart: Changes in metabolism and intracellular ion homeostasis. *Am. J. Physiol.* 1993;264:C986.
185. Li GC, Vasquez JA, Gallagher KP, Lucchesi BR. Myocardial protection with preconditioning. *Circulation*. 1990;82:609-619.
186. Li Y, Kloner RA. The cardioprotective effects of ischemic preconditioning are not mediated by adenosine in the rat. *Circulation*. 1992;87:1642.
187. Liang BT, Jacobson KA. Adenosine and ischemic preconditioning. *Curr Pharm Des.* 1999;5:1029-41.
188. Yao ZH, Groß GJ. Acetylcholine mimics ischemic preconditioning via a glibenclamide mechanism in dogs. *Am J Physiol.* 1993;264:H2221-H2225.
189. Yao ZH, Groß GJ. A comparison of adenosine-induced cardioprotection and ischemic preconditioning in dogs - efficacy, time course, and role of K-ATP channels. *Circulation*. 1994;89:1229-1236.
190. Liu GS, Jacobson KA, Downey JM. An irreversible A1-selective adenosine agonist preconditions rabbit heart. *Can J Cardiol.* 1996;12:517-21.
191. Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AW, Olsson RA, Downey JM. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation*. 1991;84:350-6.
192. Headrick JP. Ischemic preconditioning: Bioenergetic and metabolic changes and the role of endogenous adenosine. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1996;28:1227.
193. Thornton JD, Liu GS, Olsson RA, Downey JM. Intravenous pretreatment with A1 selective adenosine analogs protects the heart against infarction. *Circulation*. 1992;85:659.
194. Lasley RD, Rhee JW, Wylen DGLV, Mentzer JRM. Adenosine A1 receptor mediated protection of the globally ischemic isolated rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1990;22:39.

195. Cleveland JC, Meldrum DR, Rowland RT, Sheridan BC, Banerjee A, Harken AH. The obligate role of Protein kinase C in mediating clinically accessible cardiac preconditioning. *Surgery*. 1996;120:345.
196. Speechly-Dick ME, Mcanu MM, Yellon DM. Protein kinase C: Its role in ischemic preconditioning in the rat. *Circ Res*. 1994;75:586-590.
197. Speechly-Dick ME, Grover GJ, Yellon DM. Does ischemic preconditioning in the human involve Protein kinase C and the ATP-dependent K⁺ channel? *Circ. Res*. 1995;77:1030.
198. Banerjee A, Gamboni-Robertson F, Mitchell MB, Rehring TF, Butler K, Cleveland J, Meldrum DR, Shapiro JI, Meng XZ. Stress-induced cardioadaptation reveals a code linking hormone receptors and spatial redistribution of PKC isoforms. *Ann N Y Acad Sci*. 1996;793:226-39.
199. Banerjee A, Locke-Winter C, Rogers KB, Mitchell MB, Brew EC, Cairns CB, Bensard DD, Harken AH. Preconditioning against myocardial dysfunction after ischemia and reperfusion by an alpha 1-adrenergic mechanism. *Circ Res*. 1993;73:656-70.
200. Asimakakis GK, Inners-McBride K, Conti VR. Attenuation of postischemic dysfunction by ischemic preconditioning is not mediated by adenosine in the isolated rat heart. *Cardiovasc. Res*. 1993;27:1522.
201. Ping P, Zhang J, Pierce WM, Bolli R. Functional proteomic analysis of Protein kinase C epsilon signaling complexes in the normal heart and during cardioprotection. *Circ Res*. 2001;88:59-62.
202. Ping P, Zhang J, Zheng YT, Li RC, Dawn B, Tang XL, Takano H, Balafanova Z, Bolli R. Demonstration of selective Protein kinase C-dependent activation of Src and Lck tyrosine kinases during ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Circ Res*. 1999;85:542-50.
203. Winter CB, Cleveland JC, Butler KL, Bensard DB, Mitchell MB, Harken AH, Banerjee A. Facilitative interaction between noradrenergic and purinergic signaling during preconditioning of the rat. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 1997;29:163.
204. Poggetti RS, Moore EE, Moore FA, Bensard DD, Parsons P, Anderson BO, Banerjee A. Gut and liver coordinated metabolic response following major torso injury. *J. Surg. Res*. 1992;52:27.
205. Kitakaze M, Hori M, Tamai J, Iwakura K, Koretsune Y, Kagya T, Iwai K, Kiabatake A, Inouo M, Kamada T. α 1- Adrenoceptor activity regulates release of adenosine from the ischemic myocardium in dogs. *Circ. Res*. 1987;60.
206. Haworth RS, Goss MW, Rozengurt E, Avkiran M. Expression and activity of Protein kinase D/Protein kinase C μ in myocardium: evidence for alpha1-adrenergic receptor- and Protein kinase C-mediated regulation [In Process Citation]. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32:1013-23.
207. Banerjee A. Could the "real" preconditioning mechanism please stand up? (or, a polyplanic platitude to preconditioning). *Cardiovasc Res*. 1994;28:1872-3.
208. Weselcouch EO, Baird AJ, Sleph PG, Dzwonczyk S, Murray HN, Grover GJ. Endogenous catecholamines are not necessary for isolated perfused rat heart. *Cardiovasc Res*. 1995;29:126-132.
209. Bugge E, Ytrehus K. Ischemic preconditioning is Protein kinase dependent but not through stimulation of alpha adrenergic or adenosine receptors in the isolated rat heart. *Cardiovasc Res*. 1995;29:401-406.
210. Toombs CF, Wiltse AL, Shebuski RJ. Ischemic preconditioning fails to limit infarct size in reserpinized rabbit myocardium - implication of norepinephrine release in the preconditioning effect. *Circulation*. 1993;88:2351-2358.

211. Tomai F, Crea F, Gaspardone A, Versaci F, De Paulis R, Penta de Peppo A, Chiariello L, Gioffre PA. Blockade of A1-adenosine receptors prevents myocardial preconditioning in man. *Eur Heart J*. 1994;15:553.
212. Cleveland JC, Jr., Meldrum DR, Rowland RT, Cain BS, Meng X, Gamboni-Robertson F, Banerjee A, Harken AH. Ischemic preconditioning of human myocardium: Proteinkinase C mediates a permissive role for alpha 1-adrenoceptors. *Am J Physiol*. 1997;273:H902-8.
213. Cleveland JC, Jr., Wollmering MM, Meldrum DR, Rowland RT, Rehring TF, Sheridan BC, Harken AH, Banerjee A. Ischemic preconditioning in human and rat ventricle. *Am J Physiol*. 1996;271:H1786-94.
214. Meldrum DR, Cleveland JC, Mitchell MB, Shiran BC, Robertson F, Harken AH, Banerjee A. Protein kinase C mediates Ca²⁺ induced cardiadaptation to ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol*. 1996;271:R1718.
215. Meldrum DR, Cleveland JC, Jr., Sheridan BC, Rowland RT, Banerjee A, Harken AH. Cardiac preconditioning with calcium: clinically accessible myocardial protection. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1996;112:778-86.
216. Meldrum DR, Cleveland JC, Rowland RT, Banerjee A, Harken AH. Calcium induced inotrophy is in part mediated by Proteinkinase C. *C. J. Surg. Res*. 1996;63:400.
217. Chaudry IH, Ohkawa M, Clemens MG. Improved mitochondrial function following ischemia and reflow by ATP- MgCl₂. *Am J Physiol*. 1984;246:R799-804.
218. Chaudry IH. Cellular mechanisms in shock and ischemia and their correction. *Am. J. Physiol*. 1993;245:R117.
219. Steenbergen C, Perlman ME, London RE, Murphy E. Mechanism of preconditioning: Ionic alterations. *Circ. Res*. 1993;72:112.
220. Cain BS, Meldrum DR, Meng X, Shames BD, Banerjee A, Harken AH. Calcium preconditioning in human myocardium. *Ann Thorac Surg*. 1998;65:1065-70.
221. Miyawaki H, Ashraf M. Ca²⁺ as a mediator of ischemic preconditioning. *Circ. Res*. 1997;80:790.
222. Stokke M, Aksnes G, Lande K, Hagelin EM, Brors O. Density of L-type calcium channels in ischaemically preconditioned porcine heart regions. *Acta Physiol Scand*. 1994;150:425-30.
223. Vander Heide RS, Schwartz LM, Reimer KA. The novel calcium antagonist Ro 40-5967 limits myocardial infarct size in the dog. *Cardiovasc Res*. 1994;28:1526-32.
224. Okuda K, Nohara R, Ogino M, Tamaki N, Konishi J, Fujita M, Sasayama S. Limitation of infarct size with preconditioning and calcium antagonist (diltiazem): difference in 99mTc-PYP uptake in the myocardium. *Ann Nucl Med*. 1996;10:201-9.
225. Smith GB, Stefenelli T, Wu ST, Wikman-Coffelt J, Parmley WW, Zaugg CE. Rapid adaptation of myocardial calcium homeostasis to short episodes of ischemia in isolated rat hearts. *Am Heart J*. 1996;131:1106-12.
226. Miyawaki H, Zhou X, Ashraf M. Calcium preconditioning elicits strong protection against ischemic injury via Proteinkinase C signaling pathway. *Circ Res*. 1996;79:137-46.
227. Miyawaki H, Ashraf M. Isoproterenol mimics calcium preconditioning-induced protection against ischemia. *Am J Physiol*. 1997;272:H927-36.
228. Przyklenk K, Hata K, Kloner RA. Is calcium a mediator of infarct size reduction with preconditioning in canine myocardium? *Circulation*. 1997;96:1305-12.

229. Kouchi I, Murakami T, Nawada R, Akao M, Sasayama S. KATP channels are common mediators of ischemic and calcium preconditioning in rabbits. *Am J Physiol.* 1998;274:H1106-12.
230. Mocanu MM, Gadgil S, Yellon DM, Baxter GF. Mibefradil, a T-type and L-type calcium channel blocker, limits infarct size through a glibenclamide-sensitive mechanism. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1999;13:115-22.
231. Przyklenk K, Simkhovich BZ, Bauer B, Hata K, Zhao L, Elliott GT, Kloner RA. Cellular mechanisms of infarct size reduction with ischemic preconditioning. Role of calcium? *Ann N Y Acad Sci.* 1999;874:192-210.
232. Opie LH. Calcium channel blockers and preconditioning. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32:859-60.
233. Ylitalo KV, Ala-Rami A, Liimatta EV, Peuhkurinen KJ, Hassinen IE. Intracellular free calcium and mitochondrial membrane potential in ischemia/reperfusion and preconditioning. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32:1223-38.
234. Xu M, Wang Y, Hirai K, Ayub A, Ashraf M. Calcium preconditioning inhibits mitochondrial permeability transition and apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280:H899-908.
235. Thornton JD, Daly JF, Cohen MV, Yang XM, Downey JM. Catecholamines can induce adenosine receptor-mediated protection of the myocardium but do not participate in ischemic preconditioning in the rabbit. *Circ Res.* 1993;73:649-55.
236. Pisarenko OI, Shulzhenko VS, Studneva IM. Metabolic and functional effects of carbachol and ischaemic preconditioning in rat isolated heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1999;26:26-31.
237. Hashimi MW, Thornton JD, Downey JM, Cohen MV. Loss of myocardial protection from ischemic preconditioning following chronic exposure to R(-)-N6-(2-phenylisopropyl)adenosine is related to defect at the adenosine A1 receptor. *Mol Cell Biochem.* 1998;186:19-25.
238. Ungerer M, Stocker M, Richardt G. A1 adenosine receptors and muscarinic cholinergic receptors in myocardial ischemia. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1996;354:44-52.
239. Thornton JD, Liu GS, Downey JM. Pretreatment with pertussis toxin blocks the protective effects of preconditioning: Evidence for a G-Protein mechanism. *J Mol Cell Cardiol.* 1993;25:311-320.
240. Strasser R, Vogt A, Schaper W. Myokardprotektion durch Präkonditionierung- Experimentelle und klinische Bedeutung. *Zeitschrift für Kardiologie.* 1996;Band 85, Heft 2:79-89.
241. Grover GJ, Sleph PG, Dzwonczyk S. The protective effect of cromakalim and pinacidil on reperfusion function and infarct size in isolated perfused rat hearts and anesthetized dogs. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1990;4:465.
242. Schulz R, Post H, Vahlhaus C, Heusch G. Ischemic preconditioning in pigs: a graded phenomenon: its relation to adenosine and bradykinin. *Circulation.* 1998;98:1022-9.
243. Bouchard JF, Chouinard J, Lamontagne D. Role of kinins in the endothelial protective effect of ischaemic preconditioning. *Br J Pharmacol.* 1998;123:413-20.
244. Giannella E, Mochmann HC, Levi R. Ischemic preconditioning prevents the impairment of hypoxic coronary vasodilatation caused by ischemia/reperfusion: role of adenosine A1/A3 and bradykinin B2 receptor activation. *Circ Res.* 1997;81:415-22.

245. Kaszala K, Vegh A, Papp JG, Parratt JR. Modification by bradykinin B2 receptor blockade of protection by pacing against ischaemia-induced arrhythmias. *Eur J Pharmacol.* 1997;328:51-60.
246. Feng J, Yamaguchi N, Foucart S, Chahine R, Lamontagne D, Nadeau R. Transient ischemia inhibits nonexocytotic release of norepinephrine following sustained ischemia in rat heart: is bradykinin involved? *Can J Physiol Pharmacol.* 1997;75:665-70.
247. Morris SD, Yellon DM. Angiotensin-converting enzyme inhibitors potentiate preconditioning through bradykinin B2 receptor activation in human heart. *J Am Coll Cardiol.* 1997;29:1599-606.
248. Kositprapa C, Ockaili RA, Kukreja RC. Bradykinin B2 receptor is involved in the late phase of preconditioning in rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33:1355-62.
249. Feng J, Li H, Rosenkranz ER. Bradykinin protects the rabbit heart after cardioplegic ischemia via NO- dependent pathways. *Ann Thorac Surg.* 2000;70:2119-24.
250. Sato M, Engelman RM, Otani H, Maulik N, Rousou JA, Flack JE, 3rd, Deaton DW, Das DK. Myocardial protection by preconditioning of heart with losartan, an angiotensin II type 1-receptor blocker: implication of bradykinin- dependent and bradykinin-independent mechanisms. *Circulation.* 2000;102:III346-51.
251. Pinto YM, Bader M, Pesquero JB, Tschöpe C, Scholtens E, van Gilst WH, Buikema H. Increased kallikrein expression protects against cardiac ischemia. *Faseb J.* 2000;14:1861-3.
252. Schoemaker RG, van Heijningen CL. Bradykinin mediates cardiac preconditioning at a distance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278:H1571-6.
253. Jin ZQ, Chen X. Bradykinin mediates myocardial ischaemic preconditioning against free radical injury in guinea-pig isolated heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1998;25:932-5.
254. Bouchard JF, Chouinard J, Lamontagne D. [Role of B1 receptors in the endothelial protective effect of ischaemic preconditioning]. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 1998;91:941-5.
255. Starkopf J, Bugge E, Ytrehus K. Preischemic bradykinin and ischaemic preconditioning in functional recovery of the globally ischaemic rat heart. *Cardiovasc Res.* 1997;33:63-70.
256. Bugge E, Ytrehus K. Bradykinin protects against infarction but does not mediate ischemic preconditioning in the isolated rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1996;28:2333-41.
257. Miki T, Miura T, Ura N, Ogawa T, Suzuki K, Shimamoto K, Iimura O. Captopril potentiates the myocardial infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning through bradykinin B2 receptor activation. *J Am Coll Cardiol.* 1996;28:1616-22.
258. Vegh A, Papp JG, Parratt J. Attenuation of the antiarrhythmic effects of ischaemic preconditioning by blockade of bradykinin B2 receptors. *Br J Pharmacol.* 1994;113:1167-72.
259. Wall TM, Sheehy R, Hartman JC. Role of bradykinin in myocardial preconditioning. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994;270:681-9.
260. Hendrikx M, Toshima Y, Mubagwa K, Flameng W. Improved functional recovery after ischemic preconditioning in the globally ischemic rabbit heart is not mediated by adenosine A1 receptor activation. *Basic Res Cardiol.* 1993;88:576-93.
261. Auchampach JA, Grover GJ, Groß GJ. Blockade of ischaemic preconditioning in dogs by the novel ATP dependent potassium channel antagonist sodium 5-hydroxydecanoate. *Cardiovasc Res.* 1992;26:1054-62.

262. Schulz R, Rose J, Heusch G. Involvement of activation of ATP-dependent potassium channels in ischemic preconditioning in swine. *Am J Physiol.* 1994;267:H1341-52.
263. Liu Y, Gao WD, O'Rourke B, Marban E. Synergistic modulation of ATP-sensitive K⁺ currents by Protein kinase C and adenosine. Implications for ischemic preconditioning. *Circ Res.* 1996;78:443-54.
264. Liu Y, Gao WD, O'Rourke B, Marban E. Priming effect of adenosine on K(ATP) currents in intact ventricular myocytes: implications for preconditioning. *Am J Physiol.* 1997;273:H1637-43.
265. Liu Y, Sato T, O'Rourke B, Marban E. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation.* 1998;97:2463-9.
266. Liu Y, Sato T, Seharaseyon J, Szewczyk A, O'Rourke B, Marban E. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels. Viable candidate effectors of ischemic preconditioning. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;874:27-37.
267. Tomai F, Crea F, Gaspardone A, Versaci F, De Paulis R, De Peppo AP, Chiariello L, Gioffre PA. Ischemic preconditioning during coronary angioplasty is prevented by glibenclamide, a selective ATP-sensitive K⁺ channel blocker. *Circulation.* 1994;90:700-70.
268. Engler R, Yellon D. Sulfonylurea K-ATP blockade in type II diabetes and preconditioning in cardiovascular diseases. *Circulation.* 1996;1994:2297.
269. Snyders DJ. Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res.* 1999;42:377-90.
270. Garlid KD. Opening mitochondrial K(ATP) in the heart-what happens, and what does not happen. *Basic Res Cardiol.* 2000;95:275-9.
271. Holmuhamedov EL, Jovanovic S, Dzeja PP, Jovanovic A, Terzic A. Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels modulate cardiac mitochondrial function. *Am J Physiol.* 1998;275:H1567-76.
272. Holmuhamedov EL, Wang L, Terzic A. ATP-sensitive K⁺ channel openers prevent Ca²⁺ overload in rat cardiac mitochondria. *J Physiol.* 1999;519 Pt 2:347-60.
273. Grover GJ. The role of ATP-sensitive potassium channels in myocardial ischemia: pharmacology and implications for the future. *Exs.* 1996;76:313-24.
274. Grover GJ, Baird AJ, Sleph PG. Lack of a pharmacologic interaction between ATP-sensitive potassium channels and adenosine A1 receptors in ischemic rat hearts. *Cardiovasc Res.* 1996;31:511-7.
275. Grover GJ, D'Alonzo AJ, Dzwonczyk S, Parham CS, Darbenzio RB. Preconditioning is not abolished by the delayed rectifier K⁺ blocker dofetilide. *Am J Physiol.* 1996;271:H1207-14.
276. Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA, Grover GJ. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res.* 1997;81:1072-82.
277. Liu Y, Ren G, O'Rourke B, Marban E, Seharaseyon J. Pharmacological comparison of native mitochondrial K(ATP) channels with molecularly defined surface K(ATP) channels. *Mol Pharmacol.* 2001;59:225-30.
278. Liang BT. Direct preconditioning of cardiac ventricular myocytes via adenosine A1 receptor and KATP channel. *Am J Physiol.* 1996;271:H1769-77.
279. Liang BT, Groß GJ. Direct preconditioning of cardiac myocytes via opioid receptors and KATP channels. *Circ Res.* 1999;84:1396-400.

280. Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Sun X, Schindler PA. The mitochondrial KATP channel as a receptor for potassium channel openers. *J Biol Chem.* 1996;271:8796-9.
281. Paucek P, Mironova G, Mahdi F, Beavis AD, Woldegiorgis G, Garlid KD. Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-dependent K⁺ channel from rat liver and beef heart mitochondria. *J Biol Chem.* 1992;267:26062-9.
282. Baines CP, Cohen MV, Downey JM. Signal transduction in ischemic preconditioning: the role of kinases and mitochondrial K(ATP) channels. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 1999;10:741-54.
283. Hide EJ, Thiemermann C. Limitation of myocardial infarct size in the rabbit by ischaemic preconditioning is abolished by sodium 5-hydroxydecanoate. *Cardiovasc Res.* 1996;31:941-6.
284. Sanada S, Kitakaze M, Asanuma H, Harada K, Ogita H, Node K, Takashima S, Sakata Y, Asakura M, Shinozaki Y, Mori H, Kuzuya T, Hori M. Role of mitochondrial and sarcolemmal K(ATP) channels in ischemic preconditioning of the canine heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280:H256-63.
285. Pain T, Yang XM, Critz SD, Yue Y, Nakano A, Liu GS, Heusch G, Cohen MV, Downey JM. Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ Res.* 2000;87:460-6.
286. Ghosh S, Standen NB, Galinanes M. Evidence for mitochondrial K (ATP) channels as effectors of human myocardial preconditioning. *Cardiovasc Res.* 2000;45:934-40.
287. O'Rourke B. Myocardial K(ATP) channels in preconditioning. *Circ Res.* 2000;87:845-55.
288. Casey PJ. Protein lipidation in cell signaling. *Science.* 1995;268:221-5.
289. Coso OA, Chiariello M, Kalinec G, Kyriakis JM, Woodgett J, Gutkind JS. Transforming G protein-coupled receptors potently activate JNK (SAPK). Evidence for a divergence from the tyrosine kinase signaling pathway. *J Biol Chem.* 1995;270:5620-4.
290. Coso OA, Teramoto H, Simonds WF, Gutkind JS. Signaling from G protein-coupled receptors to c-Jun kinase involves beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins acting on a Ras and Rac1-dependent pathway. *J Biol Chem.* 1996;271:3963-6.
291. Cobb MH. MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol.* 1999;71:479-500.
292. Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascade. *Adv Cancer Res.* 1998;74:49-139.
293. Barford D, Hu SH, Johnson LN. Structural mechanism for glycogen phosphorylase control by phosphorylation and AMP. *J Mol Biol.* 1991;218:233-60.
294. Kraut J. How do enzymes work? *Science.* 1988;242:533-40.
295. Fersht AR, Winter GP. Redesigning enzymes by site-directed mutagenesis. *Ciba Found Symp.* 1985;111:204-18.
296. Resh MD. Myristylation and palmitylation of Src family members: the facts of the matter. *Cell.* 1994;76:411-3.
297. Lamb TD. Gain and kinetics of activation in the G-protein cascade of phototransduction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:566-70.
298. Bourne HR. G proteins. The importance of being GTP [comment]. *Nature.* 1994;369:611-2.

