

**Die kardialen Effekte von Metoclopramid und Domperidon
am humanen 5-HT_{4a}-Rezeptor in transgenen Mäusen sowie
an Vorhofpräparaten kardial vorerkrankter Patienten**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Tom Seidler
geboren am 14.11.1996 in Schweinfurt
Betreuer: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Joachim Neumann
Gutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Laufs, Leipzig
Prof. Dr. med Renke Maas, Erlangen
Datum der Verteidigung: 19.04.2023

Referat

Unter der Einnahme von Metoclopramid oder Domperidon, häufig eingesetzte Gastroprokinetika in Deutschland, wurde des öfteren in der Literatur über kardiovaskuläre Ereignisse berichtet. Weil die Ursache dafür jedoch gegenwärtig weitgehend ungeklärt ist, wurde die Wirkung dieser Substanzen am humanen 5-HT₄-Rezeptor, dem proarrhythmogene Eigenschaften zugeschrieben werden, untersucht. Hierfür wurde ein transgenes Mausmodell genutzt, welches den humanen 5-HT_{4a}-Rezeptor kardial überexprimiert, ferner wurden Versuche an Vorhofpräparaten von Patienten durchgeführt.

Metoclopramid bewirkte in Kontraktionsversuchen an Vorhöfen transgener Mäuse sowohl positiv inotrope und lusitrope als auch positiv chronotrope Effekte über diesen Rezeptor. Im Speziellen konnte Metoclopramid als Partialagonist am humanen 5-HT_{4a}-Rezeptor charakterisiert werden. Außerdem konnte für Metoclopramid eine Erhöhung der Phospholamban-Phosphorylierung, abhängig vom Vorhandensein des 5-HT_{4a}-Rezeptors, an Ventrikelpräparaten von Mäusen nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich auch in Kontraktionsversuchen an Vorhofpräparaten von Patienten ein positiv inotroper Effekt durch Metoclopramid.

Für Domperidon hingegen zeigte sich unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen keine Interaktion mit dem humanen 5-HT_{4a}-Rezeptor. Ferner fiel in Kontraktionsversuchen an Mäuseatrien ein von diesem Rezeptor unabhängiger negativ chronotroper Effekt auf.

Während also für Domperidon eine direkte ursächliche Beteiligung des humanen 5-HT₄-Rezeptors an beobachteten kardiovaskulären Ereignissen als sehr unwahrscheinlich gelten kann, scheint Metoclopramid über den 5-HT₄-Rezeptor zu wirken.

Seidler, Tom: Die kardialen Effekte von Metoclopramid und Domperidon am humanen 5-HT_{4a}-Rezeptor in transgenen Mäusen sowie an Vorhofpräparaten kardial vorerkrankter Patienten, Halle (Saale), Univ., Med. Fak; Diss., 75 Seiten, 2023

Inhaltsverzeichnis**Abkürzungsverzeichnis****Abbildungsverzeichnis**

1	Einleitung	1
1.1	Metoclopramid und Domperidon	1
1.1.1	Pharmakokinetik	2
1.1.2	Pharmakodynamik	3
1.2	Der 5-HT ₄ -Rezeptor	6
2	Zielsetzung und klinische Relevanz	10
3	Material und Methoden	12
3.1	Versuchstiere und Tierhaltung	12
3.2	Generierung der transgenen Mäuse	12
3.3	Genotypisierung der Mäuse	13
3.3.1	Extraktion und Isolation der DNA	13
3.3.2	PCR-Amplifikation der DNA und Agarosegel-Elektrophorese	13
3.4	Kontraktionsversuche	14
3.4.1	Vorbereitung	14
3.4.2	Organentnahme bei den Mäusen	16
3.4.3	Präparation der Mäuseherzen	17
3.4.4	Menschliche Vorhofpräparate	19
3.4.5	Versuchsdurchführung an den Mäuseatrien	19
	Experimente zu den Eigeneffekten von Metoclopramid und Domperidon	21
	Experimente zu den antagonistischen Eigenschaften von Metoclopramid	22
3.4.6	Versuchsdurchführung an menschlichen Vorhofpräparaten	24
3.5	Western-blotting	25
3.5.1	Inkubation der Mäuseventrikel	25
3.5.2	Homogenisation der Mäuseventrikel	25
3.5.3	Gel-Elektrophorese und Western-blotting	26
3.6	Auswertung	27
3.6.1	Kontraktionsversuche	27
3.6.2	Western-blotting	28
3.6.3	Statistik	28