299. Bourne HR. GTPases. A turn-on and a surprise [news; comment]. *Nature*. 1993;366:628-9.
300. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*. 1991;349:117-27.
301. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*. 1990;348:125-32.
302. Premont RT, Inglese J, Lefkowitz RJ. Proteinkinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. *FASEB Journal*. 1995;9:175-82.
303. Inglese J, Koch WJ, Touhara K, Lefkowitz RJ. G beta gamma interactions with PH domains and Ras-MAPK signaling pathways. *Trends in Biochemical Sciences*. 1995;20:151-6.
304. Inglese J, Premont RT. Lipid modifications of G-protein-coupled receptor kinases. *Biochemical Society Transactions*. 1996;24:714-7.
305. Inglese J. Prenylation-dependent targeting of G-protein-coupled receptor kinases. *Methods in Enzymology*. 1995;250:149-58.
306. Neer EJ. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell*. 1995;80:249-57.
307. Offermanns S, Laugwitz KL, Spicher K, Schultz G. G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:504-8.
308. Pai EF, Krengel U, Petsko GA, Goody RS, Kabsch W, Wittinghofer A. Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. *Embo J*. 1990;9:2351-9.
309. Gilchrist A, Mazzoni MR, Dineen B, Dice A, Linden J, Proctor WR, Lupica CR, Dunwiddie TV, Hamm HE. Antagonists of the receptor-G protein interface block Gi-coupled signal transduction. *J Biol Chem*. 1998;273:14912-9.
310. Teramoto H, Coso OA, Miyata H, Igishi T, Miki T, Gutkind JS. Signaling from the small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 to the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated Proteinkinase pathway. A role for mixed lineage kinase 3/protein-tyrosine kinase 1, a novel member of the mixed lineage kinase family. *J Biol Chem*. 1996;271:27225-8.
311. Teramoto H, Crespo P, Coso OA, Igishi T, Xu N, Gutkind JS. The small GTP-binding protein rho activates c-Jun N-terminal kinases/stress-activated Proteinkinases in human kidney 293T cells. Evidence for a Pak-independent signaling pathway. *J Biol Chem*. 1996;271:25731-4.
312. Lambright DG, Noel JP, Hamm HE, Sigler PB. Structural determinants for activation of the alpha-subunit of a heterotrimeric G protein [see comments]. *Nature*. 1994;369:621-8.
313. Coleman DE, Sprang SR. How G proteins work: a continuing story. *Trends in Biochemical Sciences*. 1996;21:41-4.
314. Spiegel AM, Backlund PS, Jr., Butrynski JE, Jones TL, Simonds WF. The G protein connection: molecular basis of membrane association. *Trends Biochem Sci*. 1991;16:338-41.
315. Strader CD, Fong TM, Tota MR, Underwood D, Dixon RA. Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem*. 1994;63:101-32.
316. Lambright DG, Sondek J, Bohm A, Skiba NP, Hamm HE, Sigler PB. A crystal structure of a heterotrimeric G protein [see comments]. *Nature*. 1996;379:311-9.
317. Clapham DE. The G-protein nanomachine [news; comment]. *Nature*. 1996;379:297-9.

318. Clapham DE, Neer EJ. New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling. *Nature*. 1993;365:403-6.
319. Conklin BR, Bourne HR. Structural elements of G alpha subunits that interact with G beta gamma, receptors, and effectors. *Cell*. 1993;73:631-41.
320. Hamm HE. The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem*. 1998;273:669-72.
321. Hepler JR, Biddlecome GH, Kleuss C, Camp LA, Hofmann SL, Ross EM, Gilman AG. Functional importance of the amino terminus of Gq alpha. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271:496-504.
322. Hepler JR, Berman DM, Gilman AG, Kozasa T. RGS4 and GAIP are GTPase-activating proteins for Gq alpha and block activation of phospholipase C beta by gamma-thio-GTP-Gq alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94:428-32.
323. Hepler JR, Gilman AG. G proteins. *Trends in Biochemical Sciences*. 1992;17:383-7.
324. Dumas JJ, Lambright DG. Gs alpha meets its target--shedding light on a key signal transduction event. *Structure*. 1998;6:407-11.
325. Wall MA, Coleman DE, Lee E, Iniguez-Lluhi JA, Posner BA, Gilman AG, Sprang SR. The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2. *Cell*. 1995;83:1047-58.
326. Sondek J, Lambright DG, Noel JP, Hamm HE, Sigler PB. GTPase mechanism of Gproteins from the 1.7-A crystal structure of transducin alpha-GDP-AIF-4. *Nature*. 1994;372:276-9.
327. Prasad MV, Dermott JM, Heasley LE, Johnson GL, Dhanasekaran N. Activation of Jun kinase/stress-activated Protein kinase by GTPase- deficient mutants of G alpha 12 and G alpha 13. *J Biol Chem*. 1995;270:18655-9.
328. Collins LR, Minden A, Karin M, Brown JH. Galpha12 stimulates c-Jun NH2-terminal kinase through the small G proteins Ras and Rac. *J Biol Chem*. 1996;271:17349-53.
329. Heasley LE, Storey B, Fanger GR, Butterfield L, Zamarripa J, Blumberg D, Maue RA. GTPase-deficient G alpha 16 and G alpha q induce PC12 cell differentiation and persistent activation of cJun NH2-terminal kinases. *Mol Cell Biol*. 1996;16:648-56.
330. Sprang SR, Coleman DE. Invasion of the nucleotide snatchers: structural insights into the mechanism of G protein GEFs. *Cell*. 1998;95:155-8.
331. Redfern CH, Degtyarev MY, Kwa AT, Salomonis N, Cotte N, Nanevich T, Fidelman N, Desai K, Vranizan K, Lee EK, Coward P, Shah N, Warrington JA, Fishman GI, Bernstein D, Baker AJ, Conklin BR. Conditional expression of a Gi-coupled receptor causes ventricular conduction delay and a lethal cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97:4826-31.
332. Huang C, Hepler JR, Chen LT, Gilman AG, Anderson RG, Mumby SM. Organization of G proteins and adenylyl cyclase at the plasma membrane. *Molecular Biology of the Cell*. 1997;8:2365-78.
333. Bourne HR, Lustig KD, Wong YH, Conklin BR. Detection of coincident signals by G proteins and adenylyl cyclase. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 1992;57:145-8.
334. Tang WJ, Gilman AG. Adenylyl cyclases. *Cell*. 1992;70:869-72.
335. Cooper DM, Mons N, Karpen JW. Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling. *Nature*. 1995;374:421-4.
336. Garbers DL. Guanylyl cyclase receptors and their endocrine, paracrine, and autocrine ligands. *Cell*. 1992;71:1-4.

337. Taussig R, Gilman AG. Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases. *J Biol Chem.* 1995;270:1-4.
338. LeVine H, 3rd. Structural features of heterotrimeric G-protein-coupled receptors and their modulatory proteins. *Mol Neurobiol.* 1999;19:111-49.
339. Lustig KD, Conklin BR, Herzmark P, Taussig R, Bourne HR. Type II adenylylcyclase integrates coincident signals from Gs, Gi, and Gq. *Journal of Biological Chemistry.* 1993;268:13900-5.
340. Ping P, Anzai T, Gao M, Hammond HK. Adenylyl cyclase and G protein receptor kinase expression during development of heart failure. *American Journal of Physiology.* 1997;273:H707-17.
341. Morris AJ, Malbon CC. Physiological regulation of G protein-linked signaling [published erratum appears in *Physiol Rev* 2000 Jan;80(1):following table of contents]. *Physiol Rev.* 1999;79:1373-430.
342. Morris AJ, Waldo GL, Boyer JL, Hepler JR, Downes CP, Harden TK. Regulation of phospholipase C. *Society of General Physiologists Series.* 1990;45:61-75.
343. Berstein G, Blank JL, Jhon DY, Exton JH, Rhee SG, Ross EM. Phospholipase C-beta 1 is a GTPase-activating protein for Gq/11, its physiologic regulator. *Cell.* 1992;70:411-8.
344. Leslie CC. Properties and regulation of cytosolic phospholipase A2. *Journal of Biological Chemistry.* 1997;272:16709-12.
345. Jalili T, Takeishi Y, Walsh RA. Signal transduction during cardiac hypertrophy: the role of G alpha q, PLC beta I, and PKC. *Cardiovasc Res.* 1999;44:5-9.
346. Berridge MJ, Irvine RF. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature.* 1989;341:197-205.
347. Goldsmith EJ, Cobb MH. Proteinkinases. *Curr Opin Struct Biol.* 1994;4:833-40.
348. Cohen P. Signal integration at the level of Proteinkinases, protein phosphatases and their substrates. *Trends Biochem Sci.* 1992;17:408-13.
349. Hunter T. Proteinkinase classification. *Methods Enzymol.* 1991;200:3-37.
350. Hunter T. Proteinkinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell.* 1995;80:225-36.
351. Hunter T. Signaling--2000 and beyond. *Cell.* 2000;100:113-27.
352. Shabb JB. Physiological Substrates of cAMP-Dependent Proteinkinase. *Chem Rev.* 2001;101:2381-412.
353. Johnson DA, Akamine P, Radzio-Andzelm E, Madhusudan M, Taylor SS. Dynamics of cAMP-Dependent Proteinkinase. *Chem Rev.* 2001;101:2243-2270.
354. Lee CH, Sidik K, Chin KV. Role of cAMP-dependent Proteinkinase in the regulation of DNA repair. *Cancer Lett.* 2001;169:51-8.
355. Francis SH, Corbin JD. Structure and function of cyclic nucleotide-dependent Proteinkinases. *Annu Rev Physiol.* 1994;56:237-72.
356. Yu WJ, Yao XH, Liu XH, Chen K, Niu DD, Su JY, Tang CS. Effects of hypoxia/reoxygenation on mitogen-activated Proteinkinase activity in cultured neonatal rabbit cardiac myocytes. *Sheng Li Xue Bao.* 1997;49:531-6.
357. Han J, Kim N, Kim E, Ho WK, Earm YE. Modulation of ATP-sensitive potassium channels by cGMP-dependent Proteinkinase in rabbit ventricular myocytes. *J Biol Chem.* 2001;276:22140-7.

358. Lochner A, Genade S, Tromp E, Podzuweit T, Moolman JA. Ischemic preconditioning and the beta-adrenergic signal transduction pathway. *Circulation*. 1999;100:958-66.
359. Pass JM, Zheng Y, Wead WB, Zhang J, Li RC, Bolli R, Ping P. PKCepsilon activation induces dichotomous cardiac phenotypes and modulates PKCepsilon-RACK interactions and RACK expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H946-55.
360. Goldberg J, Huang HB, Kwon YG, Greengard P, Nairn AC, Kuriyan J. Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature*. 1995;376:745-53.
361. Mochly-Rosen D. Localization of Protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science*. 1995;268:247-51.
362. Iliodromitis EK, Miki T, Liu GS, Downey JM, Cohen MV, Kremastinos DT. The PKC activator PMA preconditions rabbit heart in the presence of adenosine receptor blockade: is 5'-nucleotidase important? *J Mol Cell Cardiol*. 1998;30:2201-11.
363. Ping P, Zhang J, Qiu Y, Tang XL, Manchikalapudi S, Cao X, Bolli R. Ischemic preconditioning induces selective translocation of Protein kinase C isoforms epsilon and eta in the heart of conscious rabbits without subcellular redistribution of total Protein kinase C activity. *Circulation Research*. 1997;81:404-14.
364. Zhang G, Kazanietz MG, Blumberg PM, Hurley JH. Crystal structure of the cys2 activator-binding domain of Protein kinase C delta in complex with phorbol ester. *Cell*. 1995;81:917-24.
365. Hug H, Sarre TF. Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem J*. 1993;291:329-43.
366. Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of Protein kinase C. *Science*. 1992;258:607-14.
367. Azzi A, Boscoboinik D, Hensey C. The Protein kinase C family. *Eur J Biochem*. 1992;208:547-57.
368. Aderem A. The MARCKS brothers: a family of Protein kinase C substrates. *Cell*. 1992;71:713-6.
369. Aderem A. Signal transduction and the actin cytoskeleton: the roles of MARCKS and profilin. *Trends Biochem Sci*. 1992;17:438-43.
370. Mubagwa K, Flameng W. Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection: an updated overview. *Cardiovasc Res*. 2001;52:25-39.
371. Li RC, Ping P, Zhang J, Wead WB, Cao X, Gao J, Zheng Y, Huang S, Han J, Bolli R. PKCepsilon modulates NF-kappaB and AP-1 via mitogen-activated Protein kinases in adult rabbit cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279:H1679-89.
372. Mockridge JW, Punn A, Latchman DS, Marber MS, Heads RJ. PKC-dependent delayed metabolic preconditioning is independent of transient MAPK activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279:H492-501.
373. Ping P, Zhang J, Huang S, Cao X, Tang XL, Li RC, Zheng YT, Qiu Y, Clerk A, Sugden P, Han J, Bolli R. PKC-dependent activation of p46/p54 JNKs during ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Am J Physiol*. 1999;277:H1771-85.
374. Ping P, Zhang J, Cao X, Li RC, Kong D, Tang XL, Qiu Y, Manchikalapudi S, Auchampach JA, Black RG, Bolli R. PKC-dependent activation of p44/p42 MAPKs during myocardial ischemia-reperfusion in conscious rabbits. *Am J Physiol*. 1999;276:H1468-81.

375. Sakamoto, Miura T, Goto M, Jimura O. Limitation of myocardial infarct size by adenosine A1 receptor activation is abolished by Protein kinase C inhibitors in the rabbit. *Cardiovasc Res*. 1995;29:682-68.
376. Sakamoto K, Urushidani T, Nagao T. Translocation of HSP27 to sarcomere induced by ischemic preconditioning in isolated rat hearts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;269:137-42.
377. Ytrehus K, Liu Y, Downey JM. Preconditioning protects ischemic rabbit heart by Protein kinase C activation. *Am J Physiol*. 1994;26:H1145-H1152.
378. Ito K, Sato T, Arita M. Protein kinase C isoform-dependent modulation of ATP-sensitive K⁺ channels during reoxygenation in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol*. 2001;532:165-74.
379. Przyklenk K, Sussmann MA, Simkhovich BZ, Kloner RA. Does ischemic preconditioning trigger translocation of Protein kinase C in the canine model. *Circulation*. 1995;92(6):1546-1557.
380. Vogt A, Barancik M, Weihrauch D, Arras M, Podzuweit T, Schaper W. Protein kinase C inhibitors reduce infarct size in pig hearts in vivo. In: *Circulation*; 1994:3486 (abstr).
381. Lisacovitch M. Crosstalk among multiple signal-activated phospholipases. *Trends Biochem Sci*. 1992;17:393-9.
382. Cohen PT. Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci*. 2002;115:241-56.
383. Barancik M, Htun P, Schaper W. Okadaic acid and anisomycin are protective and stimulate the SAPK/JNK pathway. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999;34:182-90.
384. Armstrong SC, Ganote CE. Effects of the protein phosphatase inhibitors okadaic acid and calyculin A on metabolically inhibited and ischaemic isolated myocytes. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1992;24:869-84.
385. Armstrong SC, Gao W, Lane JR, Ganote CE. Protein phosphatase inhibitors calyculin A and fostriecin protect rabbit cardiomyocytes in late ischemia. *J Mol Cell Cardiol*. 1998;30:61-73.
386. Fantl WJ, Johnson DE, Williams LT. Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem*. 1993;62:453-81.
387. Heldin CH. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*. 1995;80:213-23.
388. Lemmon MA, Schlessinger J. Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends Biochem Sci*. 1994;19:459-63.
389. Taniguchi T. Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science*. 1995;268:251-5.
390. Tanno M, Tsuchida A, Nozawa Y, Matsumoto T, Hasegawa T, Miura T, Shimamoto K. Roles of tyrosine kinase and Protein kinase C in infarct size limitation by repetitive ischemic preconditioning in the rat. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2000;35:345-52.
391. Zhou S, Cantley LC. Recognition and specificity in protein tyrosine kinase-mediated signalling. *Trends Biochem Sci*. 1995;20:470-5.
392. Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*. 1990;61:203-12.
393. Hubbard SR, Wei L, Ellis L, Hendrickson WA. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature*. 1994;372:746-54.

394. Graf K, Xi XP, Yang D, Fleck E, Hsueh WA, Law RE. Mitogen-activated Proteinkinase activation is involved in platelet-derived growth factor-directed migration by vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 1997;29:334-9.
395. Peraldi P, Frodin M, Barnier JV, Calleja V, Scimeca JC, Filloux C, Calothy G, Van Obberghen E. Regulation of the MAP kinase cascade in PC12 cells: B-Raf activates MEK-1 (MAP kinase or ERK kinase) and is inhibited by cAMP. *FEBS Lett*. 1995;357:290-6.
396. Stroth U, Blume A, Mielke K, Unger T. Angiotensin AT(2) receptor stimulates ERK1 and ERK2 in quiescent but inhibits ERK in NGF-stimulated PC12W cells. *Brain Res Mol Brain Res*. 2000;78:175-80.
397. Sellke FW, Wang SY, Stamler A, Lopez JJ, Li J, Simons M. Enhanced microvascular relaxations to VEGF and bFGF in chronically ischemic porcine myocardium. *Am J Physiol*. 1996;271:H713-20.
398. Htun P, Barancik M, Ito W. Cardioprotection by aFGF and bFGF is induced by activation of the MAP kinases p42 and p44. *Circulation*. 1997;96 (Suppl I):1398 (abstr).
399. Cuevas P, Carceller F, Gimenez-Gallego G. Fibroblast growth factor and cerebral ischaemia. *Neurol Res*. 1994;16:181-3.
400. Cuevas P, Carceller F, Ortega S, Zazo M, Nieto I, Gimenez-Gallego G. Hypotensive activity of fibroblast growth factor. *Science*. 1991;254:1208-10.
401. Cuevas P, Revilla C, Herreras O, Largo C, Gimenez-Gallego G. Neuroprotective effect of acidic fibroblast growth factor on seizure- associated brain damage. *Neurol Res*. 1994;16:365-9.
402. Cuevas P, Carceller F, Gimenez-Gallego G. Acidic fibroblast growth factor prevents post-axotomy neuronal death of the newborn rat facial nerve. *Neurosci Lett*. 1995;197:183-6.
403. Engelmann GL, Dionne CA, Jaye MC. Acidic fibroblast growth factor and heart development. Role in myocyte proliferation and capillary angiogenesis. *Circ Res*. 1993;72:7-19.
404. Yamaguchi TP, Harpal K, Henkemeyer M, Rossant J. fgfr-1 is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation. *Genes Dev*. 1994;8:3032-44.
405. Gonzalez AM, Buscaglia M, Ong M, Baird A. Distribution of basic fibroblast growth factor in the 18-day rat fetus: localization in the basement membranes of diverse tissues. *J Cell Biol*. 1990;110:753-65.
406. Mustonen T, Alitalo K. Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis. *J Cell Biol*. 1995;129:895-8.
407. Mima T, Ueno H, Fischman DA, Williams LT, Mikawa T. Fibroblast growth factor receptor is required for in vivo cardiac myocyte proliferation at early embryonic stages of heart development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:467-71.
408. Fu X, Cuevas P, Gimenez-Gallego G, Sheng Z, Tian H. Acidic fibroblast growth factor reduces rat skeletal muscle damage caused by ischemia and reperfusion. *Chin Med J (Engl)*. 1995;108:209-14.
409. Fu X, Cuevas P, Gimenez-Gallego G, Tian H, Sheng Z. Ischemia and reperfusion reduce the endogenous basic fibroblast growth factor (bFGF) in rat skeletal muscles. *Chin Med J (Engl)*. 1995;108:699-703.
410. Basilico C, Moscatelli D. The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv Cancer Res*. 1992;59:115-65.