4	Ergebnisse	30
4.1	Mausversuche	30
4.1.1	Genotypisierung der Versuchstiere	30
4.1.2	Grunddaten der Versuchstiere	30
4.1.3	Kontraktionsversuche	33
	Experimente zu den Eigeneffekten von Metoclopramid und Domperidon	35
	Abbildungen	39
	Experimente zu den antagonistischen Eigenschaften von Metoclopramid	45
	Abbildungen	49
4.1.4	Western-blotting	53
4.2	Versuche an menschlichen Vorhofpräparaten	55
	Abbildungen	56
5	Diskussion	58
5.1	Diskussion der angewandten Methoden	58
5.2	Wirkungen von Metoclopramid	59
5.3	Wirkungen von Domperidon	63
6	Zusammenfassung	65
7	Literaturverzeichnis	66
8	Thesen	75
9	Anlagen	VII
9.1	Substratverzeichnis	VII
9.2	Puffer und Lösungen	IX
9.3	Geräteverzeichnis	IX
9.4	PCR-Programm	XI
9.5	Patientendaten	XI
10	Anhang	
	Erklärungen	
	Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatcyclase
ATP	Adenosintri-phosphat
Ausw	Auswaschen
bp	Basenpaare
bpm	Schläge (beats) pro Minute
Ca ²⁺	Calcium ²⁺ -Ionen
cAMP	Zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cm ²	Quadratcentimeter
CSQ	Calsequestrin
C-terminal	Freie Carboxylgruppe eines Proteins
CYP	Cytochrom P450 System
DDD	Verordnete Tagesdosen (defined daily dose)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dom	Domperidon
EC ₅₀	Halbmaximale effektive Konzentration
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
ERG-Kanal	Ein spannungsaktivierter, verzögert gleichrichtender Kaliumkanal
FDA	Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelbehörde der Vereinigten Staaten von Amerika (Food and Drug Administration)
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
G-Protein	Guanosintri-phosphat bindendes Protein
G _s -Protein	Stimulierendes Guanosintri-phosphat bindendes Protein
GTP	Guanosintri-phosphat
HCN-Kanal	Durch Hyperpolarisation aktivierter und zyklische Nukleotide modulierter Kationenkanal (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel)
Hz	Hertz
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
IE	Internationale Einheit
Iso	Isoprenalin
i.v.	Intravenös
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
Ktr	Kontrolle
KWK	Konzentrations-Wirkungs-Kurve
L	Liter
LA	Linkes Atrium
LTCC	L-Typ-Calciumkanal
mA	Milliampere
max. Abfall	Maximaler Kraftabfall

max. Anstieg	Maximaler Kraftanstieg
MCP	Metoclopramid
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mN	Millinewton
mN/s	Millinewton pro Sekunde
mm	Millimeter
mM	Millimolar
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
Na	Natrium
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
P	Phosphorylierung
PCE	Positiv chronotroper Effekt
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pEC ₅₀	Negativer Logarithmus der mittleren effektiven Konzentration
PIE	Positiv inotroper Effekt
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase (Proteinkinase A)
PLB	Phospholamban
P-PLB	Phosphoryliertes Phospholamban (an Serin 16)
RA	Rechtes Atrium
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RyR	Ryanodin-Rezeptor
s	Sekunde
s.	siehe
SEM	Standardfehler des arithmetischen Mittelwertes
SERCA	Sarkoplasmatische Calcium-ATPase
TG	Transgen, hinsichtlich einer kardialen Überexpression des humanen 5-HT _{4a} -Rezeptors
TnC	Troponin C
T1	Anspannungszeit
T2	Erschlaffungszeit
U	Enzymeinheit
V	1. Volt 2. Volumen
vgl.	Vergleiche
vs.	Versus
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem
α	Alpha
β	Beta

γ	Gamma
μg	Mikrogramm
μM	Mikromolar
μl	Mikroliter
5-HT	Serotonin
5-HT ₄ -R	Serotonin ₄ -Rezeptor
°C	Grad Celsius

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Strukturformeln von Metoclopramid, Procainamid, Domperidon, Haloperidol, Serotonin und racemischen Isoprenalin	5
Abb. 2:	Schema der Signaltransduktion via 5-HT ₄ -Rezeptoren in Kardiomyozyten	8
Abb. 3:	Messanlage für Kontraktionsversuche im Schema	15
Abb. 4:	Die einzelnen Versuche an den Vorhofpräparaten der Mäuse im Schema	21
Abb. 5:	Der Versuch an den menschlichen Vorhofpräparaten im Schema	24
Abb. 6:	Beispielhaftes Ergebnis der Genotypisierung der Mäuse	30
Abb. 7:	Übersicht über die Grunddaten der Versuchstiere als Säulendiagramm	32
Abb. 8:	Tabellarische Übersicht über die aufgetretenen Arrhythmien in den verschiedenen Versuchen	34
Abb. 9:	Ausschnitte aus den Originalmechanogrammen linker Atrien	39
Abb. 10:	Beispielhafte Kontraktionen linker Atrien	40
Abb. 11:	Beispielhafte Kontraktionen rechter Atrien	40
Abb. 12:	Kraft der linken Atrien in Versuch 1 und 2	41
Abb. 13:	Anspannungs- und Erschlaffungszeit der linken Atrien in Versuch 1 und 2	42
Abb. 14:	Maximaler Kraftanstieg und -abfall der linken Atrien in Versuch 1 und 2	43
Abb. 15:	Frequenz der rechten Atrien in Versuch 1 und 2	44
Abb. 16:	Kraft der linken Atrien in Versuch 3	49
Abb. 17:	Frequenz der rechten Atrien in Versuch 3	50
Abb. 18:	pEC ₅₀ -Werte von Serotonin in Versuch 3	51
Abb. 19:	Tabellarische Übersicht der pEC ₅₀ -Werte aus allen Versuchen	52
Abb. 20:	Beispielhafter Ausschnitt eines Western-blots	53
Abb. 21:	Die Ergebnisse der Western-Blots als Säulendiagramm	54
Abb. 22:	Ausschnitt aus einem Originalmechanogramm eines Trabekelpräparates eines menschlichen rechten Atriums sowie beispielhafte Kontraktionen	56
Abb. 23:	Kontraktionsversuche an den Trabekelpräparaten menschlicher rechter Atrien	57