411. Liu L, Dai J, Fandrich RR, Kardami E. Cell-cycle dependent anti-FGF-2 staining of chicken cardiac myocytes: movement from chromosomal to cleavage furrow- and midbody-associated sites. *Mol Cell Biochem.* 1997;176:153-61.
412. Partanen J, Vainikka S, Korhonen J, Armstrong E, Alitalo K. Diverse receptors for fibroblast growth factors. *Prog Growth Factor Res.* 1992;4:69-83.
413. Mason IJ. The ins and outs of fibroblast growth factors. *Cell.* 1994;78:547-52.
414. Johnson DE, Williams LT. Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv Cancer Res.* 1993;60:1-41.
415. Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell.* 1991;64:841-8.
416. Burgess WH, Maciag T. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem.* 1989;58:575-606.
417. Kan M, Wang F, Xu J, Crabb JW, Hou J, McKeegan WL. An essential heparin-binding domain in the fibroblast growth factor receptor kinase. *Science.* 1993;259:1918-21.
418. Moscatelli D. Autocrine downregulation of fibroblast growth factor receptors in F9 teratocarcinoma cells. *J Cell Physiol.* 1994;160:555-62.
419. Bellot F, Crumley G, Kaplow JM, Schlessinger J, Jaye M, Dionne CA. Ligand-induced transphosphorylation between different FGF receptors. *Embo J.* 1991;10:2849-54.
420. van der Geer P, Hunter T, Lindberg RA. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol.* 1994;10:251-337.
421. Vainikka S, Joukov V, Wennstrom S, Bergman M, Pelicci PG, Alitalo K. Signal transduction by fibroblast growth factor receptor-4 (FGFR-4). Comparison with FGFR-1. *J Biol Chem.* 1994;269:18320-6.
422. Zhan X, Plourde C, Hu X, Friesel R, Maciag T. Association of fibroblast growth factor receptor-1 with c-Src correlates with association between c-Src and cortactin. *J Biol Chem.* 1994;269:20221-4.
423. Ryan PJ, Gillespie LL. Phosphorylation of phospholipase C gamma 1 and its association with the FGF receptor is developmentally regulated and occurs during mesoderm induction in *Xenopus laevis*. *Dev Biol.* 1994;166:101-11.
424. Kiyama H, Wanaka A, Kato H, Maeno H, Matsumoto K, Sun G, Shiosaka S, Tohyama M. Growth factors and extracellular signal-regulated kinases (mitogen-activated Protein kinase) in the rat pineal gland. *Neuroendocrinology.* 1994;59:152-5.
425. Parker TG, Schneider MD. Growth factors, proto-oncogenes, and plasticity of the cardiac phenotype. *Annu Rev Physiol.* 1991;53:179-200.
426. Liu JF, Chevet E, Kebache S, Lemaitre G, Barritault D, Larose L, Crepin M. Functional Rac-1 and Nck signaling networks are required for FGF-2- induced DNA synthesis in MCF-7 cells. *Oncogene.* 1999;18:6425-33.
427. Fernandez B, Buehler A, Wolfram S, Kostin S, Espanion G, Frank WM, Niemann H, Doevendans PA, Schaper W, Zimmermann R. Transgenic myocardial overexpression of fibroblast growth factor-1 increases coronary artery density and branching. *Circ Res.* 2000;87:207-213.
428. Buehler A, Martire A, Strohm C, Wolfram S, Fernandez B, Palmen M, Wehrens XHT, Doevendans PA, Franz WM, Schaper W, Zimmermann R. Angiogenesis-independent cardioprotection in FGF-1 transgenic mice. *Cardiovas Research.* 2002;submitted.

429. Friesel RE, Maciag T. Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction. *Faseb J.* 1995;9:919-25.
430. Mori S, Claesson-Welsh L, Okuyama Y, Saito Y. Ligand-induced polyubiquitination of receptor tyrosine kinases. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;213:32-9.
431. Liu X, Brodeur SR, Gish G, Songyang Z, Cantley LC, Laudano AP, Pawson T. Regulation of c-Src tyrosine kinase activity by the Src SH2 domain. *Oncogene.* 1993;8:1119-26.
432. Marengere LE, Songyang Z, Gish GD, Schaller MD, Parsons JT, Stern MJ, Cantley LC, Pawson T. SH2 domain specificity and activity modified by a single residue. *Nature.* 1994;369:502-5.
433. Songyang Z, Gish G, Mbamalu G, Pawson T, Cantley LC. A single point mutation switches the specificity of group III Src homology (SH2) domains to that of group I SH2 domains. *J Biol Chem.* 1995;270:26029-32.
434. Songyang Z, Lu KP, Kwon YT, Tsai LH, Filhol O, Cochet C, Brickey DA, Soderling TR, Bartleson C, Graves DJ, DeMaggio AJ, Hoekstra MF, Blenis J, Hunter T, Cantley LC. A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1. *Mol Cell Biol.* 1996;16:6486-93.
435. Songyang Z, Fanning AS, Fu C, Xu J, Marfatia SM, Chishti AH, Crompton A, Chan AC, Anderson JM, Cantley LC. Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science.* 1997;275:73-7.
436. Cantley LC, Songyang Z. Specificity in protein-tyrosine kinase signaling. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.* 1997;31:41-8.
437. Feng GS, Pawson T. Phosphotyrosine phosphatases with SH2 domains: regulators of signal transduction. *Trends Genet.* 1994;10:54-8.
438. van der Geer P, Pawson T. The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction. *Trends Biochem Sci.* 1995;20:277-80.
439. Pawson T. Protein modules and signalling networks. *Nature.* 1995;373:573-80.
440. Pawson T. Protein-tyrosine kinases. Getting down to specifics. *Nature.* 1995;373:477-8.
441. Lietzke SE, Bose S, Cronin T, Klarlund J, Chawla A, Czech MP, Lambright DG. Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. *Molecular Cell.* 2000;6:385-94.
442. Cohen GB, Ren R, Baltimore D. Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell.* 1995;80:237-48.
443. Feller SM, Ren R, Hanafusa H, Baltimore D. SH2 and SH3 domains as molecular adhesives: the interactions of Crk and Abl. *Trends Biochem Sci.* 1994;19:453-8.
444. Anafi M, Kiefer F, Gish GD, Mbamalu G, Iscove NN, Pawson T. SH2/SH3 adaptor proteins can link tyrosine kinases to a Ste20-related Proteinkinase, HPK1. *J Biol Chem.* 1997;272:27804-11.
445. Ling P, Yao Z, Meyer CF, Wang XS, Oehrl W, Feller SM, Tan TH. Interaction of hematopoietic progenitor kinase 1 with adapter proteins Crk and CrkL leads to synergistic activation of c-Jun N-terminal kinase. *Mol Cell Biol.* 1999;19:1359-68.
446. Lu W, Katz S, Gupta R, Mayer BJ. Activation of Pak by membrane localization mediated by an SH3 domain from the adaptor protein Nck. *Curr Biol.* 1997;7:85-94.

447. Blaukat A, Ivankovic-Dikic I, Gronroos E, Dolfi F, Tokiwa G, Vuori K, Dikic I. Adaptor proteins Grb2 and Crk couple Pyk2 with activation of specific mitogen-activated Protein kinase cascades. *J Biol Chem.* 1999;274:14893-901.
448. Dikic I, Tokiwa G, Lev S, Courtneidge SA, Schlessinger J. A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature.* 1996;383:547-50.
449. Kawano M, Kuramoto A, Hirano T, Kishimoto T. Cytokines as autocrine growth factors in malignancies. *Cancer Surv.* 1989;8:905-19.
450. Kishimoto T, Akira S, Taga T. Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science.* 1992;258:593-7.
451. Hirota H, Yoshida K, Kishimoto T, Taga T. Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:4862-6.
452. Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood.* 1995;86:1243-54.
453. Yamauchi-Takahara K, Kishimoto T. Cytokines and their receptors in cardiovascular diseases--role of gp130 signalling pathway in cardiac myocyte growth and maintenance. *Int J Exp Pathol.* 2000;81:1-16.
454. Bromberg JF, Horvath CM, Wen Z, Schreiber RD, Darnell JE, Jr. Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:7673-8.
455. Heim MH, Kerr IM, Stark GR, Darnell JE, Jr. Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway. *Science.* 1995;267:1347-9.
456. Shuai K, Ziemiecki A, Wilks AF, Harpur AG, Sadowski HB, Gilman MZ, Darnell JE. Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins. *Nature.* 1993;366:580-3.
457. Ihle JN. Cytokine receptor signalling. *Nature.* 1995;377:591-4.
458. Ihle JN. The Janus protein tyrosine kinase family and its role in cytokine signaling. *Adv Immunol.* 1995;60:1-35.
459. Ihle JN. Janus kinases in cytokine signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1996;351:159-66.
460. Ihle JN, Kerr IM. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet.* 1995;11:69-74.
461. Ihle JN, Nosaka T, Thierfelder W, Quelle FW, Shimoda K. Jaks and Stats in cytokine signaling. *Stem Cells.* 1997;15:105-11; discussion 112.
462. Ihle JN, Thierfelder W, Teglund S, Stravapodis D, Wang D, Feng J, Parganas E. Signaling by the cytokine receptor superfamily. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;865:1-9.
463. Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K, Silvennoinen O. Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annu Rev Immunol.* 1995;13:369-98.
464. Miura O, Nakamura N, Quelle FW, Witthuhn BA, Ihle JN, Aoki N. Erythropoietin induces association of the JAK2 protein tyrosine kinase with the erythropoietin receptor in vivo. *Blood.* 1994;84:1501-7.
465. Winston LA, Hunter T. JAK2, Ras, and Raf are required for activation of extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated Protein kinase by growth hormone. *J Biol Chem.* 1995;270:30837-40.

466. Xia K, Mukhopadhyay NK, Inhorn RC, Barber DL, Rose PE, Lee RS, Narsimhan RP, D'Andrea AD, Griffin JD, Roberts TM. The cytokine-activated tyrosine kinase JAK2 activates Raf-1 in a p21ras- dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:11681-6.
467. Schindler C, Strehlow I. Cytokines and STAT signaling. *Adv Pharmacol*. 2000;47:113-74.
468. Schindler C. Cytokines and JAK-STAT signaling. *Exp Cell Res*. 1999;253:7-14.
469. Heim MH. The Jak-STAT pathway: cytokine signalling from the receptor to the nucleus. *J Recept Signal Transduct Res*. 1999;19:75-120.
470. Clerk A, Sugden PH. Mitogen-activated Proteinkinases are activated by oxidative stress and cytokines in neonatal rat ventricular myocytes. *Biochemical Society Transactions*. 1997;25:S566.
471. Reddy EP, Korapati A, Chaturvedi P, Rane S. IL-3 signaling and the role of Src kinases, JAKs and STATs: a covert liaison unveiled. *Oncogene*. 2000;19:2532-47.
472. Ramana CV, Chatterjee-Kishore M, Nguyen H, Stark GR. Complex roles of Stat1 in regulating gene expression. *Oncogene*. 2000;19:2619-27.
473. Decker T, Kovarik P. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene*. 2000;19:2628-37.
474. Decker T, Kovarik P. Transcription factor activity of STAT proteins: structural requirements and regulation by phosphorylation and interacting proteins. *Cellular & Molecular Life Sciences*. 1999;55:1535-46.
475. Hirano T, Ishihara K, Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene*. 2000;19:2548-56.
476. Hattori R, Maulik N, Otani H, Zhu L, Cordis G, Engelman RM, Siddiqui MA, Das DK. Role of STAT3 in ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33:1929-36.
477. Herrington J, Smit LS, Schwartz J, Carter-Su C. The role of STAT proteins in growth hormone signaling. *Oncogene*. 2000;19:2585-97.
478. Lin JX, Leonard WJ. The role of Stat5a and Stat5b in signaling by IL-2 family cytokines. *Oncogene*. 2000;19:2566-76.
479. Shuai K. Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene*. 2000;19:2638-44.
480. Kotenko SV, Pestka S. Jak-Stat signal transduction pathway through the eyes of cytokine class II receptor complexes. *Oncogene*. 2000;19:2557-65.
481. Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*. 1994;76:241-51.
482. Hill CS, Treisman R. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell*. 1995;80:199-211.
483. Song JI, Grandis JR. STAT signaling in head and neck cancer. *Oncogene*. 2000;19:2489-95.
484. Jove R. Preface: STAT signaling. *Oncogene*. 2000;19:2466-7.
485. Lin TS, Mahajan S, Frank DA. STAT signaling in the pathogenesis and treatment of leukemias. *Oncogene*. 2000;19:2496-504.
486. Levy DE, Gilliland DG. Divergent roles of STAT1 and STAT5 in malignancy as revealed by gene disruptions in mice. *Oncogene*. 2000;19:2505-10.
487. Coffey PJ, Koenderman L, de Groot RP. The role of STATs in myeloid differentiation and leukemia. *Oncogene*. 2000;19:2511-22.

488. Danial NN, Rothman P. JAK-STAT signaling activated by Abl oncogenes. *Oncogene*. 2000;19:2523-31.
489. Tainer J, Russell P. Enzyme structure. Cracking tyrosine phosphatases. *Nature*. 1994;370:506-7.
490. Fischer EH, Charbonneau H, Tonks NK. Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. *Science*. 1991;253:401-6.
491. Mauro LJ, Dixon JE. 'Zip codes' direct intracellular protein tyrosine phosphatases to the correct cellular 'address'. *Trends Biochem Sci*. 1994;19:151-5.
492. Sun H, Tonks NK. The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling. *Trends Biochem Sci*. 1994;19:480-5.
493. Pai EF, Kabsch W, Krengel U, Holmes KC, John J, Wittinghofer A. Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature*. 1989;341:209-14.
494. Lamarche N, Hall A. GAPs for rho-related GTPases. *Trends Genet*. 1994;10:436-40.
495. Boguski MS, McCormick F. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature*. 1993;366:643-54.
496. Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms [see comments]. *Science*. 1999;286:1358-62.
497. Bourne HR, Wrischnik L, Kenyon C. Ras proteins. Some signal developments [news; comment]. *Nature*. 1990;348:678-9.
498. Burgering BM, Bos JL. Regulation of Ras-mediated signalling: more than one way to skin a cat. *Trends Biochem Sci*. 1995;20:18-22.
499. White MA, Nicolette C, Minden A, Polverino A, Van Aelst L, Karin M, Wigler MH. Multiple Ras functions can contribute to mammalian cell transformation. *Cell*. 1995;80:533-41.
500. Wiesmuller L, Wittinghofer F. Signal transduction pathways involving Ras. Mini review. *Cell Signal*. 1994;6:247-67.
501. Lander HM, Hajjar DP, Hempstead BL, Mirza UA, Chait BT, Campbell S, Quilliam LA. A molecular redox switch on p21(ras). Structural basis for the nitric oxide-p21(ras) interaction. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272:4323-6.
502. Lander HM, Tauras JM, Ogiste JS, Hori O, Moss RA, Schmidt AM. Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated Protein kinase pathway regulated by oxidant stress. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272:17810-4.
503. Lander HM, Jacovina AT, Davis RJ, Tauras JM. Differential activation of mitogen-activated Protein kinases by nitric oxide-related species. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271:19705-9.
504. Aikawa R, Komuro I, Yamazaki T, Zou Y, Kudoh S, Tanaka M, Shiojima I, Hiroi Y, Yazaki Y. Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *J Clin Invest*. 1997;100:1813-1821.
505. Xu S, Khoo S, Dang A, Witt S, Do V, Zhen E, Schaefer EM, Cobb MH. Differential regulation of mitogen-activated protein/ERK kinase (MEK)1 and MEK2 and activation by a Ras-independent mechanism. *Mol Endocrinol*. 1997;11:1618-25.
506. Schweins T, Wittinghofer A. GTP-binding proteins. Structures, interactions and relationships. *Curr Biol*. 1994;4:547-50.

507. Schweins T, Geyer M, Scheffzek K, Warshel A, Kalbitzer HR, Wittinghofer A. Substrate-assisted catalysis as a mechanism for GTP hydrolysis of p21ras and other GTP-binding proteins. *Nat Struct Biol.* 1995;2:36-44.
508. Brtva TR, Drugan JK, Ghosh S, Terrell RS, Campbell-Burk S, Bell RM, Der CJ. Two distinct Raf domains mediate interaction with Ras. *J Biol Chem.* 1995;270:9809-12.
509. McCormick F. Activators and effectors of ras p21 proteins. *Curr Opin Genet Dev.* 1994;4:71-6.
510. McCormick F, Wittinghofer A. Interactions between Ras proteins and their effectors. *Curr Opin Biotechnol.* 1996;7:449-56.
511. Daum G, Eisenmann-Tappe I, Fries HW, Troppmair J, Rapp UR. The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem Sci.* 1994;19:474-80.
512. Zou Y, Komuro I, Yamazaki T, Aikawa R, Kudoh S, Shiojima I, Hiroi Y, Mizuno T, Yazaki Y. Protein kinase C, but not tyrosine kinases or Ras, plays a critical role in angiotensin II-induced activation of Raf-1 kinase and extracellular signal-regulated Protein kinases in cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry.* 1996;271:33592-7.
513. Avruch J, Zhang XF, Kyriakis JM. Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends Biochem Sci.* 1994;19:279-83.
514. Winer MA, Wolgemuth DJ. The segment-specific pattern of A-raf expression in the mouse epididymis is regulated by testicular factors. *Endocrinology.* 1995;136:2561-72.
515. Barnier JV, Papin C, Eychene A, Lecoq O, Calothy G. The mouse B-raf gene encodes multiple protein isoforms with tissue-specific expression. *J Biol Chem.* 1995;270:23381-9.
516. Luo Z, Diaz B, Marshall MS, Avruch J. An intact Raf zinc finger is required for optimal binding to processed Ras and for ras-dependent Raf activation in situ. *Mol Cell Biol.* 1997;17:46-53.
517. Pearson G, Bumeister R, Henry DO, Cobb MH, White MA. Uncoupling raf1 from MEK1/2 impairs only a subset of cellular responses to raf activation. *J Biol Chem.* 2000;275:37303-6.
518. Sozeri O, Vollmer K, Liyanage M, Frith D, Kour G, Mark GE, 3rd, Stabel S. Activation of the c-Raf Protein kinase by Protein kinase C phosphorylation. *Oncogene.* 1992;7:2259-62.
519. Kolch W, Heidecker G, Kochs G, Hummel R, Vahidi H, Mischak H, Finkenzeller G, Marme D, Rapp UR. Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature.* 1993;364:249-52.
520. Carroll MP, May WS. Protein kinase C-mediated serine phosphorylation directly activates Raf-1 in murine hematopoietic cells. *J Biol Chem.* 1994;269:1249-56.
521. Moodie SA, Willumsen BM, Weber MJ, Wolfman A. Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated Protein kinase kinase. *Science.* 1993;260:1658-61.
522. Van Aelst L, Barr M, Marcus S, Polverino A, Wigler M. Complex formation between RAS and RAF and other Protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:6213-7.
523. Zhang XF, Settleman J, Kyriakis JM, Takeuchi-Suzuki E, Elledge SJ, Marshall MS, Bruder JT, Rapp UR, Avruch J. Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature.* 1993;364:308-13.
524. Vojtek AB, Hollenberg SM, Cooper JA. Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell.* 1993;74:205-14.

525. Warne PH, Viciano PR, Downward J. Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. *Nature*. 1993;364:352-5.
526. Barnard D, Diaz B, Hettich L, Chuang E, Zhang XF, Avruch J, Marshall M. Identification of the sites of interaction between c-Raf-1 and Ras-GTP. *Oncogene*. 1995;10:1283-90.
527. Marais R, Light Y, Paterson HF, Marshall CJ. Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *Embo J*. 1995;14:3136-45.
528. Fabian JR, Morrison DK, Daar IO. Requirement for Raf and MAP kinase function during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *J Cell Biol*. 1993;122:645-52.
529. Fabian JR, Vojtek AB, Cooper JA, Morrison DK. A single amino acid change in Raf-1 inhibits Ras binding and alters Raf-1 function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:5982-6.
530. Morrison DK, Heidecker G, Rapp UR, Copeland TD. Identification of the major phosphorylation sites of the Raf-1 kinase. *J Biol Chem*. 1993;268:17309-16.
531. Downward J. KSR: a novel player in the RAS pathway. *Cell*. 1995;83:831-4.
532. Kornfeld K, Hom DB, Horvitz HR. The *ksr-1* gene encodes a novel Protein kinase involved in Ras-mediated signaling in *C. elegans*. *Cell*. 1995;83:903-13.
533. Cross DA, Alessi DR, Vandenhede JR, McDowell HE, Hundal HS, Cohen P. The inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin or insulin-like growth factor 1 in the rat skeletal muscle cell line L6 is blocked by wortmannin, but not by rapamycin: evidence that wortmannin blocks activation of the mitogen-activated Protein kinase pathway in L6 cells between Ras and Raf. *Biochem J*. 1994;303:21-6.
534. Huang J, Mohammadi M, Rodrigues GA, Schlessinger J. Reduced activation of RAF-1 and MAP kinase by a fibroblast growth factor receptor mutant deficient in stimulation of phosphatidylinositol hydrolysis. *J Biol Chem*. 1995;270:5065-72.
535. Huang CY, Ferrell JE, Jr. Dependence of Mos-induced Cdc2 activation on MAP kinase function in a cell-free system. *Embo J*. 1996;15:2169-73.
536. Wang HG, Takayama S, Rapp UR, Reed JC. Bcl-2 interacting protein, BAG-1, binds to and activates the kinase Raf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:7063-8.
537. Rubio I, Rodriguez-Viciano P, Downward J, Wetzker R. Interaction of Ras with phosphoinositide 3-kinase gamma. *Biochem J*. 1997;326:891-5.
538. Sjolander A, Yamamoto K, Huber BE, Lapetina EG. Association of p21ras with phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:7908-12.
539. Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD, Downward J. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature*. 1994;370:527-32.
540. Herrmann C, Martin GA, Wittinghofer A. Quantitative analysis of the complex between p21ras and the Ras-binding domain of the human Raf-1 Protein kinase. *J Biol Chem*. 1995;270:2901-5.
541. van Biesen T, Hawes BE, Raymond JR, Luttrell LM, Koch WJ, Lefkowitz RJ. G(o)-protein alpha-subunits activate mitogen-activated Protein kinase via a novel Protein kinase C-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 1996;271:1266-9.
542. Hawes BE, Luttrell LM, van Biesen T, Lefkowitz RJ. Phosphatidylinositol 3-kinase is an early intermediate in the G beta gamma-mediated mitogen-activated Protein kinase signaling pathway. *J Biol Chem*. 1996;271:12133-6.
543. Singh B, Arlinghaus RB. The *mos* proto-oncogene product: its role in oocyte maturation, metaphase arrest, and neoplastic transformation. *Mol Carcinog*. 1992;6:182-9.

544. Yew N, Mellini ML, Vande Woude GF. Meiotic initiation by the mos protein in *Xenopus*. *Nature*. 1992;355:649-52.
545. Yew N, Strobel M, Vande Woude GF. Mos and the cell cycle: the molecular basis of the transformed phenotype. *Curr Opin Genet Dev*. 1993;3:19-25.
546. Kosako H, Gotoh Y, Nishida E. Mitogen-activated Protein kinase is required for the mos-induced metaphase arrest. *J Biol Chem*. 1994;269:28354-8.
547. Roy LM, Haccard O, Izumi T, Lattes BG, Lewellyn AL, Maller JL. Mos proto-oncogene function during oocyte maturation in *Xenopus*. *Oncogene*. 1996;12:2203-11.
548. Gotoh Y, Masuyama N, Suzuki A, Ueno N, Nishida E. Involvement of the MAP kinase cascade in *Xenopus* mesoderm induction. *Embo J*. 1995;14:2491-8.
549. Xu W, Cooper GM. Identification of a candidate c-mos repressor that restricts transcription of germ cell-specific genes. *Mol Cell Biol*. 1995;15:5369-75.
550. Leibovitch SA, Guillier M, Lenormand JL, Leibovitch MP. p34cdc2 protein is complexed with the c-mos protein in rat skeletal muscle. *Oncogene*. 1993;8:2361-9.
551. Gao C, Arlinghaus RB, Singh B. Further characterization of the c-mos transcript and its cell cycle specific expression in NIH3T3 cells. *Oncogene*. 1996;12:1571-6.
552. Muslin AJ, MacNicol AM, Williams LT. Raf-1 Protein kinase is important for progesterone-induced *Xenopus* oocyte maturation and acts downstream of mos. *Mol Cell Biol*. 1993;13:4197-202.
553. Matten WT, Copeland TD, Ahn NG, Vande Woude GF. Positive feedback between MAP kinase and Mos during *Xenopus* oocyte maturation. *Dev Biol*. 1996;179:485-92.
554. Nagarkatti DS, Sha'afi RI. Role of p38 MAP kinase in myocardial stress. *J Mol Cell Cardiol*. 1998;30:1651-64.
555. Sudgen PH, Clerk A. "Stress-Responsive" mitogen-activated Protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 Mitogen-activated Protein kinases) in the myocardium. *Circ Res*. 1998;83:345-52.
556. Tibbles LA, Woodgett JR. The stress-activated Protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci*. 1999;55:1230-54.
557. Ichijo H. From receptors to stress-activated MAP kinases. *Oncogene*. 1999;18:6087-93.
558. Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolalkaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR. The stress-activated Protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*. 1994;369:156-160.
559. Davis RJ. MAPKs: new JNK expands the group. *TIBS*. 1994;19:470-3.
560. Cano E, Mahadevan L. Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem Sci*. 1995;20:117-22.
561. Seger R, Krebs EG. The MAPK signalling cascade. *FASEB*. 1995;9:726-35.
562. Adams JP, Roberson ED, English JD, Selcher JC, Sweatt JD. MAPK regulation of gene expression in the central nervous system. *Acta Neurobiol Exp (Warsz)*. 2000;60:377-94.
563. Seger R, Ahn NG, Boulton TG, Yancopoulos GD, Panayotatos N, Radziejewska E, Ericsson L, Bratlien RL, Cobb MH, Krebs EG. Microtubule-associated protein 2 kinases, ERK1 and ERK2, undergo autophosphorylation on both tyrosine and threonine residues: implications for their mechanism of activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:6142-6.

564. Ahn NG, Seger R, Bratlien RL, Diltz CD, Tonks NK, Krebs EG. Multiple components in an epidermal growth factor-stimulated Proteinkinase cascade. In vitro activation of a myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 kinase. *J Biol Chem.* 1991;266:4220-7.
565. Errede B, Levin DE. A conserved kinase cascade for MAP kinase activation in yeast. *Curr Opin Cell Biol.* 1993;5:254-60.
566. Erikson E, Maller JL. Purification and characterization of a Proteinkinase from *Xenopus* eggs highly specific for ribosomal protein S6. *J Biol Chem.* 1986;261:350-5.
567. Ray LB, Sturgill TW. Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:1502-6.
568. Jones SW, Erikson E, Blenis J, Maller JL, Erikson RL. A *Xenopus* ribosomal protein S6 kinase has two apparent kinase domains that are each similar to distinct Proteinkinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:3377-81.
569. Hoshi M, Nishida E, Sakai H. Activation of a Ca²⁺-inhibitable Proteinkinase that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro by growth factors, phorbol esters, and serum in quiescent cultured human fibroblasts. *J Biol Chem.* 1988;263:5396-401.
570. Hoshi M, Nishida E, Sakai H. Characterization of a mitogen-activated, Ca²⁺-sensitive microtubule-associated protein-2 kinase. *Eur J Biochem.* 1989;184:477-86.
571. Hoshi M, Akiyama T, Shinohara Y, Miyata Y, Ogawara H, Nishida E, Sakai H. Protein-kinase-C-catalyzed phosphorylation of the microtubule-binding domain of microtubule-associated protein 2 inhibits its ability to induce tubulin polymerization. *Eur J Biochem.* 1988;174:225-30.
572. Huang CY, Ferrell JE, Jr. Ultrasensitivity in the mitogen-activated Proteinkinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:10078-83.
573. Zeidler MP, Bach EA, Perrimon N. The roles of the *Drosophila* JAK/STAT pathway. *Oncogene.* 2000;19:2598-606.
574. Maeda T, Wurgler-Murphy SM, Saito H. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature.* 1994;369:242-5.
575. Whidmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Mitogen-activated Proteinkinase: conservation of three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Reviews.* 1999;79:143-80.
576. Whitmarsh AJ, Davis RJ. Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *TIBS.* 1998;23:481-5.
577. Davis RJ. The mitogen-activated Proteinkinase signal transduction pathway. *J Biol Chem.* 1993;268:14553-6.
578. Davis RJ. Transcriptional regulation by MAP kinases. *Mol Reprod Dev.* 1995;42:459-67.
579. Davis RJ. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase. *Biochem Soc Symp.* 1999;64:1-12.
580. Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases [In Process Citation]. *Cell.* 2000;103:239-52.
581. Sato M, Cordis GA, Maulik N, Das DK. SAPKs regulation of ischemic preconditioning. *American Journal of Physiology - Heart & Circulatory Physiology.* 2000;279:H901-7.

582. Saurin AT, Heads RJ, Foley C, Wang Y, Marber MS. Inhibition of p38-alpha activation may underlay protection in a surrogate model of ischemic preconditioning. *Circulation*. 1999;100 (suppl):I-492 (abstract).
583. Maulik N, Yoshida T, Zu YL, Sato M, Banerjee A, Das DK. Ischemic preconditioning triggers tyrosine kinase signaling: a potential role for MAPKAP kinase 2. *Am J Physiol*. 1998;275:H1857-64.
584. Saurin AT, Martin JL, Heads RJ, Foley C, Mockridge JW, Wright MJ, Wang Y, Marber MS. The role of differential activation of p38-mitogen-activated Protein kinase in preconditioned ventricular myocytes. *Faseb J*. 2000;14:2237-46.
585. Behrends M, Schulz R, Post H, Alexandrov A, Belosjorow S, Michel MC, Heusch G. Inconsistent relation of MAPK activation to infarct size reduction by ischemic preconditioning in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279:H1111-9.
586. Boulton TG, Cobb MH. Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies. *Cell Regul*. 1991;2:357-71.
587. Boulton TG, Gregory JS, Cobb MH. Purification and properties of extracellular signal-regulated kinase 1, an insulin-stimulated microtubule-associated protein 2 kinase. *Biochemistry*. 1991;30:278-86.
588. Zheng CF, Guan KL. Properties of MEKs, the kinases that phosphorylate and activate the extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem*. 1993;268:23933-9.
589. Dent P, Chow YH, Wu J, Morrison DK, Jove R, Sturgill TW. Expression, purification and characterization of recombinant mitogen- activated Protein kinase kinases. *Biochem J*. 1994;303:105-12.
590. Wu J, Harrison JK, Dent P, Lynch KR, Weber MJ, Sturgill TW. Identification and characterization of a new mammalian mitogen- activated Protein kinase kinase, MKK2. *Mol Cell Biol*. 1993;13:4539-48.
591. Alessi DR, Cohen P, Ashworth A, Cowley S, Leervers SJ, Marshall CJ. Assay and expression of mitogen-activated Protein kinase, MAP kinase kinase, and Raf. *Methods Enzymol*. 1995;255:279-90.
592. Alessi DR, Saito Y, Campbell DG, Cohen P, Sithanandam G, Rapp U, Ashworth A, Marshall CJ, Cowley S. Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *Embo J*. 1994;13:1610-9.
593. Gotoh Y, Matsuda S, Takenaka K, Hattori S, Iwamatsu A, Ishikawa M, Kosako H, Nishida E. Characterization of recombinant *Xenopus* MAP kinase kinases mutated at potential phosphorylation sites. *Oncogene*. 1994;9:1891-8.
594. Resing KA, Mansour SJ, Hermann AS, Johnson RS, Candia JM, Fukasawa K, Vande Woude GF, Ahn NG. Determination of v-Mos-catalyzed phosphorylation sites and autophosphorylation sites on MAP kinase kinase by ESI/MS. *Biochemistry*. 1995;34:2610-20.
595. Schaeffer HJ, Catling AD, Eblen ST, Collier LS, Krauss A, Weber MJ. MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade [see comments]. *Science*. 1998;281:1668-71.
596. Schaeffer HJ, Weber MJ. Mitogen-activated Protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol*. 1999;19:2435-44.
597. Crews CM, Alessandrini A, Erikson RL. The primary structure of MEK, a Protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science*. 1992;258:478-80.
598. Jelinek T, Catling AD, Reuter CW, Moodie SA, Wolfman A, Weber MJ. RAS and RAF-1 form a signalling complex with MEK-1 but not MEK-2. *Mol Cell Biol*. 1994;14:8212-8.

599. Papin C, Eychene A, Brunet A, Pages G, Pouyssegur J, Calothy G, Barnier JV. B-Raf protein isoforms interact with and phosphorylate Mek-1 on serine residues 218 and 222. *Oncogene*. 1995;10:1647-51.
600. Catling AD, Schaeffer HJ, Reuter CW, Reddy GR, Weber MJ. A proline-rich sequence unique to MEK1 and MEK2 is required for raf binding and regulates MEK function. *Mol Cell Biol*. 1995;15:5214-25.
601. Frost JA, Steen H, Shapiro P, Lewis T, Ahn N, Shaw PE, Cobb MH. Cross-cascade activation of ERKs and ternary complex factors by Rho family proteins. *Embo J*. 1997;16:6426-38.
602. Frost JA, Swantek JL, Stippec S, Yin MJ, Gaynor R, Cobb MH. Stimulation of NFkappa B activity by multiple signaling pathways requires PAK1. *J Biol Chem*. 2000;275:19693-9.
603. Brunet A, Pages G, Pouyssegur J. Growth factor-stimulated MAP kinase induces rapid retrophosphorylation and inhibition of MAP kinase kinase (MEK1). *FEBS Lett*. 1994;346:299-303.
604. Saito Y, Gomez N, Campbell DG, Ashworth A, Marshall CJ, Cohen P. The threonine residues in MAP kinase kinase 1 phosphorylated by MAP kinase in vitro are also phosphorylated in nerve growth factor-stimulated rat pheochromocytoma (PC12) cells. *FEBS Lett*. 1994;341:119-24.
605. Mansour SJ, Resing KA, Candi JM, Hermann AS, Gloor JW, Herskind KR, Wartmann M, Davis RJ, Ahn NG. Mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphorylation of MAP kinase kinase: determination of phosphorylation sites by mass spectrometry and site-directed mutagenesis. *Journal of Biochemistry*. 1994;116:304-14.
606. Rossomando AJ, Dent P, Sturgill TW, Marshak DR. Mitogen-activated Protein kinase kinase 1 (MKK1) is negatively regulated by threonine phosphorylation. *Mol Cell Biol*. 1994;14:1594-602.
607. Rossomando AJ, Payne DM, Weber MJ, Sturgill TW. Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine Protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:6940-3.
608. Robinson MJ, Harkins PC, Zhang J, Baer R, Haycock JW, Cobb MH, Goldsmith EJ. Mutation of position 52 in ERK2 creates a nonproductive binding mode for adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry*. 1996;35:5641-6.
609. Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated Protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol*. 1997;9:180-186.
610. Robinson MJ, Cheng M, Khokhlatchev A, Ebert D, Ahn N, Guan KL, Stein B, Goldsmith E, Cobb MH. Contributions of the mitogen-activated protein (MAP) kinase backbone and phosphorylation loop to MEK specificity. *J Biol Chem*. 1996;271:29734-9.
611. Cobb MH, Goldsmith EJ. Dimerization in MAP-kinase signaling. *Trends Biochem Sci*. 2000;25:7-9.
612. Cobb MH, Robbins DJ, Boulton TG. ERKs, extracellular signal-regulated MAP-2 kinases. *Curr Opin Cell Biol*. 1991;3:1025-32.
613. Cobb MH, Xu S, Cheng M, Ebert D, Robbins D, Goldsmith E, Robinson M. Structural analysis of the MAP kinase ERK2 and studies of MAP kinase regulatory pathways. *Adv Pharmacol*. 1996;36:49-65.
614. Cobb MH, Boulton TG, Robbins DJ. Extracellular signal-regulated kinases: ERKs in progress. *Cell Regul*. 1991;2:965-78.

615. Lee JD, Ulevitch RJ, Han J. Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;213:715-24.
616. Abe J, Kusuhara M, Ulevitch RJ, Berk BC, Lee JD. Big mitogen-activated Proteinkinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase. *J Biol Chem.* 1996;271:16586-90.
617. English JM, Pearson G, Baer R, Cobb MH. Identification of substrates and regulators of the mitogen-activated Proteinkinase ERK5 using chimeric Proteinkinases. *J Biol Chem.* 1998;273:3854-60.
618. English JM, Vanderbilt CA, Xu S, Marcus S, Cobb MH. Isolation of MEK5 and differential expression of alternatively spliced forms. *J Biol Chem.* 1995;270:28897-902.
619. English JM, Pearson G, Hockenberry T, Shivakumar L, White MA, Cobb MH. Contribution of the ERK5/MEK5 pathway to Ras/Raf signaling and growth control. *J Biol Chem.* 1999;274:31588-92.
620. English J, Pearson G, Wilsbacher J, Swantek J, Karandikar M, Xu S, Cobb MH. New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp Cell Res.* 1999;253:255-70.
621. Ueda Y, Hirai S, Osada S, Suzuki A, Mizuno K, Ohno S. Proteinkinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *J Biol Chem.* 1996;271:23512-9.
622. Hundle B, McMahon T, Dadgar J, Messing RO. Overexpression of epsilon-Proteinkinase C enhances nerve growth factor- induced phosphorylation of mitogen-activated Proteinkinases and neurite outgrowth. *J Biol Chem.* 1995;270:30134-40.
623. VanRenterghem B, Browning MD, Maller JL. Regulation of mitogen-activated Proteinkinase activation by Proteinkinases A and C in a cell-free system. *J Biol Chem.* 1994;269:24666-72.
624. Luo Z, Tzivion G, Belshaw PJ, Vavvas D, Marshall M, Avruch J. Oligomerization activates c-Raf-1 through a Ras-dependent mechanism. *Nature.* 1996;383:181-5.
625. Luo ZJ, Zhang XF, Rapp U, Avruch J. Identification of the 14.3.3 zeta domains important for self- association and Raf binding. *J Biol Chem.* 1995;270:23681-7.
626. Yamaguchi K, Ogita K, Nakamura S, Nishizuka Y. The Proteinkinase C isoforms leading to MAP-kinase activation in CHO cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;210:639-47.
627. Yamaguchi K, Shirakabe K, Shibuya H, Irie K, Oishi I, Ueno N, Taniguchi T, Nishida E, Matsumoto K. Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science.* 1995;270:2008-11.
628. Young SW, Dickens M, Tavaré JM. Activation of mitogen-activated Proteinkinase by Proteinkinase C isotypes alpha, beta I and gamma, but not epsilon. *FEBS Lett.* 1996;384:181-4.
629. Olson MF, Ashworth A, Hall A. An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science.* 1995;269:1270-2.
630. Kim SO, Xu Y, Katz S, Pelech S. Cyclic GMP-dependent and -independent regulation of MAP kinases by sodium nitroprusside in isolated cardiomyocytes. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2000;1496:277-84.
631. Wang D, Yu X, Brecher P. Nitric oxide and N-acetylcysteine inhibit the activation of mitogen-activated Proteinkinases by angiotensin II in rat cardiac fibroblasts [published erratum appears in *J Biol Chem* 1999 Jan 8;274(2):1180]. *Journal of Biological Chemistry.* 1998;273:33027-34.

632. Sugden PH, Clerk A. Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cellular Signalling*. 1997;9:337-51.
633. Sugden PH, Clerk A. Regulation of mitogen-activated Protein kinase cascades in the heart. *Advances in Enzyme Regulation*. 1998;38:87-98.
634. Singh K, Balligand JL, Fischer TA, Smith TW, Kelly RA. Regulation of cytokine-inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes and microvascular endothelial cells. Role of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/ERK2) and STAT1 alpha. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271:1111-7.
635. Wen Z, Zhong Z, Darnell JE, Jr. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell*. 1995;82:241-50.
636. Zheng CF, Guan KL. Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *Embo J*. 1994;13:1123-31.
637. Zheng CF, Guan KL. Dephosphorylation and inactivation of the mitogen-activated Protein kinase by a mitogen-induced Thr/Tyr protein phosphatase. *J Biol Chem*. 1993;268:16116-9.
638. Powis G, Bonjouklian R, Berggren MM, Gallegos A, Abraham R, Ashendel C, Zalkow L, Matter WF, Dodge J, Grindey G, et al. Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3- kinase. *Cancer Res*. 1994;54:2419-23.
639. Hong F, Kwon SJ, Jhun BS, Kim SS, Ha J, Kim SJ, Sohn NW, Kang C, Kang I. Insulin-like growth factor-1 protects H9c2 cardiac myoblasts from oxidative stress-induced apoptosis via phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways. *Life Sciences*. 2001;68:1095-105.
640. Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4- morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem*. 1994;269:5241-8.
641. Mizukami Y, Kobayashi S, Uberall F, Hellbert K, Kobayashi N, Yoshida K. Nuclear mitogen-activated Protein kinase activation by Protein kinase C ζ during reoxygenation after ischemic hypoxia. *J Biol Chem*. 2000;275:19921-19927.
642. Clerk A, Harrison JG, Long CS, Sugden PH. Pro-inflammatory cytokines stimulate mitogen-activated Protein kinase subfamilies, increase phosphorylation of c-Jun and ATF2 and upregulate c-Jun protein in neonatal rat ventricular myocytes. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1999;31:2087-99.
643. Frevert EU, Kahn BB. Differential effects of constitutively active phosphatidylinositol 3- kinase on glucose transport, glycogen synthase activity, and DNA synthesis in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol*. 1997;17:190-8.
644. Von Willebrand M, Jascur T, Bonnefoy-Berard N, Yano H, Altman A, Matsuda Y, Mustelin T. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase blocks T cell antigen receptor/CD3-induced activation of the mitogen-activated kinase Erk2. *Eur J Biochem*. 1996;235:828-35.
645. Hu Q, Klippel A, Muslin AJ, Fantl WJ, Williams LT. Ras-dependent induction of cellular responses by constitutively active phosphatidylinositol-3 kinase. *Science*. 1995;268:100-2.
646. Rodriguez-Viciana P, Marte BM, Warne PH, Downward J. Phosphatidylinositol 3' kinase: one of the effectors of Ras. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1996;351:225-31; discussion 231-2.
647. Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD, Downward J. Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. *Embo J*. 1996;15:2442-51.

648. Kauffmann-Zeh A, Rodriguez-Viciana P, Ulrich E, Gilbert C, Coffey P, Downward J, Evan G. Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature*. 1997;385:544-8.
649. Khwaja A, Rodriguez-Viciana P, Wennstrom S, Warne PH, Downward J. Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and Protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *Embo J*. 1997;16:2783-93.
650. Marte BM, Rodriguez-Viciana P, Wennstrom S, Warne PH, Downward J. R-Ras can activate the phosphoinositide 3-kinase but not the MAP kinase arm of the Ras effector pathways. *Curr Biol*. 1997;7:63-70.
651. Knauf U, Tschopp C, Gram H. Negative regulation of protein translation by mitogen-activated Protein kinase-interacting kinases 1 and 2. *Mol Cell Biol*. 2001;21:5500-11.
652. Ruiz JC, Conlon FL, Robertson EJ. Identification of novel Protein kinases expressed in the myocardium of the developing mouse heart. *Mech Dev*. 1994;48:153-64.
653. Aimond F, Rauzier JM, Bony C, Vassort G. Simultaneous activation of p38 MAPK and p42/44 MAPK by ATP stimulates the K⁺ current ITREK in cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 2000;275:39110-6.
654. Cavigelli M, Dolfi F, Claret FX, Karin M. Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation. *EMBO Journal*. 1995;14:5957-64.
655. Rao VN, Reddy ES. elk-1 proteins interact with MAP kinases. *Oncogene*. 1994;9:1855-60.
656. Erikson RL. Structure, expression, and regulation of Protein kinases involved in the phosphorylation of ribosomal protein S6. *J Biol Chem*. 1991;266:6007-10.
657. Erikson E, Maller JL. Purification and characterization of ribosomal protein S6 kinase I from *Xenopus* eggs. *J Biol Chem*. 1991;266:5249-55.
658. Poulter L, Ang SG, Gibson BW, Williams DH, Holmes CF, Caudwell FB, Pitcher J, Cohen P. Analysis of the in vivo phosphorylation state of rabbit skeletal muscle glycogen synthase by fast-atom-bombardment mass spectrometry. *Eur J Biochem*. 1988;175:497-510.
659. Avruch J. Insulin signal transduction through Protein kinase cascades. *Mol Cell Biochem*. 1998;182:31-48.
660. Chen RH, Sarnecki C, Blenis J. Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded Protein kinases. *Mol Cell Biol*. 1992;12:915-27.
661. Khokhlatchev AV, Canagarajah B, Wilsbacher J, Robinson M, Atkinson M, Goldsmith E, Cobb MH. Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell*. 1998;93:605-15.
662. Brunet A, Roux D, Lenormand P, Dowd S, Keyse S, Pouyssegur J. Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated Protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *Embo J*. 1999;18:664-74.
663. Fukuda M, Gotoh Y, Nishida E. Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *Embo J*. 1997;16:1901-8.
664. Tresini M, Lorenzini A, Frisoni L, Allen RG, Cristofalo VJ. Lack of Elk-1 phosphorylation and dysregulation of the extracellular regulated kinase signaling pathway in senescent human fibroblast. *Exp Cell Res*. 2001;269:287-300.
665. Aplin AE, Stewart SA, Assoian RK, Juliano RL. Integrin-mediated adhesion regulates ERK nuclear translocation and phosphorylation of Elk-1. *J Cell Biol*. 2001;153:273-82.