1 Einleitung

1.1 Metoclopramid und Domperidon

Metoclopramid (MCP) und Domperidon (Dom) werden beide zur Therapie von Übelkeit, Erbrechen und Motilitätsstörungen im oberen Magen-Darm-Trakt eingesetzt (Tonini et al., 1999). Louis Justin-Besançon und seine Mitarbeiter beschrieben 1964 erstmalig MCP (Schulze-Delrieu, 1981) und seit den 1960er Jahren ist MCP in der Europäischen Union zugelassen (Europäische Arzneimittel-Agentur, kurz EMA, 2014). Das 1974 durch die Firma Janssen Pharmaceutica entwickelte und erstmals 1978 in Belgien vermarktete (Yüksel und Tuğlular, 2019) Domperidon ist in den meisten Ländern zugelassen (Doggrell und Hancox, 2013). In den USA wurde MCP 1979 durch die FDA zugelassen (Pasricha et al., 2006), wohingegen Domperidon bis zum heutigen Tage dort keine Zulassung erhielt (Doggrell und Hancox, 2013). 1986 wurde die intravenöse Form Domperidons wieder vom Markt genommen und im Jahr 2014 folgte die Zulassungsbeschränkung durch die EMA für die orale Verabreichungsform auf eine Maximaldosis von täglich 30 mg und eine maximale Behandlungsdauer von sieben Tagen (Yüksel und Tuğlular, 2019). Für MCP wurde 2009 eine Warnung durch die FDA ausgesprochen, in der von Behandlungsdauern über zwölf Wochen abgeraten wird und 2013 wies auch die EMA darauf hin, man solle MCP nicht länger als fünf Tage und mit einer Maximaldosis von 30 mg pro Tag verabreichen (Svendson et al., 2018). Im gleichen Zuge wurde durch die EMA auch die Zulassung von oralen Verabreichungsformen als Tropfen mit mehr als 1 mg / ml MCP, von parenteralen mit mehr als 5 mg / ml MCP und von rektalen mit mehr als 20 mg MCP pro Stück widerrufen (EMA, 2013). Dennoch sind, laut dem Arzneiverordnungs-Report 2021, MCP mit 23,5 Mio. DDD und Domperidon mit 7,5 Mio. DDD die mit Abstand meistverschriebenen Prokinetika in Deutschland (Lohse und Huber, 2021). Außerdem sind sie mit einem Anteil von 21 % (MCP) und von 7 % (Dom) in der Gruppe der Antiemetika und Antivertiginosa die zweit- und viertwichtigsten Wirkstoffe in Deutschland, gemessen an verordneten Tagesdosen (Seifert und Hamann, 2021).

1.1.1 Pharmakokinetik

MCP erreicht seinen Spitzenspiegel im Blutplasma bei oraler Aufnahme nach ungefähr einer Stunde. Es wird somit schnell aufgenommen und die orale Bioverfügbarkeit von 77 % wird durch den First-Pass-Effekt in der Leber erklärt. Nach oraler Gabe von 10 mg MCP wurden bei gesunden Studienteilnehmern Spitzenwerte im Blutplasma von ca. 55 ng / ml gemessen. Für die i.v.-Applikation der gleichen Dosis wurden 5 min nach Verabreichung im Blutplasma Konzentrationen zwischen 72 ng / ml und 126 ng / ml im Blutplasma festgestellt. Das Verteilungsvolumen von MCP wurde hier mit ungefähr 4 L / kg beziffert (Ross-Lee et al., 1981). Für MCP wurde nachgewiesen, dass es die Blut-Hirn-Schranke leicht passieren kann (Joliet et al., 2007). Metabolisiert wird MCP vorwiegend, indem es in der Leber durch das Enzym CYP2D6 dealkyliert wird, was in geringerem Maße auch durch CYP1A2 geschieht. Für die medikamentöse Inhibition von CYP2D6 durch Chinidin konnte gezeigt werden, dass es den Abbau von MCP um ca. die Hälfte hemmen kann. Zugleich konnte beobachtet werden, dass MCP selbst ein potenter Hemmstoff dieses Enzyms ist (Desta et al., 2002). Jedoch werden zwischen 20 und 30 % des Metoclopramids auch unverändert über die Niere ausgeschieden (Rao und Camilleri, 2009). Die Eliminationshalbwertszeit von MCP beträgt etwa 3,5 Stunden und verlängert sich bei Nierenversagen mit einer glomerulären Filtrationsrate von unter 15 ml / min durchschnittlich bis auf das Vierfache (Bateman et al., 1981).