666. Babu GJ, Lalli MJ, Sussman MA, Sadoshima J, Periasamy M. Phosphorylation of elk-1 by MEK/ERK pathway is necessary for c-fos gene activation during cardiac myocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32:1447-57.
667. Davis S, Vanhoutte P, Pages C, Caboche J, Laroche S. The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci.* 2000;20:4563-72.
668. Cammarota M, Bevilaqua LR, Ardenghi P, Paratcha G, Levi de Stein M, Izquierdo I, Medina JH. Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. *Brain Res Mol Brain Res.* 2000;76:36-46.
669. Whitmarsh AJ, Davis RJ. Regulation of transcription factor function by phosphorylation [In Process Citation]. *Cell Mol Life Sci.* 2000;57:1172-83.
670. Whitmarsh AJ, Davis RJ. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated Proteinkinase signal transduction pathways. *J Mol Med.* 1996;74:589-607.
671. Yang SH, Shore P, Willingham N, Lakey JH, Sharrocks AD. The mechanism of phosphorylation-inducible activation of the ETS-domain transcription factor Elk-1. *Embo J.* 1999;18:5666-74.
672. Yang SH, Whitmarsh AJ, Davis RJ, Sharrocks AD. Differential targeting of MAP kinases to the ETS-domain transcription factor Elk-1. *EMBO.* 1998;17:1740-9.
673. Yang SH, Yates PR, Whitmarsh AJ, Davis RJ, Sharrocks AD. The Elk-1 ETS-domain transcription factor contains a mitogen-activated Proteinkinase targeting motif. *Mol Cell Biol.* 1998;18:710-20.
674. Kaminska B, Kaczmarek L, Zangenehpour S, Chaudhuri A. Rapid phosphorylation of Elk-1 transcription factor and activation of MAP kinase signal transduction pathways in response to visual stimulation. *Mol Cell Neurosci.* 1999;13:405-14.
675. Hodge C, Liao J, Stofega M, Guan K, Carter-Su C, Schwartz J. Growth hormone stimulates phosphorylation and activation of elk-1 and expression of c-fos, egr-1, and junB through activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *J Biol Chem.* 1998;273:31327-36.
676. Xi XP, Graf K, Goetze S, Hsueh WA, Law RE. Inhibition of MAP kinase blocks insulin-mediated DNA synthesis and transcriptional activation of c-fos by Elk-1 in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 1997;417:283-6.
677. Muller JM, Cahill MA, Rupec RA, Baeuerle PA, Nordheim A. Antioxidants as well as oxidants activate c-fos via Ras-dependent activation of extracellular-signal-regulated kinase 2 and Elk-1. *Eur J Biochem.* 1997;244:45-52.
678. Bernal-Mizrachi E, Wen W, Srinivasan S, Klenk A, Cohen D, Permutt MA. Activation of Elk-1, an Ets transcription factor, by glucose and EGF treatment of insulinoma cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001;281:E1286-99.
679. Sharrocks AD. ERK2/p42 MAP kinase stimulates both autonomous and SRF-dependent DNA binding by Elk-1. *FEBS Lett.* 1995;368:77-80.
680. Gille H, Strahl T, Shaw PE. Activation of ternary complex factor Elk-1 by stress-activated Proteinkinases. *Curr Biol.* 1995;5:1191-200.
681. Yue TL, Wang C, Gu JL, Ma XL, Kumar S, Lee JC, Feuerstein GZ, Thomas H, Maleeff B, Ohlstein EH. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase enhances Ischemia/Reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart [see comments]. *Circulation Research.* 2000;86:692-9.

682. Leppa S, Bohmann D. Diverse functions of JNK signaling and c-Jun in stress response and apoptosis. *Oncogene*. 1999;18:6158-62.
683. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*. 1995;270:1326-31.
684. Harada J, Sugimoto M. An inhibitor of p38 and JNK MAP kinases prevents activation of caspase and apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Japanese Journal of Pharmacology*. 1999;79:369-78.
685. Kawasaki H, Morooka T, Shimohama S, Kimura J, Hirano T, Gotoh Y, Nishida E. Activation and involvement of p38 mitogen-activated Proteinkinase in glutamate-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272:18518-21.
686. Maroney AC, Glicksman MA, Basma AN, Walton KM, Knight E, Jr., Murphy CA, Bartlett BA, Finn JP, Angeles T, Matsuda Y, Neff NT, Dionne CA. Motoneuron apoptosis is blocked by CEP-1347 (KT 7515), a novel inhibitor of the JNK signaling pathway. *Journal of Neuroscience*. 1998;18:104-11.
687. Amato SF, Swart JM, Berg M, Wanebo HJ, Mehta SR, Chiles TC. Transient stimulation of the c-Jun-NH2-terminal kinase/activator protein 1 pathway and inhibition of extracellular signal-regulated kinase are early effects in paclitaxel-mediated apoptosis in human B lymphoblasts. *Cancer Res*. 1998;58:241-7.
688. Srivastava RK, Mi QS, Hardwick JM, Longo DL. Deletion of the loop region of Bcl-2 completely blocks paclitaxel-induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96:3775-80.
689. Wang TH, Wang HS, Ichijo H, Giannakakou P, Foster JS, Fojo T, Wimalasena J. Microtubule-interfering agents activate c-Jun N-terminal kinase/stress-activated Proteinkinase through both Ras and apoptosis signal-regulating kinase pathways. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273:4928-36.
690. Wang TH, Popp DM, Wang HS, Saitoh M, Mural JG, Henley DC, Ichijo H, Wimalasena J. Microtubule dysfunction induced by paclitaxel initiates apoptosis through both c-Jun N-terminal kinase (JNK)-dependent and -independent pathways in ovarian cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274:8208-16.
691. Wang TH, Wang HS, Soong YK. Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together. *Cancer*. 2000;88:2619-28.
692. Kawakami Y, Miura T, Bissonnette R, Hata D, Khan WN, Kitamura T, Maeda-Yamamoto M, Hartman SE, Yao L, Alt FW, Kawakami T. Bruton's tyrosine kinase regulates apoptosis and JNK/SAPK kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:3938-42.
693. Lenczowski JM, Dominguez L, Eder AM, King LB, Zacharchuk CM, Ashwell JD. Lack of a role for Jun kinase and AP-1 in Fas-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*. 1997;17:170-81.
694. Akiba H, Nakano H, Nishinaka S, Shindo M, Kobata T, Atsuta M, Morimoto C, Ware CF, Malinin NL, Wallach D, Yagita H, Okumura K. CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, activates NF-kappaB and stress-activated Proteinkinase/c-Jun N-terminal kinase via TRAF2, TRAF5, and NF-kappaB-inducing kinase. *J Biol Chem*. 1998;273:13353-8.
695. Galibert L, Tometsko ME, Anderson DM, Cosman D, Dougall WC. The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor (TNFR)- associated factors in the signaling mechanisms of receptor activator of NF-kappaB, a member of the TNFR superfamily. *J Biol Chem*. 1998;273:34120-7.

696. Swantek JL, Cobb MH, Geppert TD. Jun N-terminal kinase/stress-activated Proteinkinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) translation: glucocorticoids inhibit TNF-alpha translation by blocking JNK/SAPK. *Mol Cell Biol.* 1997;17:6274-82.
697. Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated Proteinkinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem.* 1995;270:7420-6.
698. Hall JP, Merithew E, Davis RJ. c-Jun N-terminal kinase (JNK) repression during the inflammatory response? just say NO [In Process Citation]. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:14022-4.
699. Kasibhatla S, Brunner T, Genestier L, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR. DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. *Mol Cell.* 1998;1:543-51.
700. Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ. JNK1: a Proteinkinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell.* 1994;76:1025-37.
701. Tokiwa G, Dikic I, Lev S, Schlessinger J. Activation of Pyk2 by stress signals and coupling with JNK signaling pathway. *Science.* 1996;273:792-4.
702. Clerk A, Michael A, Sugden PH. Stimulation of multiple mitogen-activated Proteinkinase sub-families by oxidative stress and phosphorylation of the small heat shock protein, HSP25/27, in neonatal ventricular myocytes. *Biochemical Journal.* 1998;333:581-9.
703. Kovarik P, Stoiber D, Eyers PA, Menghini R, Neininger A, Gaestel M, Cohen P, Decker T. Stress-induced phosphorylation of STAT1 at Ser727 requires p38 mitogen-activated Proteinkinase whereas IFN-gamma uses a different signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1999;96:13956-61.
704. Dorion S, Berube J, Huot J, Landry J. A short lived protein involved in the heat shock sensing mechanism responsible for stress-activated Proteinkinase 2 (SAPK2/p38) activation. *Journal of Biological Chemistry.* 1999;274:37591-7.
705. Meloche S, Landry J, Huot J, Houle F, Marceau F, Giasson E. p38 MAP kinase pathway regulates angiotensin II-induced contraction of rat vascular smooth muscle. *American Journal of Physiology - Heart & Circulatory Physiology.* 2000;279:H741-51.
706. Landry J, Huot J. Modulation of actin dynamics during stress and physiological stimulation by a signaling pathway involving p38 MAP kinase and heat-shock protein 27. *Biochemistry & Cell Biology.* 1995;73:703-7.
707. Bogoyevitch MA, Ketterman AJ, Sugden PH. Cellular stresses differentially activate c-Jun N-terminal Proteokinases and extracellular signal-regulated Proteokinases in cultured ventricular myocytes. *Journal of Biological Chemistry.* 1995;270:29710-7.
708. Haq SE, Clerk A, Sugden PH. Activation of mitogen-activated Proteokinases (p38-MAPKs, SAPKs/JNKs and ERKs) by adenosine in the perfused rat heart. *FEBS Lett.* 1998;434:305-8.
709. Stone AA, Chambers TC. Microtubule inhibitors elicit differential effects on MAP kinase (JNK, ERK, and p38) signaling pathways in human KB-3 carcinoma cells. *Experimental Cell Research.* 2000;254:110-9.
710. Ehlers RA, Hernandez A, Bloemendal LS, Ethridge RT, Farrow B, Evers BM. Mitochondrial DNA damage and altered membrane potential ($\Delta\psi$) in pancreatic acinar cells induced by reactive oxygen species. *Surgery.* 1999;126:148-55.

711. Fox T, Fitzgibbon MJ, Fleming MA, Hsiao HM, Brummel CL, Su MS. Kinetic mechanism and ATP-binding site reactivity of p38gamma MAP kinase. *FEBS Letters*. 1999;461:323-8.
712. Mizukami Y, Yoshioka K, Morimoto S, Yoshida K. A novel mechanism of JNK1 activation. Nuclear translocation and activation of JNK1 during ischemia and reperfusion. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272:16657-62.
713. Zhu W, Zou Y, Aikawa R, Harada K, Kudoh S, Uozumi H, Hayashi D, Gu Y, Yamazaki T, Nagai R, Yazaki Y, Komuro I. MAPK superfamily plays an important role in daunomycin-induced apoptosis of cardiac myocytes. *Circulation*. 1999;100:2100-7.
714. Turner NA, Xia F, Azhar G, Zhang X, Liu L, Wei JY. Oxidative stress induces DNA fragmentation and caspase activation via the c-Jun NH2-terminal kinase pathway in H9c2 cardiac muscle cells. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1998;30:1789-801.
715. Kharbanda S, Ren R, Pandey P, Shafman TD, Feller SM, Weichselbaum RR, Kufe DW. Activation of the c-Abl tyrosine kinase in the stress response to DNA-damaging agents. *Nature*. 1995;376:785-8.
716. Turner NA, Xia F, Azhar G, Zhang X, Liu L, Wei JY. Oxidative stress induces DNA fragmentation and caspase activation via the c-Jun NH2-terminal kinase pathway in H9c2 cardiac muscle cells. *J Mol Cell Cardiol*. 1998;30:1789-801.
717. Kharbanda S, Yuan ZM, Weichselbaum R, Kufe D. Determination of cell fate by c-Abl activation in the response to DNA damage. *Oncogene*. 1998;17:3309-18.
718. Blattner C, Tobiasch E, Litfen M, Rahmsdorf HJ, Herrlich P. DNA damage induced p53 stabilization: no indication for an involvement of p53 phosphorylation. *Oncogene*. 1999;18:1723-32.
719. Kharbanda S, Saxena S, Yoshida K, Pandey P, Kaneki M, Wang Q, Cheng K, Chen YN, Campbell A, Sudha T, Yuan ZM, Narula J, Weichselbaum R, Nalin C, Kufe D. Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage. *J Biol Chem*. 2000;275:322-7.
720. Andoh T. Signal transduction pathways leading to cell cycle arrest and apoptosis induced by DNA topoisomerase poisons. *Cell Biochem Biophys*. 2000;33:181-8.
721. Inamura N, Enokido Y, Hatanaka H. Involvement of c-Jun N-terminal kinase and caspase 3-like protease in DNA damage-induced, p53-mediated apoptosis of cultured mouse cerebellar granule neurons. *Brain Res*. 2001;904:270-8.
722. Kim TK, Kim T, Kim TY, Lee WG, Yim J. Chemotherapeutic DNA-damaging drugs activate interferon regulatory factor-7 by the mitogen-activated Protein kinase kinase-4-cJun NH2-terminal kinase pathway. *Cancer Res*. 2000;60:1153-6.
723. Maeda T, Takekawa M, Saito H. Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science*. 1995;269:554-8.
724. Rosette C, Karin M. Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science*. 1996;274:1194-7.
725. Adler V, Fuchs SY, Kim J, Kraft A, King MP, Pelling J, Ronai Z. Jun-NH2-terminal kinase activation mediated by UV-induced DNA lesions in melanoma and fibroblast cells. *Cell Growth Differ*. 1995;6:1437-46.
726. Devary Y, Rosette C, DiDonato JA, Karin M. NF-kappa B activation by ultraviolet light not dependent on a nuclear signal. *Science*. 1993;261:1442-5.

727. Han J, Lee JD, Jiang Y, Li Z, Feng L, Ulevitch RJ. Characterization of the structure and function of a novel MAP kinase kinase (MKK6). *J Biol Chem.* 1996;271:2886-91.
728. Lawler S, Fleming Y, Goedert M, Cohen P. Synergistic activation of SAPK1/JNK1 by two MAP kinase kinases in vitro. *Curr Biol.* 1998;8:1387-90.
729. Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms [published erratum appears in Science 1995 Jul 7;269(5220):17]. *Science.* 1995;267:682-5.
730. Cuenda A, Alonso G, Morrice N, Jones M, Meier R, Cohen P, Nebreda AR. Purification and cDNA cloning of SAPKK3, the major activator of RK/p38 in stress- and cytokine-stimulated monocytes and epithelial cells. *Embo J.* 1996;15:4156-64.
731. Raingeaud J, Whitmarsh AJ, Barrett T, Derijard B, Davis RJ. MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen- activated Proteinkinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol.* 1996;16:1247-55.
732. Sanchez I, Hughes RT, Mayer BJ, Yee K, Woodgett JR, Avruch J, Kyriakis JM, Zon LI. Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. *Nature.* 1994;372:794-8.
733. Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science.* 1995;267:682-5.
734. Lin A, Minden A, Martinetto H, Claret FX, Lange-Carter C, Mercurio F, Johnson GL, Karin M. Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2. *Science.* 1995;268:286-90.
735. Tournier C, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Barrett T, Davis RJ. Mitogen-activated Proteinkinase kinase 7 is an activator of the c-Jun NH2-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:7337-42.
736. Ludwig S, Engel K, Hoffmeyer A, Sithanandam G, Neufeld B, Palm D, Gaestel M, Rapp UR. 3pK, a novel mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated Proteinkinase, is targeted by three MAP kinase pathways. *Mol Cell Biol.* 1996;16:6687-97.
737. Meier R, Rouse J, Cuenda A, Nebreda AR, Cohen P. Cellular stresses and cytokines activate multiple mitogen-activated- Proteinkinase kinase homologues in PC12 and KB cells. *Eur J Biochem.* 1996;236:796-805.
738. Moriguchi T, Kawasaki H, Matsuda S, Gotoh Y, Nishida E. Evidence for multiple activators for stress-activated Proteinkinase/c- Jun amino-terminal kinases. Existence of novel activators. *J Biol Chem.* 1995;270:12969-72.
739. Zanke BW, Boudreau K, Rubie E, Winnett E, Tibbles LA, Zon L, Kyriakis J, Liu FF, Woodgett JR. The stress-activated Proteinkinase pathway mediates cell death following injury induced by cis-platinum, UV irradiation or heat. *Curr Biol.* 1996;6:606-13.
740. Yan M, Dai T, Deak JC, Kyriakis JM, Zon LI, Woodgett JR, Templeton DJ. Activation of stress-activated Proteinkinase by MEKK1 phosphorylation of its activator SEK1. *Nature.* 1994;372:798-800.
741. Yan M, Templeton DJ. Identification of 2 serine residues of MEK-1 that are differentially phosphorylated during activation by raf and MEK kinase. *J Biol Chem.* 1994;269:19067-73.

742. Zanke BW, Rubie EA, Winnett E, Chan J, Randall S, Parsons M, Boudreau K, McInnis M, Yan M, Templeton DJ, Woodgett JR. Mammalian mitogen-activated Proteinkinase pathways are regulated through formation of specific kinase-activator complexes. *J Biol Chem.* 1996;271:29876-81.
743. Herskowitz I. MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell.* 1995;80:187-97.
744. Posas F, Saito H. Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science.* 1997;276:1702-5.
745. Wang XS, Diener K, Tan TH, Yao Z. MAPKKK6, a novel mitogen-activated Proteinkinase kinase kinase, that associates with MAPKKK5. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;253:33-7.
746. Rana A, Gallo K, Godowski P, Hirai S, Ohno S, Zon L, Kyriakis JM, Avruch J. The mixed lineage kinase SPRK phosphorylates and activates the stress-activated Proteinkinase activator, SEK-1. *J Biol Chem.* 1996;271:19025-8.
747. Tibbles LA, Ing YL, Kiefer F, Chan J, Iscove N, Woodgett JR, Lassam NJ. MLK-3 activates the SAPK/JNK and p38/RK pathways via SEK1 and MKK3/6. *Embo J.* 1996;15:7026-35.
748. Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science.* 1994;265:808-11.
749. Chen YR, Wang X, Templeton D, Davis RJ, Tan TH. The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. *J Biol Chem.* 1996;271:31929-36.
750. Kuroki DW, Bignami GS, Wattenberg EV. Activation of stress-activator Proteinkinase/c-Jun N-terminal kinase by the non-TPA-type tumor promoter palytoxin. *Cancer Res.* 1996;56:637-44.
751. Kyriakis JM, Avruch J. pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine Proteinkinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *J Biol Chem.* 1990;265:17355-63.
752. Kyriakis JM, Brautigan DL, Ingebritsen TS, Avruch J. pp54 microtubule-associated protein-2 kinase requires both tyrosine and serine/threonine phosphorylation for activity. *J Biol Chem.* 1991;266:10043-6.
753. Mukhopadhyay NK, Price DJ, Kyriakis JM, Pelech S, Sanghera J, Avruch J. An array of insulin-activated, proline-directed serine/threonine Proteokinases phosphorylate the p70 S6 kinase. *J Biol Chem.* 1992;267:3325-35.
754. Pulverer BJ, Kyriakis JM, Avruch J, Nikolakaki E, Woodgett JR. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature.* 1991;353:670-4.
755. Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Derijard B, Davis RJ. Selective interaction of JNK Proteinkinase isoforms with transcription factors. *Embo J.* 1996;15:2760-70.
756. Dai T, Rubie E, Franklin CC, Kraft A, Gillespie DA, Avruch J, Kyriakis JM, Woodgett JR. Stress-activated Proteokinases bind directly to the delta domain of c-Jun in resting cells: implications for repression of c-Jun function. *Oncogene.* 1995;10:849-55.
757. Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Hunt T, Nebreda AR. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell.* 1994;78:1027-37.

758. Freshney NW, Rawlinson L, Guesdon F, Jones E, Cowley S, Hsuan J, Saklatvala J. Interleukin-1 activates a novel Proteinkinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell*. 1994;78:1039-49.
759. Armstrong SC, Delacey M, Ganote CE. Phosphorylation state of hsp27 and p38 MAPK during preconditioning and protein phosphatase inhibitor protection of rabbit cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31:555-567.
760. Dana A, Skarli M, Papakrivopoulou J, Yellon DM. Adenosine A(1) receptor induced delayed preconditioning in rabbits: induction of p38 mitogen-activated Proteinkinase activation and Hsp27 phosphorylation via a tyrosine kinase- and Proteinkinase C-dependent mechanism. *Circ Res*. 2000;86:989-97.
761. Hedges JC, Dechert MA, Yamboliev IA, Martin JL, Hickey E, Weber LA, Gerthoffer WT. A role for p38(MAPK)/HSP27 pathway in smooth muscle cell migration. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274:24211-9.
762. Huot J, Lambert H, Lavoie JN, Guimond A, Houle F, Landry J. Characterization of 45-kDa/54-kDa HSP27 kinase, a stress-sensitive kinase which may activate the phosphorylation-dependent protective function of mammalian 27-kDa heat-shock protein HSP27. *European Journal of Biochemistry*. 1995;227:416-27.
763. Huot J, Houle F, Spitz DR, Landry J. HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Research*. 1996;56:273-9.
764. Martin JL, Hickey E, Weber LA, Dillmann WH, Mestril R. Influence of phosphorylation and oligomerization on the protective role of the small heat shock protein 27 in rat adult cardiomyocytes. *Gene Expression*. 1999;7:349-55.
765. Hanks SK, Hunter T. Proteinkinases 6. The eukaryotic Proteinkinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB Journal*. 1995;9:576-96.
766. Hanks SK, Quinn AM, Hunter T. The Proteinkinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*. 1988;241:42-52.
767. Adams RH, Porras A, Alonso G, Jones M, Vintersten K, Panelli S, Valladares A, Perez L, Klein R, Nebreda AR. Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. *Mol Cell*. 2000;6:109-16.
768. Lin Q, Schwarz J, Bucana C, Olson EN. Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science*. 1997;276:1404-7.
769. Wang Z, Canagarajah BJ, Boehm JC, Kassisa S, Cobb MH, Young PR, Abdel-Meguid S, Adams JL, Goldsmith EJ. Structural basis of inhibitor selectivity in MAP kinases. *Structure*. 1998;6:1117-28.
770. Lisnock J, Tebben A, Frantz B, O'Neill EA, Croft G, O'Keefe SJ, Li B, Hacker C, de Laszlo S, Smith A, Libby B, Liverton N, Hermes J, LoGrasso P. Molecular basis for p38 Proteinkinase inhibitor specificity. *Biochemistry*. 1998;37:16573-81.
771. Adams JL, Boehm JC, Gallagher TF, Kassis S, Webb EF, Hall R, Sorenson M, Garigipati R, Griswold DE, Lee JC. Pyrimidinylimidazole inhibitors of p38: cyclic N-1 imidazole substituents enhance p38 kinase inhibition and oral activity. *Bioorg Med Chem Lett*. 2001;11:2867-70.
772. Adams JL, Boehm JC, Kassis S, Gorycki PD, Webb EF, Hall R, Sorenson M, Lee JC, Ayrton A, Griswold DE, Gallagher TF. Pyrimidinylimidazole inhibitors of CSBP/p38 kinase demonstrating decreased inhibition of hepatic cytochrome P450 enzymes. *Bioorg Med Chem Lett*. 1998;8:3111-6.

773. Young PR, McLaughlin MM, Kumar S, Kassis S, Doyle ML, McNulty D, Gallagher TF, Fisher S, McDonnell PC, Carr SA, Huddleston MJ, Seibel G, Porter TG, Livi GP, Adams JL, Lee JC. Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 MAPK kinase bind in the ATP site. *J Biol Chem.* 1997;272:12116-12121.
774. Kalmes A, Deou J, Clowes AW, Daum G. Raf-1 is activated by the p38 mitogen-activated Protein kinase inhibitor, SB203580. *FEBS Letts.* 1999;444:71-74.
775. Fox T, Coll JT, Xie X, Ford PJ, Germann UA, Porter MD, Pazhanisamy S, Fleming MA, Galullo V, Su MS, Wilson KP. A single amino acid substitution makes ERK2 susceptible to pyridinyl imidazole inhibitors of p38 MAP kinase. *Protein Science.* 1998;7:2249-55.
776. Lali FV, Hunt AE, Turner SJ, Foxwell BM. The pyridinyl imidazole inhibitor SB203580 blocks phosphoinositide-dependent Protein kinase activity, Protein kinase B phosphorylation, and retinoblastoma hyperphosphorylation in interleukin-2-stimulated T cells independently of p38 mitogen-activated Protein kinase. *Journal of Biological Chemistry.* 2000;275:7395-402.
777. Clerk A, Sugden PH. The p38-MAPK inhibitor, SB203580, inhibits cardiac stress-activated Protein kinases/c-Jun N-terminal kinases (SAPKs/JNKs). *FEBS Letters.* 1998;426:93-6.
778. Arozarena I, Aaronson DS, Matallanas D, Sanz V, Ajenjo N, Tenbaum SP, Teramoto H, Ighishi T, Zabala JC, Gutkind JS, Crespo P. The Rho family GTPase Cdc42 regulates the activation of Ras/MAP kinase by the exchange factor Ras-GRF. *J Biol Chem.* 2000;275:26441-8.
779. Lancaster CA, Taylor-Harris PM, Self AJ, Brill S, van Erp HE, Hall A. Characterization of rhoGAP. A GTPase-activating protein for rho-related small GTPases. *J Biol Chem.* 1994;269:1137-42.
780. Barfod ET, Zheng Y, Kuang WJ, Hart MJ, Evans T, Cerione RA, Ashkenazi A. Cloning and expression of a human CDC42 GTPase-activating protein reveals a functional SH3-binding domain. *J Biol Chem.* 1993;268:26059-62.
781. Garrett MD, Major GN, Totty N, Hall A. Purification and N-terminal sequence of the p21rho GTPase-activating protein, rho GAP. *Biochem J.* 1991;276:833-6.
782. Diekmann D, Brill S, Garrett MD, Totty N, Hsuan J, Monfries C, Hall C, Lim L, Hall A. Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac. *Nature.* 1991;351:400-2.
783. Joneson T, McDonough M, Bar-Sagi D, Van Aelst L. RAC regulation of actin polymerization and proliferation by a pathway distinct from Jun kinase. *Science.* 1996;274:1374-6.
784. Kheradmand F, Werner E, Tremble P, Symons M, Werb Z. Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change. *Science.* 1998;280:898-902.
785. Manser E, Leung T, Salihuddin H, Zhao ZS, Lim L. A brain serine/threonine Protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature.* 1994;367:40-6.
786. Moore KA, Sethi R, Doanes AM, Johnson TM, Pracyk JB, Kirby M, Irani K, Goldschmidt-Clermont PJ, Finkel T. Rac1 is required for cell proliferation and G2/M progression. *Biochem J.* 1997;326:17-20.
787. Van Aelst L, Joneson T, Bar-Sagi D. Identification of a novel Rac1-interacting protein involved in membrane ruffling. *Embo J.* 1996;15:3778-86.
788. Nobes CD, Hall A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell.* 1995;81:53-62.

789. Didsbury J, Weber RF, Bokoch GM, Evans T, Snyderman R. rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *J Biol Chem*. 1989;264:16378-82.
790. Aktories K. Rho proteins: targets for bacterial toxins. *Trends Microbiol*. 1997;5:282-8.
791. Aktories K. Bacterial toxins that target Rho proteins. *J Clin Invest*. 1997;99:827-9.
792. Aktories K, Schmidt G, Just I. Rho GTPases as targets of bacterial protein toxins. *Biol Chem*. 2000;381:421-6.
793. Barth H, Blocker D, Behlke J, Bergsma-Schutter W, Brisson A, Benz R, Aktories K. Cellular uptake of Clostridium botulinum C2 toxin requires oligomerization and acidification. *J Biol Chem*. 2000;275:18704-11.
794. Krall R, Schmidt G, Aktories K, Barbieri JT. Pseudomonas aeruginosa ExoT is a Rho GTPase-activating protein. *Infect Immun*. 2000;68:6066-8.
795. Von Pawel-Rammigen U, Telepnev MV, Schmidt G, Aktories K, Wolf-Watz H, Rosqvist R. GAP activity of the Yersinia YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure. *Mol Microbiol*. 2000;36:737-48.
796. Lerm M, Schmidt G, Aktories K. Bacterial protein toxins targeting rho GTPases. *FEMS Microbiol Lett*. 2000;188:1-6.
797. Blocker D, Barth H, Maier E, Benz R, Barbieri JT, Aktories K. The C terminus of component C2II of Clostridium botulinum C2 toxin is essential for receptor binding. *Infect Immun*. 2000;68:4566-73.
798. Brown JL, Stowers L, Baer M, Trejo J, Coughlin S, Chant J. Human Ste20 homologue hPAK1 links GTPases to the JNK MAP kinase pathway. *Curr Biol*. 1996;6:598-605.
799. Galisteo ML, Chernoff J, Su YC, Skolnik EY, Schlessinger J. The adaptor protein Nck links receptor tyrosine kinases with the serine- threonine kinase Pak1. *J Biol Chem*. 1996;271:20997-1000.
800. Knaus UG, Morris S, Dong HJ, Chernoff J, Bokoch GM. Regulation of human leukocyte p21-activated kinases through G protein-- coupled receptors. *Science*. 1995;269:221-3.
801. Martin GA, Bollag G, McCormick F, Abo A. A novel serine kinase activated by rac1/CDC42Hs-dependent autophosphorylation is related to PAK65 and STE20. *Embo J*. 1995;14:1970-8.
802. Bagrodia S, Derijard B, Davis RJ, Cerione RA. Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen- activated Proteinkinase activation. *J Biol Chem*. 1995;270:27995-8.
803. Bokoch GM, Wang Y, Bohl BP, Sells MA, Quilliam LA, Knaus UG. Interaction of the Nck adapter protein with p21-activated kinase (PAK1). *J Biol Chem*. 1996;271:25746-9.
804. Sanders LC, Matsumura F, Bokoch GM, de Lanerolle P. Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. *Science*. 1999;283:2083-5.
805. Mukai H, Ono Y. A novel Proteinkinase with leucine zipper-like sequences: its catalytic domain is highly homologous to that of Proteinkinase C. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;199:897-904.
806. Amano M, Mukai H, Ono Y, Chihara K, Matsui T, Hamajima Y, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. Identification of a putative target for Rho as the serine-threonine kinase Proteinkinase N. *Science*. 1996;271:648-50.

807. Watanabe G, Saito Y, Madaule P, Ishizaki T, Fujisawa K, Morii N, Mukai H, Ono Y, Kakizuka A, Narumiya S. Proteinkinase N (PKN) and PKN-related protein rhophilin as targets of small GTPase Rho. *Science*. 1996;271:645-8.
808. Lamarche N, Tapon N, Stowers L, Burbelo PD, Aspenstrom P, Bridges T, Chant J, Hall A. Rac and Cdc42 induce actin polymerization and G1 cell cycle progression independently of p65PAK and the JNK/SAPK MAP kinase cascade. *Cell*. 1996;87:519-29.
809. Treisman R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol*. 1996;8:205-15.
810. Karin M, Liu Z, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 1997;9:240-6.
811. Kallunki T, Deng T, Hibi M, Karin M. c-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions. *Cell*. 1996;87:929-39.
812. Bos TJ, Bohmann D, Tsuchie H, Tjian R, Vogt PK. v-jun encodes a nuclear protein with enhancer binding properties of AP-1. *Cell*. 1988;52:705-12.
813. Dony C, Gruss P. Proto-oncogene c-fos expression in growth regions of fetal bone and mesodermal web tissue. *Nature*. 1987;328:711-4.
814. Glover JN, Harrison SC. Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature*. 1995;373:257-61.
815. Colotta F, Polentarutti N, Sironi M, Mantovani A. Expression and involvement of c-fos and c-jun protooncogenes in programmed cell death induced by growth factor deprivation in lymphoid cell lines. *J Biol Chem*. 1992;267:18278-83.
816. Sato M, Bagchi D, Tosaki A, Das DK. Grape seed proanthocyanidin reduces cardiomyocyte apoptosis by inhibiting ischemia/reperfusion-induced activation of JNK-1 and C-JUN. *Free Radic Biol Med*. 2001;31:729-37.
817. Ueyama T, Umemoto S, Senba E. Immobilization stress induces c-fos and c-jun immediate early genes expression in the heart. *Life Sci*. 1996;59:339-47.
818. Hreniuk D, Garay M, Gaarde W, Monia BP, McKay RA, Cioffi CL. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase 1, but not c-Jun N-terminal kinase 2, suppresses apoptosis induced by ischemia/reoxygenation in rat cardiac myocytes. *Mol Pharmacol*. 2001;59:867-874.
819. Mizukami Y, Okamura T, Miura T, Kimura M, Mogami K, Todoroki-Ikeda N, Kobayashi S, Matsuzaki M. Phosphorylation of proteins and apoptosis induced by c-Jun N-terminal kinase1 activation in rat cardiomyocytes by H₂O₂ stimulation. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1540:213-20.
820. Pollack PS, Pasquarello LM, Budjak R, Fernandez E, Soprano KJ, Redfern BG, Goldman B. Differential expression of c-jun and junD in end-stage human cardiomyopathy. *J Cell Biochem*. 1997;65:245-53.
821. Chae HJ, So HS, Chae SW, Park JS, Kim MS, Oh JM, Chung YT, Yang SH, Jeong ET, Kim HM, Park RK, Kim HR. Sodium nitroprusside induces apoptosis of H9C2 cardiac muscle cells in a c-Jun N-terminal kinase-dependent manner. *Int Immunopharmacol*. 2001;1:967-78.
822. Ben-Levy R, Leighton IA, Doza YN, Attwood P, Morrice N, Marshall CJ, Cohen P. Identification of novel phosphorylation sites required for activation of MAPKAP kinase-2. *Embo J*. 1995;14:5920-30.
823. Stokoe D, Engel K, Campbell DG, Cohen P, Gaestel M. Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS Lett*. 1992;313:307-13.

824. Stokoe D, Campbell DG, Nakielny S, Hidaka H, Leever SJ, Marshall C, Cohen P. MAPKAP kinase-2; a novel Proteinkinase activated by mitogen-activated Proteinkinase. *Embo J.* 1992;11:3985-94.
825. McLaughlin MM, Kumar S, McDonnell PC, Van Horn S, Lee JC, Livi GP, Young PR. Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated Proteinkinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase. *J Biol Chem.* 1996;271:8488-92.
826. Huot J, Houle F, Marceau F, Landry J. Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated Proteinkinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circulation Research.* 1997;80:383-92.
827. New L, Jiang Y, Zhao M, Liu K, Zhu W, Flood LJ, Kato Y, Parry GC, Han J. PRAK, a novel Proteinkinase regulated by the p38 MAP kinase. *EMBO Journal.* 1998;17:3372-84.
828. Gupta S, Campbell D, Derijard B, Davis RJ. Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science.* 1995;267:389-93.
829. Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:707-47.
830. Breitbart RE, Liang CS, Smoot LB, Laheru DA, Mahdavi V, Nadal-Ginard B. A fourth human MEF2 transcription factor, hMEF2D, is an early marker of the myogenic lineage. *Development.* 1993;118:1095-106.
831. Ikeshima H, Imai S, Shimoda K, Hata J, Takano T. Expression of a MADS box gene, MEF2D, in neurons of the mouse central nervous system: implication of its binary function in myogenic and neurogenic cell lineages. *Neurosci Lett.* 1995;200:117-20.
832. Mao Z, Bonni A, Xia F, Nadal-Vicens M, Greenberg ME. Neuronal activity-dependent cell survival mediated by transcription factor MEF2. *Science.* 1999;286:785-90.
833. Chow CW, Rincon M, Cavanagh J, Dickens M, Davis RJ. Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway. *Science.* 1997;278:1638-41.
834. Han J, Jiang Y, Li Z, Kravchenko VV, Ulevitch RJ. Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature.* 1997;386:296-9.
835. Zhao M, New L, Kravchenko VV, Kato Y, Gram H, di Padova F, Olson EN, Ulevitch RJ, Han J. Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38. *Molecular & Cellular Biology.* 1999;19:21-30.
836. Pollock R, Treisman R. Human SRF-related proteins: DNA-binding properties and potential regulatory targets. *Genes Dev.* 1991;5:2327-41.
837. Kato Y, Kravchenko VV, Tapping RI, Han J, Ulevitch RJ, Lee JD. BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *EMBO Journal.* 1997;16:7054-66.
838. Zhu J, Shibasaki F, Price R, Guillemot JC, Yano T, Dotsch V, Wagner G, Ferrara P, McKeon F. Intramolecular masking of nuclear import signal on NF-AT4 by casein kinase I and MEKK1. *Cell.* 1998;93:851-61.
839. Morooka H, Bonventre JV, Pombo CM, Kyriakis JM, Force T. Ischemia and reperfusion enhance ATF-2 and c-Jun binding to cAMP response elements and to an AP-1 binding site from the c-jun promoter. *J Biol Chem.* 1995;270:30084-92.
840. van Dam H, Wilhelm D, Herr I, Steffen A, Herrlich P, Angel P. ATF-2 is preferentially activated by stress-activated Proteinkinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. *EMBO Journal.* 1995;14:1798-811.

841. van Dam H, Duyndam M, Rottier R, Bosch A, de Vries-Smits L, Herrlich P, Zantema A, Angel P, van der Eb AJ. Heterodimer formation of cJun and ATF-2 is responsible for induction of c-jun by the 243 amino acid adenovirus E1A protein. *EMBO Journal*. 1993;12:479-87.
842. Sugden PH, Clerk A. Cell stresses regulate the phosphorylation state of c-Jun and ATF2 in ventricular myocytes. *Biochemical Society Transactions*. 1997;25:221S.
843. Clerk A, Sugden PH. Cell stress-induced phosphorylation of ATF2 and c-Jun transcription factors in rat ventricular myocytes. *Biochemical Journal*. 1997;325:801-10.
844. Kawasaki H, Schiltz L, Chiu R, Itakura K, Taira K, Nakatani Y, Yokoyama KK. ATF-2 has intrinsic histone acetyltransferase activity which is modulated by phosphorylation. *Nature*. 2000;405:195-200.
845. Jennings RB, Ganote CE, Reimer KA. Ischemic tissue injury. *Am J Pathol*. 1975;81:179-98.
846. Jennings RB, Murry CE, Reimer KA. Energy metabolism in preconditioned and control myocardium: effect of total ischemia. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1991;23:1449-58.
847. Schaper J. Ultrastructural changes of the myocardium in regional ischemia and infarction. *Eur Heart J*. 1986;7 (Suppl B):3-9.
848. Schaper J, Hein S, Heinrichs CM, Weihrauch D. Myocardial injury and repair. In: Parratt JM, ed. *Myocardial Response to Acute Injury*. London: Macmillan Press; 1992:1-16.
849. Schaper W. The collateral circulation of the heart. *Eur Heart J*. 1987;8 (Suppl I):2 (abstr).
850. Buja LM. Modulation of the myocardial response to ischemia. *Lab Invest*. 1998;78:1345-73.
851. Theroux P. Protection of the myocardial cell during ischemia. *Am J Cardiol*. 1999;83:3G-9G.
852. Reimer KA, Jennings RB. *Myocardial ischemia, hypoxia, and infarction*. New York: Raven Press; 1992.
853. Reimer KA, Murry CE, Jennings RB. Cardiac adaptation to ischemia. *Circulation*. 1990;82:2266-2268.
854. Kubler W, Spieckermann PG. Regulation of glycolysis in the ischemic and the anoxic myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 1970;1:351-77.
855. Braasch W, Gudbjarnason S, Puri PS, Ravens KG, Bing RJ. Early changes in energy metabolism in the myocardium following acute coronary artery occlusion in anesthetized dogs. *Circ Res*. 1968;23:429-38.
856. Rovetto MJ, Whitmer JT, Neely JR. Comparison of the effects of anoxia and whole heart ischemia on carbohydrate utilization in isolated working rat hearts. *Circ Res*. 1973;32:699-711.
857. Neely JR, Liedtke AJ, Whitmer JT, Rovetto MJ. Relationship between coronary flow and adenosine triphosphate production from glycolysis and oxidative metabolism. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab*. 1975;8:301-21.
858. Jennings RB, Reimer KA. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med*. 1991;42:225-46.
859. Jennings RB, Reimer KA, Steenbergen C. Effect of inhibition of the mitochondrial ATPase on net myocardial ATP in total ischemia. *J Mol Cell Cardiol*. 1991;23:1383-95.

860. Jennings RB, Reimer KA, Steenbergen C. Myocardial ischemia revisited. The osmolar load, membrane damage, and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 1986;18:769-80.
861. Hill JL, Gettes LS. Effect of acute coronary artery occlusion on local myocardial extracellular K⁺ activity in swine. *Circulation.* 1980;61:768-78.
862. Kleber AG. Resting membrane potential, extracellular potassium activity, and intracellular sodium activity during acute global ischemia in isolated perfused guinea pig hearts. *Circ Res.* 1983;52:442-50.
863. Steenbergen C, Murphy E, Levy L, London RE. Elevation in cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat heart. *Circ Res.* 1987;60:700-7.
864. Steenbergen C, Hill ML, Jennings RB. Cytoskeletal damage during myocardial ischemia: changes in vinculin immunofluorescence staining during total in vitro ischemia in canine heart. *Circ Res.* 1987;60:478-86.
865. Steenbergen C, Hill ML, Jennings RB. Volume regulation and plasma membrane injury in aerobic, anaerobic, and ischemic myocardium in vitro. Effects of osmotic cell swelling on plasma membrane integrity. *Circ Res.* 1985;57:864-75.
866. Trantum-Jensen J, Janse MJ, Fiolet WT, Krieger WJ, D'Alnoncourt CN, Durrer D. Tissue osmolality, cell swelling, and reperfusion in acute regional myocardial ischemia in the isolated porcine heart. *Circ Res.* 1981;49:364-81.
867. Schaper J. Die Ultrastruktur des Myokards bei Ischaemie. In: Gießen; 1980.
868. Schaper J. Ultrastructural abnormalities in ischemic heart disease. *J Mol Cell Cardiol.* 1986;18 (Suppl III):61 (abstr).
869. Schaper J. The role of leukocytes in myocardial ischemia. In: *J Mol Cell Cardiol*; 1991:24 (abstr).
870. Jennings RB, Reimer KA, Kinney RB, Steenbergen C, Sharov VG. Sarcolemmal damage in ischemia. In: *Myocardial Metabolism*; 1987:120-54.
871. Ganote CE, Vander Heide RS. Cytoskeletal lesions in anoxic myocardial injury. A conventional and high-voltage electron-microscopic and immunofluorescence study. *Am J Pathol.* 1987;129:327-44.
872. Schaper W. Die Pathophysiologie der Reperfusion. *Z Kardiol.* 1986;75 (Suppl 5):73-76.
873. Schaper J. *Effects of reperfusion on ischemic myocardium.* Mahwah; 1987.
874. Jennings RB, Schaper J, Hill ML, Steenbergen Jr C, Reimer KA. Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury. Changes in cell volume, electrolytes, metabolites, and ultrastructure. *Circ Res.* 1985;56:262-278.
875. Karmazyn M, Gan XT, Humphreys RA, Yoshida H, Kusumoto K. The myocardial Na⁺/H⁺ exchange: structure, regulation, and its role in heart disease. *Circ Res.* 1999;85:777-786.
876. Shen AC, Jennings RB. Myocardial calcium and magnesium in acute ischemic injury. *Am J Pathol.* 1972;67:417-440.
877. Jennings RB. Calcium ions in ischemia. In: *Calcium Antagonists and Cardiovascular Disease*; 1984:85-95.
878. Tani M. Mechanisms of Ca²⁺ overload in reperfused ischemic myocardium. *Annu Rev Physiol.* 1990;52:543-559.
879. Tani M, Neely JR. Role of intracellular Na⁺ in Ca²⁺ overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H⁺-Na⁺ and Na⁺-Ca²⁺ exchange. *Circ Res.* 1989;65:1045-56.