Domperidon erreicht seinen Spitzenspiegel im Blutplasma bei oraler Aufnahme nach ungefähr 30 Minuten und bei rektaler Applikation nach ca. vier Stunden. Dabei unterliegt es aber einem starken First-Pass-Effekt in der Leber und besitzt deshalb nur eine Bioverfügbarkeit zwischen 13 % und 17 %. Der Plasmaspiegel von Domperidon steigt oberhalb einer Einzeldosis von 10 mg näherungsweise linear an (Heykants et al., 1981). Nach oraler Gabe von 20 mg Domperidon wurden bei gesunden Studienteilnehmern Spitzenwerte im Blutplasma von ca. 20 ng / ml gemessen. Das mittlere Verteilungsvolumen betrug hierbei um die 75 L / kg im Durchschnitt (Huang et al., 1986). Domperidon wird im Gegensatz zu MCP als unfähig die Blut-Hirn-Schranke zu passieren beschrieben, weil es mit 426 eine höhere relative Molekülmasse sowie eine geringere Lipophilie als MCP besitzt (Champion et al., 1986). Zudem wird die Verteilung

von Domperidon ins Gehirn durch das P-Glykoprotein an der Blut-Hirn-Schranke weiter eingeschränkt (Tsujikawa et al., 2003). Im Blut liegt Domperidon zu etwa 93 % gebunden an Plasmaproteinen vor (Doggrell und Hancox, 2013). Metabolisiert wird Domperidon vorwiegend in der Leber durch Hydroxylierung und oxidative Dealkylierung über CYP3A4. Die Inhibition dieses Enzyms kann den Plasmaspiegel von Domperidon verdreifachen (Boyce et al., 2012). In geringerem Maße sind auch CYP1A2, 2B6, 2C8 und 2D6 an der Verstoffwechslung Domperidons beteiligt (Ward et al., 2004). Die Eliminationshalbwertszeit Domperidons beträgt ungefähr 7,5 Stunden (Heykants et al., 1981).

1.1.2 Pharmakodynamik

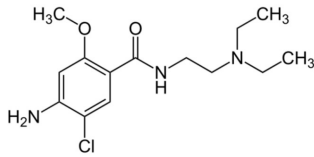
MCP ist ein substituiertes Derivat von Benzamiden und weist strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Antiarrhythmikum Procainamid auf (Abb. 1). Seine prokinetischen Eigenschaften werden vor allem auf einen Antagonismus am Dopamin₂-Rezeptor zurückgeführt (Rao und Camilleri, 2009). So steigert es den Tonus des unteren ösophagealen Sphinkters, beschleunigt die Magenentleerung und stimuliert die gastro-duodenale Motilität (Valenzuela und Dooley, 1984). Der motilitätssteigernde Effekt wird durch die Hemmung von prä- und postsynaptischen Dopamin₂-Rezeptoren erklärt, was zu einer erhöhten Acetylcholinfreisetzung führen soll (Rao und Camilleri, 2009). Außerdem ist MCP ein Agonist am 5-HT₄-Rezeptor und ein weniger potent wirkender Antagonist am 5-HT₃-Rezeptor (Tonini, 1996) als typische 5-HT₃-Antagonisten wie beispielsweise Granisetron. Dahingehend wird diskutiert, inwieweit der 5-HT₄-Agonismus über vermehrte Acetylcholinfreisetzung zum prokinetischen Effekt beiträgt (Tonini et al., 2004). Auf den 5-HT₄-Rezeptor im Speziellen wird im folgenden Kapitel noch näher eingegangen. Die antiemetischen Eigenschaften von MCP werden vor allem auf eine Hemmung von Dopamin₂-Rezeptoren und 5-HT₃-Rezeptoren in der Chemorezeptoren-Triggerzone der Area postrema zurückgeführt. Weil MCP, wie zuvor beschrieben, vergleichsweise leicht die Blut-Hirn-Schranke überqueren kann, inhibiert es auch zentrale Dopamin₂-Rezeptoren, was bei chronischer Anwendung zu einem Ungleichgewicht im