880. Whalen DA, Hamilton DG, Ganote CE, Jennings RB. Effect of a transient period of ischemia on myocardial cells. Effect on cell volume regulation. *Am J Pathol.* 1974;74:381-389.
881. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg.* 1994;81:637-47.
882. Elsasser A, Suzuki K, Lorenz-Meyer S, Bode C, Schaper J. The role of apoptosis in myocardial ischemia: a critical appraisal. *Basic Res Cardiol.* 2001;96:219-26.
883. Freude B, Masters TN, Robicsek F, Fokin A, Kostin S, Zimmermann R, Ullmann C, Lorenz-Meyer S, Schaper J. Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32:197-208.
884. Schaper J, Lorenz-Meyer S, Suzuki K. The role of apoptosis in dilated cardiomyopathy. *Herz.* 1999;24:219-24.
885. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol.* 1986;250:G749-53.
886. Schott RJ, Schaper W. Ischemic preconditioning and myocardial stunning: related consequences of brief coronary occlusion and reperfusion? *Advances in Cardiology.* 1990;37:32-41.
887. Kloner RA, Bolli R, Marban E, Reinlib L, Braunwald E. Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop. *Circulation.* 1998;97:1848-67.
888. Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation.* 1982;66:1146-9.
889. Gao WD, Atar D, Backx PH, Marban E. Relationship between intracellular calcium and contractile force in stunned myocardium. Direct evidence for decreased myofilament Ca²⁺ responsiveness and altered diastolic function in intact ventricular muscle. *Circ Res.* 1995;76:1036-48.
890. Bolli R, Patel BS, Jeroudi MO, Lai EK, McCay PB. Demonstration of free radical generation in "stunned" myocardium of intact dogs with the use of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butyl nitron. *J Clin Invest.* 1988;82:476-85.
891. Bolli R, Marban E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev.* 1999;79:609-34.
892. Bolli R. Mechanism of myocardial "stunning". *Circulation.* 1990;82:723-38.
893. Schaper W. Stunned myocardium, an opinionated review. *Basic Res Cardiol.* 1995;90:273-275.
894. Dana A, Walker M. Acute myocardial infarction. Extended review [see comments]. *Journal of the Royal College of Physicians of London.* 1999;33:131-40.
895. Schaper W, Winkler B. The energetic base of myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 1986;18 (Suppl I):364 (abstr).
896. Schaper W, Nienaber C, Gottwik MG. The importance of the collateral circulation for myocardial survival. *Acta Med Scand (Suppl).* 1981;651:29-34.
897. Schaper W, Bernotat-Danielowski S, Nienaber C, Schaper J. Collateral circulation. In: Fozzard H, Haber E, Jennings R, Katz A, Morgan H, eds. *The Heart and Cardiovascular System.* New York: Raven Press; 1992:1427-1464.
898. Schaper W, Gorge G, Winkler B, Schaper J. The collateral circulation of the heart. *Progr Cardiovasc Dis.* 1988;31:57-77.
899. Schott R, Braun E, Rohmann S, Schaper W. Stunning enhances regional metabolic recovery following 60' of coronary occlusion in pigs. *J Mol Cell Cardiol.* 1989;21 (Suppl IV):FC22 (abstr).

900. Schaper J, Schaper W. Time course of myocardial necrosis. *Cardiovasc Drugs and Therapy*. 1988;2:17-25.
901. Schaper J, Schaper W, Winkler B. The collateral circulation of the heart. *J Mol Cell Cardiol*. 1986;18 (Suppl I):60 (abstr).
902. Bessis MC. Death of a Cell. *Swift Motion Picture Laboratories*. 1958.
903. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*. 1995;146:3-15.
904. Lazda EJ, Batchelor WH, Cox PM. Immunohistochemical detection of myocardial necrosis in stillbirth and neonatal death. *Pediatr Dev Pathol*. 2000;3:40-7.
905. Buja LM, Eigenbrodt ML, Eigenbrodt EH. Apoptosis and necrosis. *Arch Pathol Lab Med*. 1993;117:1208-1214.
906. Flemming W. Über die Bildung von Richtfiguren in Säugetiereiern beim Übergang Graafscher Follikel. *Arch Anat Entw Gesch*. 1885:221-244.
907. Kerr JF. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol*. 1971;105:13-20.
908. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26:239-57.
909. King KL, Cidlowski JA. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol*. 1998;60:601-17.
910. Engler RL, Gottlieb RA. Programmed cell death: apoptosis and cardiovascular disease. *Dialogues in Cardiovascular Medicine*. 1998;3:67-80.
911. Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res*. 1998;82:1111-29.
912. Davies MJ. Apoptosis in cardiovascular disease. *Heart*. 1997;77:498-501.
913. Duke RC, Ojcius DM, Ding J. Die Apoptose-Regeln und Fehler beim Selbstmord. *Spektrum der Wissenschaften*. 1997:26-35.
914. Savill J. Apoptosis in disease. *Eur J Clin Invest*. 1994;24:715-23.
915. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*. 2000;45:528-37.
916. Storer RJ, Butler P, Hoskin KL, Goadsby PJ. A simple method, using 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin, of administering alpha-chloralose at room temperature. *J Neurosci Methods*. 1997;77:49-53.
917. Silverman J, Muir WWd. A review of laboratory animal anesthesia with chloral hydrate and chloralose. *Laboratory Animal Science*. 1993;43:210-6.
918. Vogt AM, Htun P, Arras M, Podzuweit T, Schaper W. Intramyocardial infusion of tool drugs for the study of molecular mechanisms in ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol*. 1996;91:389-400.
919. Bradford M. A rapid sensitive method for quantification of microgram of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-254.
920. Erickson AK, Payne DM, Martino PA, Rossomando AJ, Shabanowitz J, Weber MJ, Hunt DF, Sturgill TW. Identification by mass spectrometry of threonine 97 in bovine myelin basic protein as a specific phosphorylation site for mitogen-activated Protein kinase. *J Biol Chem*. 1990;265:19728-35.
921. Colangeli R. Three-step purification of lipopolysaccharide-free polyhistidine-tagged recombinant antigen of Mycobacterium tuberculosis. *J of Chromatography*. 1998;714:223-235.

922. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162:156-159.
923. Chevillard S. A method for sequential extraction of RNA and DNA from the same sample, specially designed for a limited supply of biological material. *BioTechniques.* 1993;15:22-24.
924. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning. *Laboratory Press.* 1989;Cold Spring Harbor.
925. Ibelgauf H. Gentechnologie von A-Z. 1993;1. Auflage.
926. Brown T. Gentechnologie für Einsteiger. 1993;Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
927. Hybond applications guide. *Amersham-Buchler GmbH & Co KG.* 2000;Braunschweig.
928. Zhou MY, Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE. Improved downward capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *BioTechniques.* 1994;16:58-59.
929. Podzuweit T, Braun W, Müller A, Schaper W. Arrhythmias and infarction in the ischemic pig heart are not mediated by xanthine oxidase-derived free oxygen radicals. *Circulation.* 1986;74 (Suppl II):II-346 (abstr).
930. Knöll R, Arras M, Zimmermann R, Schaper J, Schaper W. Changes in gene expression following short coronary occlusions studied in porcine hearts with run-on assays. *Cardiovasc Res.* 1994;28:1062-1069.
931. Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hoobs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM. Identification of a novel inhibitor of Mitogen-activated Proteinkinase Kinase. *J Biolchem.* 1998;273:18623-32.
932. Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR. PD 098059 is a specific inhibitor of activation of mitogen-activated Proteinkinase kinase *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem.* 1995;270: 27489-27494.
933. Duncia JV, Santella JBr, Higley CA, Pitts WJ, Wityak J, Frieze WE, Rankin FW, Sun JH, Earl RA, Tabaka AC, Teleha CA, Blom KF, Favata MF, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Horiuchi K, Copeland RA, Scherle PA, Trzaskos JM, Magolda RL, Trainor GL, Wexler RR, Hobbs FW, Olson RE. MEK inhibitors: the chemistry and biological activity of UO126, its analogs, and cyclization products. *Bioorg Med Chem Lett.* 1998;8:2839-44.
934. Dudley T, Pang,L., Decker, S.J., Bridges, A.J., Saltiel A.R. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated Proteinkinase cascade. *Proc Natl Acad Sci.* 1995;USA 95:7686-7689.
935. Dumont FJ, Staruch MJ, Fischer P, DaSilva C, Camacho R. Inhibition of T cell activation by pharmacologic disruption of the MEK1/ERK MAP kinase or calcineurin signaling pathways results in differential modulation of cytokine production. *J Immunol.* 1998;160:2579-89.
936. Downey J, Cohen M. Signal transduction in ischemic preconditioning. *Adv exp Med Biol.* 1997;430:39-55.
937. Kuroki M, O'Flaherty JT. Differential effects of a mitogen-activated Proteinkinase kinase inhibitor on human neutrophil responses to chemotactic factors. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;232:474-7.

938. Lazar DF, Wiese RJ, Brady MJ, Mastick CC, Waters SB, Yamauchi K, Pessin JE, Cuatrecasas P, Saltiel AR. Mitogen-activated Protein kinase inhibition does not block the stimulation of glucose utilization by insulin. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270:20801-7.
939. Servant MJ, Giasson E, Meloche S. Inhibition of growth factor-induced protein synthesis by a selective MEK inhibitor in aortic smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271:16047-52.
940. Post G, Goldstein D, Thuerauf D, Glembotski C, Brown J. Dissociation of p44 and p42 mitogen-activated Protein kinase activation from receptor-induced hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. *J Biol Chem*. 1996;271:8452-7.
941. Aoki H, Richmond M, Izumo S, Sadoshima J. Specific role of the extracellular signal-regulated kinase pathway in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in vitro. *Biochemical Journal*. 2000;347:275-84.
942. Yue TL, Ni J, Romanic AM, Gu JL, Keller P, Wang C, Kumar S, Yu GL, Hart TK, Wang X, Xia Z, DeWolf WE, Jr., Feuerstein GZ. TL1, a novel tumor necrosis factor-like cytokine, induces apoptosis in endothelial cells. Involvement of activation of stress Protein kinases (stress-activated Protein kinase and p38 mitogen-activated Protein kinase) and caspase-3-like protease. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274:1479-86.
943. Borsch-Haubold AG, Pasquet S, Watson SP. Direct inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 by the kinase inhibitors SB 203580 and PD 98059. SB 203580 also inhibits thromboxane synthase. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273:28766-72.
944. Wheeler-Jones CP, May MJ, Houlston RA, Pearson JD. Inhibition of MAP kinase kinase (MEK) blocks endothelial PGI₂ release but has no effect on von Willebrand factor secretion or E-selectin expression. *FEBS Letters*. 1996;388:180-4.
945. Simon C, Juarez J, Nicolson GL, Boyd D. Effect of PD 098059, a specific inhibitor of mitogen-activated Protein kinase kinase, on urokinase expression and in vitro invasion. *Cancer Research*. 1996;56:5369-74.
946. Shimizu N, Yoshiyama M, Omura T, Hanatani A, Kim S, Takeuchi K, Iwao H, Yoshikawa J. Activation of mitogen-activated Protein kinases and activator protein-1 in myocardial infarction in rats. *Cardiovascular Research*. 1998;38:116-24.
947. Seko Y, Takahashi N, Tobe K, Kadowaki T, Yazaki Y. Hypoxia and hypoxia/reoxygenation activate p65PAK, p38 mitogen-activated Protein kinase (MAPK), and stress-activated Protein kinase (SAPK) in cultured rat cardiac myocytes. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 1997;239:840-4.
948. Seko Y, Tobe K, Ueki K, Kadowaki T, Yazaki Y. Hypoxia and hypoxia/reoxygenation activate Raf-1, mitogen-activated Protein kinase kinase, mitogen-activated Protein kinases, and S6 kinase in cultured rat cardiac myocytes. *Circulation Research*. 1996;78:82-90.
949. Clerk A, Fuller SJ, Michael A, Sugden PH. Stimulation of "stress-regulated" mitogen-activated Protein kinases (stress-activated Protein kinases/c-Jun N-terminal kinases and p38-mitogen-activated Protein kinases) in perfused rat hearts by oxidative and other stresses. *J Biol Chem*. 1998;273:7228-7234.
950. Clerk A, Bogoyevitch MA, Anderson MB, Sugden PH. Differential activation of Protein kinase C isoforms by endothelin-1 and phenylephrine and subsequent stimulation of p42 and p44 mitogen-activated Protein kinases in ventricular myocytes cultured from neonatal rat hearts. *J Biol Chem*. 1994;269:32848-32857.

951. Bogoyevitch MA, Glennon PE, Sugden PH. Endothelin-1, phorbol esters and phenylephrine stimulate MAP kinase activities in ventricular cardiomyocytes. *FEBS Letters*. 1993;317:271-5.
952. Pombo CM, Bonventre JV, Avruch J, Woodgett JR, Kyriakis JM, Force T. The stress-activated Protein kinases are major c-Jun amino-terminal kinases activated by ischemia and reperfusion. *J Biol Chem*. 1994;269:26546-51.
953. Adderley SR, Fitzgerald DJ. Oxidative damage of cardiomyocytes is limited by extracellular regulated kinases 1/2-mediated induction of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*. 1999;274:5038-46.
954. Sheng Z, Knowlton K, Chen J, Hoshijima M, Brown JH, Chien KR. Cardiotrophin 1 (CT-1) inhibition of cardiac myocyte apoptosis via a mitogen-activated Protein kinase-dependent pathway. Divergence from downstream CT-1 signals for myocardial cell hypertrophy. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272:5783-91.
955. Bogoyevitch MA, Gillespie-Brown J, Ketterman AJ, Fuller SJ, Ben-Levy R, Ashworth A, Marshall CJ, Sugden PH. Stimulation of the stress-activated mitogen-activated Protein kinase subfamilies in perfused heart. p38/RK mitogen-activated Protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion. *Circulation Research*. 1996;79:162-73.
956. Marber MS. Ischemic preconditioning in isolated cells. *Circulation Research*. 2000;86:926-31.
957. Liu Y, Gao WD, O'Rourke B, Marban E. Cell-type specificity of preconditioning in an in vitro model. *Basic Res Cardiol*. 1996;91:450-7.
958. Punn A, Mockridge JW, Farooqui S, Marber MS, Heads RJ. Sustained activation of p42/p44 mitogen-activated Protein kinase during recovery from simulated ischaemia mediates adaptive cytoprotection in cardiomyocytes. *Biochemical Journal*. 2000;350:891-9.
959. Mocanu MM, Baxter GF, Yue Y, Critz SD, Yellon DM. The p38 MAPK inhibitor, SB203580, abrogates ischaemic preconditioning in rat heart but timing of administration is critical. *Basic Res Cardiol*. 2000;95:472-8.
960. Hall-Jackson CA, Goedert M, Hedge P, Cohen P. Effect of SB203580 on the activity of c-Raf in vitro and in vivo. *Oncogene*. 1999;18:2047-2054.
961. Barancik M, Htun P, Strohm C, Kilian S, Schaper W. Inhibition of the cardiac p38-MAPK pathway by SB203580 delays ischemic cell death. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000;35:474-483.
962. Barancik M, Htun P, Maeno Y, Zimmermann R, Schaper W. Differential regulation of distinct Protein kinase cascades by ischemia and ischemia/reperfusion in porcine myocardium. In: *Circulation*; 1997:1397 (abstr).
963. Knight RJ, Buxton DB. Stimulation of c-jun kinase and mitogen-activated Protein kinase by ischemia and reperfusion in the perfused rat hearts. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;218:83-88.
964. Lee JC, Kassis S, Kumar S, Badger A, Adams JL. p38 mitogen-activated Protein kinase inhibitors--mechanisms and therapeutic potentials. *Pharmacology & Therapeutics*. 1999;82:389-97.
965. Zhao TC, Hines DS, Kukreja RC. Adenosine-induced late preconditioning in mouse hearts: role of p38 MAP kinase and mitochondrial K(ATP) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H1278-85.

966. Feoktistov I, Goldstein AE, Biaggioni I. Role of p38 mitogen-activated Proteinkinase and extracellular signal- regulated Proteinkinase kinase in adenosine A2B receptor-mediated interleukin-8 production in human mast cells. *Mol Pharmacol*. 1999;55:726-34.
967. Adams JL, Badger AM, Kumar S, Lee JC. p38 MAP kinase: molecular target for the inhibition of pro-inflammatory cytokines. *Prog Med Chem*. 2001;38:1-60.
968. Clerk A, Michael A, Sugden PH. Stimulation of the p38 mitogen-activated Proteinkinase pathway in neonatal rat ventricular myocytes by the G protein-coupled receptor agonists, endothelin-1 and phenylephrine: a role in cardiac myocyte hypertrophy? *Journal of Cell Biology*. 1998;142:523-35.
969. Luss H, Neumann J, Schmitz W, Schulz R, Heusch G. The stress-responsive MAP kinase p38 is activated by low-flow ischemia in the in situ porcine heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32:1787-94.
970. Marais E, Genade S, Huisamen B, Strijdom JG, Moolman JA, Lochner A. Activation of p38 MAPK Induced by a Multi-cycle Ischaemic Preconditioning Protocol is Associated with Attenuated p38 MAPK Activity During Sustained Ischaemia and Reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33:769-778.
971. Gysembergh A, Simkhovich BZ, Kloner RA, Przyklenk K. p38 MAPK activity is not increased early during sustained coronary artery occlusion in preconditioned versus control rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33:681-690.
972. Wang X, Rao J, Studzinski GP. Inhibition of p38 MAP kinase activity up-regulates multiple MAP kinase pathways and potentiates 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced differentiation of human leukemia HL60 cells. *Experimental Cell Res*. 2000;258:425-437.
973. Ma XL, Kumar S, Gao F, Loudon CS, Lopez BL, Christopher TA, Wang C, Lee JC, Feuerstein GZ, Yue TL. Inhibition of p38 mitogen-activated Proteinkinase decreases cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function after myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation*. 1999;99:1685-91.
974. Maulik N, Sato M, Price BD, Das DK. An essential role of NFkappaB in tyrosine kinase signaling of p38 MAP kinase regulation of myocardial adaption to ischemia. *FEBS Lett*. 1998;429:365-369.
975. Weinbrenner C, Liu GS, Cohen MV, Downey JM. Phosphorylation of tyrosine 182 of p38 mitogen-activated Proteinkinase correlates with the protection of preconditioning in the rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29:2383-91.
976. Nakano A, Baines CP, Kim SO, Pelech SL, Downey JM, Cohen MV, Critz SD. Ischemic preconditioning activates MAPKAPK2 in the isolated rabbit heart: evidence for involvement of p38 MAPK. *Circ Res*. 2000;86:144-51.
977. Nakano A, Cohen MV, Critz S, Downey JM. SB 203580, an inhibitor of p38 MAPK, abolishes infarct-limiting effect of ischemic preconditioning in isolated rabbit hearts. *Basic Res Cardiol*. 2000;95:466-71.
978. Omura T, Yoshiyama M, Shimada T, Shimizu N, Kim S, Iwao H, Takeuchi K, Yoshikawa J. Activation of mitogen-activated Proteokinases in in vivo ischemia/reperfused myocardium in rats. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1999;31:1269-79.
979. Maulik N, Watanabe M, Zu YL, Huang CK, Cordis GA, Schley JA, Das DK. Ischemic preconditioning triggers the activation of MAP kinases and MAPKAP kinase 2 in rat hearts. *FEBS Lett*. 1996;396:233-7.

980. Mackay K, Mochly-Rosen D. Involvement of a p38 mitogen-activated Proteinkinase phosphatase in protecting neonatal rat cardiac myocytes from ischemia. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32:1585-1588.
981. Mackay K, Mochly-Rosen D. An inhibitor of p38 mitogen-activated Proteinkinase protects neonatal cardiac myocytes from ischemia. *J Biol Chem.* 1999;274:6272-9.
982. Lee JC, Kumar S, Griswold DE, Underwood DC, Votta BJ, Adams JL. Inhibition of p38 MAP kinase as a therapeutic strategy. *Immunopharmacology.* 2000;47:185-201.
983. Wang Y, Huang S, Sah VP, Ross J, Brown JH, Han J, Chien KR. Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated Proteinkinase family. *J Biol Chem.* 1998;273:2161-2168.
984. Ping P, Murphy E. Role of p38 mitogen-activated Proteokinases in preconditioning: a detrimental factor or a protective kinase? [comment]. *Circ Res.* 2000;86:921-922.
985. Conrad PW, Rust RT, Han J, Millhorn DE, Beitner-Johnson D. Selective activation of p38-alpha and p38-gamma by hypoxia. Role in regulation of cyclin D1 by hypoxia in PC12 cells. *J Biol Chem.* 1999;274:23570-6.
986. Lazou A, Bogoyevitch MA, Clerk A, Fuller SJ, Marshall CJ, Sugden PH. Regulation of mitogen-activated Proteinkinase cascade in adult rat heart preparations in vitro. *Circ Res.* 1994;75:932-941.
987. Jiang Y, Gram H, Zhao M, New L, Gu J, Feng L, Di Padova F, Ulevitch RJ, Han J. Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated Proteokinases, p38delta. *Journal of Biological Chemistry.* 1997;272:30122-8.
988. Maulik N, Yoshida T, Engelman RM, Deaton D, Flack JE, 3rd, Rousou JA, Das DK. Ischemic preconditioning attenuates apoptotic cell death associated with ischemia/reperfusion. *Mol Cell Biochem.* 1998;186:139-45.
989. Meldrum DR, Dinarello CA, Cleveland JC, Jr., Cain BS, Shames BD, Meng X, Harken AH. Hydrogen peroxide induces tumor necrosis factor alpha-mediated cardiac injury by a P38 mitogen-activated Proteinkinase-dependent mechanism. *Surgery.* 1998;124:291-6; discussion 297.
990. Meldrum DR, Dinarello CA, Shames BD, Cleveland JC, Jr., Cain BS, Banerjee A, Meng X, Harken AH. Ischemic preconditioning decreases postischemic myocardial tumor necrosis factor-alpha production. Potential ultimate effector mechanism of preconditioning. *Circulation.* 1998;98:II214-8; discussion II218-9.
991. Meldrum DR. Tumor necrosis factor in the heart. *Am J Physiol.* 1998;274:R577-95.
992. Iwakura A, Fujita M, Hasegawa K, Toyokuni S, Sawamura T, Nohara R, Sasayama S, Komeda M. Pericardial fluid from patients with ischemic heart disease induces myocardial cell apoptosis via an oxidant stress-sensitive p38 mitogen-activated Proteinkinase pathway. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33:419-30.
993. Kummer JL, Rao PK, Heidenreich KA. Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated Proteinkinase. *Journal of Biological Chemistry.* 1997;272:20490-4.
994. Talmor D, Applebaum A, Rudich A, Shapira Y, Tirosch A. Activation of mitogen-activated Proteokinases in human heart during cardiopulmonary bypass. *Circulation Research.* 2000;86:1004-7.
995. Cain BS, Meldrum DR, Meng X, Dinarello CA, Shames BD, Banerjee A, Harken AH. p38 MAPK inhibition decreases TNF-alpha production and enhances postischemic human myocardial function. *Journal of Surgical Research.* 1999;83:7-12.

996. Torres K, Horwitz SB. Mechanisms of Taxol-induced cell death are concentration dependent. *Cancer Research*. 1998;58:3620-6.
997. Lee LF, Schuerer-Maly CC, Lofquist AK, van Haaften-Day C, Ting JP, White CM, Martin BK, Haskill JS. Taxol-dependent transcriptional activation of IL-8 expression in a subset of human ovarian cancer. *Cancer Res*. 1996;56:1303-8.
998. Rowinsky EK, McGuire WP, Guarnieri T, Fisherman JS, Christian MC, Donehower RC. Cardiac disturbances during the administration of taxol. *J Clin Oncol*. 1991;9:1704-12.
999. Pai VB, Nahata MC. Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: incidence, treatment and prevention. *Drug Saf*. 2000;22:263-302.
1000. Yang CP, Horwitz SB. Taxol mediates serine phosphorylation of the 66-kDa Shc isoform. *Cancer Research*. 2000;60:5171-8.
1001. Rasouli-Nia A, Liu D, Perdue S, Britten RA. High Raf-1 kinase activity protects human tumor cells against paclitaxel-induced cytotoxicity. *Clinical Cancer Research*. 1998;4:1111-6.
1002. Collins TS, Lee LF, Ting JP. Paclitaxel up-regulates interleukin-8 synthesis in human lung carcinoma through an NF-kappaB- and AP-1-dependent mechanism. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2000;49:78-84.
1003. Blagosklonny MV, Schulte T, Nguyen P, Trepel J, Neckers LM. Taxol-induced apoptosis and phosphorylation of Bcl-2 protein involves c-Raf-1 and represents a novel c-Raf-1 signal transduction pathway. *Cancer Research*. 1996;56:1851-4.
1004. Blagosklonny MV, Schulte TW, Nguyen P, Mimnaugh EG, Trepel J, Neckers L. Taxol induction of p21WAF1 and p53 requires c-raf-1. *Cancer Research*. 1995;55:4623-6.
1005. Lieu CH, Liu CC, Yu TH, Chen KD, Chang YN, Lai YK. Role of mitogen-activated Protein kinase in taxol-induced apoptosis in human leukemic U937 cells. *Cell Growth & Differentiation*. 1998;9:767-76.
1006. Pae HO, Yoo JC, Choi BM, Lee EJ, Song YS, Chung HT. 12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate, Protein kinase C (PKC) activator, protects human leukemia HL-60 cells from taxol-induced apoptosis: possible role for extracellular signal-regulated kinase. *Immunopharmacology & Immunotoxicology*. 2000;22:61-73.
1007. Donaldson KL, Goolsby GL, Kiener PA, Wahl AF. Activation of p34cdc2 coincident with taxol-induced apoptosis. *Cell Growth & Differentiation*. 1994;5:1041-50.
1008. Ibrado AM, Kim CN, Bhalla K. Temporal relationship of CDK1 activation and mitotic arrest to cytosolic accumulation of cytochrome C and caspase-3 activity during Taxol-induced apoptosis of human AML HL-60 cells. *Leukemia*. 1998;12:1930-6.
1009. Haldar S, Jena N, Croce CM. Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92:4507-11.
1010. Allen JN, Moore SA, Wewers MD. Taxol enhances but does not induce interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha production. *J Lab Clin Med*. 1993;122:374-81.
1011. Chen L, Burger RA, Zaunbrecher GM, Cheng H, Lincoln AJ, Mallarino MC, Monk BJ, Khan SA. Protein kinase C isoform expression and activity alter paclitaxel resistance in vitro. *Gynecologic Oncology*. 1999;72:171-9.
1012. Das KC, White CW. Activation of NF-kappaB by antineoplastic agents. Role of Protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272:14914-20.

1013. Jun CD, Choi BM, Kim HM, Chung HT. Involvement of Proteinkinase C during taxol-induced activation of murine peritoneal macrophages. *Journal of Immunology*. 1995;154:6541-7.
1014. Huang Y, Sheikh MS, Fornace AJ, Jr., Holbrook NJ. Serine protease inhibitor TPCK prevents Taxol-induced cell death and blocks c-Raf-1 and Bcl-2 phosphorylation in human breast carcinoma cells. *Oncogene*. 1999;18:3431-9.
1015. Bogdan C, Ding A. Taxol, a microtubule-stabilizing antineoplastic agent, induces expression of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in macrophages. *J Leukoc Biol*. 1992;52:119-21.
1016. Lee LF, Li G, Templeton DJ, Ting JP. Paclitaxel (Taxol)-induced gene expression and cell death are both mediated by the activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK/SAPK). *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273:28253-60.
1017. Lee LF, Haskill JS, Mukaida N, Matsushima K, Ting JP. Identification of tumor-specific paclitaxel (Taxol)-responsive regulatory elements in the interleukin-8 promoter. *Molecular & Cellular Biology*. 1997;17:5097-105.
1018. Abraham I, Wolf CL, Sampson KE, Laborde AL, Shelly JA, Aristoff PA, Skulnick HI. K252a, KT5720, KT5926, and U98017 support paclitaxel (taxol)-dependent cells and synergize with paclitaxel. *Cancer Research*. 1994;54:5889-94.
1019. Olsen MK, Reszka AA, Abraham I. KT5720 and U-98017 inhibit MAPK and alter the cytoskeleton and cell morphology. *Journal of Cellular Physiology*. 1998;176:525-36.
1020. Duesbery NS, Masui Y. The role of microtubules and inositol triphosphate induced Ca²⁺ release in the tyrosine phosphorylation of mitogen-activated Proteinkinase in extracts of *Xenopus laevis* oocytes. *Zygote*. 1996;4:21-30.
1021. Jackson JK, Tudan C, Sahl B, Pelech SL, Burt HM. Calcium pyrophosphate dihydrate crystals activate MAP kinase in human neutrophils: inhibition of MAP kinase, oxidase activation and degranulation responses of neutrophils by taxol. *Immunology*. 1997;90:502-10.
1022. Hui A, Min WX, Tang J, Cruz TF. Inhibition of activator protein 1 activity by paclitaxel suppresses interleukin-1-induced collagenase and stromelysin expression by bovine chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism*. 1998;41:869-76.
1023. Hui A, Kulkarni GV, Hunter WL, McCulloch CA, Cruz TF. Paclitaxel selectively induces mitotic arrest and apoptosis in proliferating bovine synoviocytes. *Arthritis & Rheumatism*. 1997;40:1073-84.
1024. Lee M, Yea SS, Jeon YJ. Paclitaxel causes mouse splenic lymphocytes to a state hyporesponsive to lipopolysaccharide stimulation. *International Journal of Immunopharmacology*. 2000;22:615-21.
1025. Chadebecq P, Truchet I, Brichese L, Valette A. Up-regulation of cdc2 protein during paclitaxel-induced apoptosis. *International Journal of Cancer*. 2000;87:779-86.
1026. Nishio K, Arioka H, Ishida T, Fukumoto H, Kurokawa H, Sata M, Ohata M, Saijo N. Enhanced interaction between tubulin and microtubule-associated protein 2 via inhibition of MAP kinase and CDC2 kinase by paclitaxel. *International Journal of Cancer*. 1995;63:688-93.
1027. Herdeg C, Oberhoff M, Karsch KR. Antiproliferative stent coatings: Taxol and related compounds. *Seminars in Interventional Cardiology*. 1998;3:197-9.
1028. Arbuck SG, Strauss H, Rowinsky E, Christian M, Suffness M, Adams J, Oakes M, McGuire W, Reed E, Gibbs H, et al. A reassessment of cardiac toxicity associated with Taxol. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 1993:117-30.

1029. Laher S, Karp SJ. Acute myocardial infarction following paclitaxel administration for ovarian carcinoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 1997;9:124-6.
1030. Hekmat E. Fatal myocardial infarction potentially induced by paclitaxel. *Ann Pharmacother*. 1996;30:1110-2.
1031. Specht L, Larsen SK, Hansen HS. Phase II study of docetaxel and cisplatin in patients with recurrent or disseminated squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Ann Oncol*. 2000;11:845-9.
1032. Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, Takagi M, Matsumoto K, Miyazono K, Gotoh Y. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*. 1997;275:90-4.
1033. Yue TL, Ma XL, Gu JL, Ruffolo RR, Jr., Feuerstein GZ. Carvedilol inhibits activation of stress-activated Protein kinase and reduces reperfusion injury in perfused rabbit heart. *Eur J Pharmacol*. 1998;345:61-5.
1034. Yue TL, Wang C, Romanic AM, Kikly K, Keller P, DeWolf WE, Jr., Hart TK, Thomas HC, Storer B, Gu JL, Wang X, Feuerstein GZ. Staurosporine-induced apoptosis in cardiomyocytes: A potential role of caspase-3. *J Mol Cell Cardiol*. 1998;30:495-507.
1035. Yue TL, Ma XL, Wang X, Romanic AM, Liu GL, Loudon C, Gu JL, Kumar S, Poste G, Ruffolo RR, Jr., Feuerstein GZ. Possible involvement of stress-activated Protein kinase signaling pathway and Fas receptor expression in prevention of ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis by carvedilol. *Circ Res*. 1998;82:166-74.
1036. Andreka P, Zang J, Dougherty C, Slepak TI, Webster KA, Bishopric NH. Cytoprotection by Jun kinase during nitric oxide-induced cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res*. 2001;88:305-312.
1037. Wang Y, Su B, Sah VP, Brown JH, Han J, Chien KR. Cardiac hypertrophy induced by mitogen-activated Protein kinase kinase 7, a specific activator for c-Jun NH2-terminal kinase in ventricular muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(10):5423-5426.
1038. Sugden PH, Clerk A. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *Journal of Molecular Medicine*. 1998;76:725-46.
1039. Lochner A. p38 MAPK activation: trigger or mediator in ischaemic preconditioning (PC)? *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33:A70 (abstract).
1040. Yin T, Sandhu G, Wolfgang CD, Burrier A, Webb RL, Rigel DF, Hai T, Whelan J. Tissue specific pattern of stress kinase activation in ischemia/reperfused heart and kidney. *J Biol Chem*. 1997;272:19943-19950.
1041. Laderoute KR, Webster KA. Hypoxia/reoxygenation stimulates Jun kinase activity through redox signaling in cardiac myocytes. *Circ Res*. 1997;80:336-344.
1042. Abe J, Baines CP, Berk BC. Role of mitogen-activated Protein kinases in ischemia and reperfusion injury. The good and the bad. *Circ Res*. 2000;86:607-609.
1043. Seko Y, Tobe K, Takahashi N, Kaburagi Y, Kadowaki T, Yazaki Y. Hypoxia and hypoxia/reoxygenation activate Src family tyrosine kinases and p21ras in cultured rat cardiac myocytes. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 1996;226:530-5.
1044. Bonny C, Oberson A, Negri S, Sauser C, Schorderet DF. Cell-permeable peptide inhibitors of JNK: novel blockers of beta-cell death. *Diabetes*. 2001;50:77-82.
1045. Bonny C, Nicod P, Waeber G. IB1, a JIP-1-related nuclear protein present in insulin-secreting cells. *J Biol Chem*. 1998;273:1843-6.

1046. Dickens M, Rogers JS, Cavanagh J, Raitano A, Xia Z, Halpern JR, Greenberg ME, Sawyers CL, Davis RJ. A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway. *Science*. 1997;277:693-6.
1047. Kyriakis JM, Avruch J. Sounding the alarm: Proteinkinase cascades activated by stress and inflammation. *J Biol Chem*. 1996;271:24313-6.
1048. Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, Dowdy SF. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science*. 1999;285:1569-72.
1049. Martire A, Fernandez B, Kolattakudy PE, Schaper W. Pathway of ischemic preconditioning in MCP-1 transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33:A73 (abstract).
1050. Barancik M, Htun P, Freude B. The phosphatase inhibitor okadaic acid increases SAPK activity and protects pig myocardium against ischemic damage. In: *Circulation*; 1997:1400 (abstr).
1051. Cano E, Hazzalin CA, Mahadevan LC. Anisomycin-activated Proteinkinases p45 and p55 but not mitogen-activated Proteinkinases ERK-1 and -2 are implicated in the induction of c-fos and c-jun. *Mol Cell Biol*. 1994;14:7352-7362.
1052. Cano E, Doza YN, Ben-Levy R, Cohen P, Mahadevan LC. Identification of anisomycin-activated kinases p45 and p55 in murine cells as MAPKAP kinase-2. *Oncogene*. 1996;12:805-812.
1053. Weinbrenner C, Baines CP, Liu GS, Armstrong SC, Ganote CE, Walsh AH, Honkanen RE, Cohen MV, Downey JM. Fostriecin, an inhibitor of protein phosphatase 2A, limits myocardial infarct size even when administered after onset of ischemia. *Circulation*. 1998;98:899-905.
1054. Cumming DV, Heads RJ, Coffin RS, Yellon DM, Latchman DS. Pharmacological preconditioning of primary rat cardiac myocytes by FK506. *Basic Research in Cardiology*. 1996;91:367-73.
1055. Becker Y. Trends in research and development of antiviral substances. *Israel Journal of Medical Sciences*. 1975;11:1135-67.
1056. Carter WA. Chemotherapy of human oncogenic viral infections: the possible role of interferon and reverse transcriptase inhibitors. *Journal of Surgical Oncology*. 1973;5:113-36.
1057. Kersten H, Kersten W. Inhibitors of nucleic acid synthesis: biophysical and biochemical aspects. *Molecular Biology, Biochemistry & Biophysics*. 1974:1-184.
1058. Yoo H, Rill RL. Actinomycin D binding to unstructured, single-stranded DNA. *Journal of Molecular Recognition*. 2001;14:145-50.
1059. Zechel K. Initiation of DNA synthesis by RNA. *Current Topics in Microbiology & Immunology*. 1978;82:71-112.
1060. Kim HK, Nam JY, Han MY, Lee EK, Choi JD, Bok SH, Kwon BM. Actinomycin D as a novel SH2 domain ligand inhibits Shc/Grb2 interaction in B104-1-1 (neu*-transformed NIH3T3) and SAA (hEGFR- overexpressed NIH3T3) cells. *FEBS Lett*. 1999;453:174-8.
1061. Nam JY, Kim HK, Son KH, Kim SU, Kwon BM, Han MY, Chung YJ, Bok SH. Actinomycin D, C2 and VII, inhibitors of Grb2-SHC interaction produced by Streptomyces. *Bioorg Med Chem Lett*. 1998;8:2001-2.
1062. Newton R, Seybold J, Kuitert LME, Bergmann M, Barnes PJ. Repression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 release by dexamethasone occurs by transcriptional and post-transcriptional mechanisms involving loss of polyadenylated mRNA. *J Biol Chem*. 1998;273:32312-32321.

1063. Gijon MA, Spencer DM, Siddiqi AR, Bonventre JV, Leslie CC. Cytosolic phospholipase A2 is required for macrophage arachidonic acid release by agonists that do and do not mobilize calcium. *J Biol Chem.* 2000;275:20146-20156.
1064. Sato T. Transcriptional regulation of vascular development. *Circ Res.* 2001;88:127-8.
1065. Hunter T, Karin M. The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell.* 1992;70:375-87.
1066. Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated Protein kinases. *J Biol Chem.* 1995;270:16483-16486.
1067. Livingstone C, Patel G, Jones N. ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain. *EMBO J.* 1995;14:1785-1797.
1068. Chang NS. TGF-beta-induced matrix proteins inhibit p42/44 MAPK and JNK activation and suppress TNF-mediated I κ B α degradation and NF-kappaB nuclear translocation in L929 fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;267:194-200.
1069. Lenormand P, Brondello JM, Brunet A, Pouyssegur J. Growth factor-induced p42/p44 MAPK nuclear translocation and retention requires both MAPK activation and neosynthesis of nuclear anchoring proteins. *J Cell Biol.* 1998;142:625-33.
1070. Lenormand P, Sardet C, Pages G, L'Allemain G, Brunet A, Pouyssegur J. Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J Cell Biol.* 1993;122:1079-88.
1071. Rodrigues GA, Park M, Schlessinger J. Activation of the JNK pathway is essential for transformation by the Met oncogene. *Embo J.* 1997;16:2634-45.
1072. Thronton J, Striplin S, Liu GS, Swafford A, Stanley AWH, van Winkle DM, Downey JM. Inhibition of protein synthesis does not block myocardial protection afforded by preconditioning. *Am. J. Physiol.* 1990;259:H1822.
1073. Rowland RT, Meng X, Cleveland JC, Meldrum DR, Harken AH, Brown JM. Cardioadaptation induced by cyclic ischemic preconditioning is mediated by translational regulation of de novo protein synthesis. *Journal of Surgical Research.* 1997;71:155-60.
1074. Matsuyama N, Leavens JE, McKinnon D, Gaudette GR, Aksehirli TO, Krukenkamp IB. Ischemic but not pharmacological preconditioning requires protein synthesis. *Circulation.* 2000;102:III312-8.
1075. Singh D, Sharma A, Singh M. Effect of actinomycin D and cycloheximide on ischemic preconditioning-induced delayed cardioprotective effect in rats. *Indian Journal of Experimental Biology.* 2000;38:982-7.
1076. Lepran I, Koltai M, Szekeres L. Effect of actinomycin D and cycloheximide on experimental myocardial infarction in rats. *European Journal of Pharmacology.* 1982;77:197-9.

X. DANKSAGUNG

*An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken,
die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.*

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Schaper für die Überlassung des Themas, für die großzügige Bereitstellung aller Einrichtungen des Instituts zur Durchführung der Experimente und für die intensive und hervorragende Unterstützung beim wissenschaftlichen Arbeiten und Erstellen dieser Dissertation. Des weiteren bedanke ich mich für die optimalen Arbeitsbedingungen in seiner Arbeitsgruppe und für die Erlaubnis zur Teilnahme an diversen Kongressen und Weiterbildungen, die mich in meiner Arbeit sehr motiviert haben.

Frau Prof. Dr. med. vet. Ilse Käufer-Weiss möchte ich besonders für die Betreuung und Vertretung der Arbeit im Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität-Gießen und für die kritische Durchsicht des Manuskripts danken.

Für die besondere Zusammenarbeit und Freundschaft möchte ich mich bei meiner Kollegin Marie-Luise von Brühl bedanken.

Herrn Sven Kilian danke ich für die Einführung in die operativen Arbeitstechniken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Miroslav Barancik für die geduldige Einweisung in die praktische Arbeit im Labor, die kollegiale Zusammenarbeit, Mithilfe und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. Matthias Heil danke ich für die Hilfe im Labor, für seinen großen Einsatz und seine tatkräftige Hilfe beim Anfertigen von Posterpräsentationen und schließlich dieser Dissertationsarbeit.

Für die geduldige und freundliche Einweisung im EDV-Bereich möchte ich mich bei Herrn Gerhard Stämmler und Gunther Schuster bedanken. Vielen Dank Gerd !!!

Frau Annemarie Möbs danke ich für die perfekte Durchführung der Fotografieentwicklungen.

Frau Christine Nikleniewicz und Herrn Helmut Kreuzer danke ich für die reibungslose Abwicklung der Literaturbestellungen.

Für die Hilfe im Molekularbiologischen Bereich danke ich Frau Claudia Ullmann und Dr. René Zimmermann.

Frau Marie-Luise von Brühl, Herrn Dr. Matthias Heil und meinem Bruder möchte ich für die Hilfe bei der Korrektur der Arbeit danken.

Bei Frau Renate Nordgren und Elke Conradi bedanke ich mich für Ihre nette freundschaftliche Art, das Bügeln der OP-Kittel und so manche Kleinigkeit.

Allen Tierpflegern des Max-Planck-Instituts danke ich für ihre Hilfe und Unterstützung.

Herrn Siegfried Langsdorf und Christof Bingel danke ich für die tollen Anfertigungen aus ihrer Feinmechanikwerkstatt.

Frau Dr. med. vet. Anne-Ly Peissner und dem gesamten Team danke ich für Ihr Verständnis, die aufmunternde Unterstützung und die Freistellung während meiner Tätigkeit in Ihrer Praxis.

Schließlich danke ich allen Mitarbeitern des Max-Planck-Instituts in Bad Nauheim für ihre Hilfe beim Anfertigen dieser Arbeit und für ihre Freundschaft.

*Meinen Eltern, meinem Bruder, meinem Freund Mark Kaminski,
Herrn Dr. W. Kaminski und allen Freunden danke ich für ihre liebevolle und
moralische Unterstützung*