Zusammenspiel zwischen Substantia nigra, dem Striatum und dem Pallidum führen kann. Das Spektrum der dadurch ausgelösten Bewegungsstörungen reicht dabei von akuten Dystonien und Akathisien bis hin zum Parkinsonoid und irreversiblen Spätdyskinesien (Rao und Camilleri, 2009). Außerdem werden im Zusammenhang mit dem Dopamin₂-Antagonismus Nebenwirkungen wie Hyperprolaktinämie und dadurch ausgelöst auch Gynäkomastie, Galaktorrhoe und Amenorrhoe beschrieben (Tonini et al., 2004). Des Weiteren konnten unter Gabe von MCP beim Menschen kardiale Arrhythmien beobachtet werden, die teilweise letal endeten (Midttun und Oberg, 1994; Grenier und Drolet, 2003; Siddique et al., 2009; Rumore, 2012; Al-Shaer et al., 2015). Möglicherweise steht dies im Zusammenhang damit, dass in den Kardiomyozyten neonataler Ratten festgestellt werden konnte, dass MCP Natrium-Kanäle zu blockieren vermag, jedoch prinzipiell nur in nicht therapeutischen Hemmkonzentrationen von ca. 75 µg / ml (= 0,25 mM) (IC₅₀) (Stoetzer et al., 2017). Ein anderer Erklärungsansatz dafür könnte sein, dass gezeigt werden konnte, dass MCP via 5-HT₄-Rezeptoren Tachykardien an jungen Schweinen in vivo (Villalón et al., 1991) sowie in vitro an isolierten rechten Schweinevorhöfen auslöst (Medhurst und Kaumann, 1993).

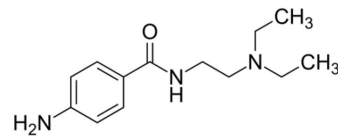
Domperidon ist ein Derivat von Butyrophenon (Tonini et al., 2004) und weist somit strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Antipsychotikum Haloperidol auf (Granger, 1999) (Abb. 1). Domperidon ist ein ähnlich starker Dopamin₂-Rezeptor-Antagonist wie MCP, jedoch noch etwas potenter als diese Substanz. Seine gastroprokinetische und antiemetische Wirkung vermittelt Domperidon, genauso wie zuvor für MCP beschrieben, über Dopamin₂-Rezeptoren in der Magen- und Darmwand, sowie der Area postrema. Jedoch wird für Domperidon kein Effekt an Serotoninrezeptoren beschrieben (Tonini et al., 2004). Weil Domperidon, wie schon zuvor erwähnt, nur schlecht die Blut-Hirn-Schranke passieren kann, verursacht es im Gegensatz zu MCP keine unerwünschten neurologischen Symptome (Reddymasu et al., 2007). Allerdings wirkt Domperidon auf die außerhalb der Blut-Hirn-Schranke liegende Hypophyse und steigert dort durch den Dopamin₂-Rezeptor-Antagonismus die Prolaktinausschüttung. In mehreren Studien konnte zusätzlich festgestellt werden, dass Domperidon durch diesen Effekt die Milchproduktion von Müttern im Vergleich zu Placebo steigert

(Doggrell und Hancox, 2013). Obwohl es zu diesem Zwecke nicht zugelassen ist, wird es beispielsweise in den USA eigens dafür importiert (ebd., 2013). Des Weiteren konnten bei Patienten nach Domperidoneinnahme Herzrhythmusstörungen teilweise mit Todesfolge beobachtet werden (Straus et al., 2005; De Bruin et al., 2007; Johannes et al., 2010; Bor et al., 2018). Jedoch wird in einer Metaanalyse von 2018 das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse durch Domperidon geringer als durch MCP eingeschätzt (Bor et al., 2018). Für diese Beobachtungen kann als mögliche Erklärung der experimentelle Nachweis angebracht werden, dass Domperidon die α -Untereinheit Nav1.5, der Na-Kanäle in menschlichen embryonalen Nierenzellen, welche auch im Herzen vorkommt, zu inhibieren vermag. Es ist jedoch fraglich, ob die Hemmkonzentration Domperidons von ungefähr 36 $\mu\text{g} / \text{ml}$ ($= 8,5 \mu\text{M}$) (IC_{50}) unter einer Therapie tatsächlich erreicht wird (Stoetzer et al., 2017). Eine wahrscheinlichere Erklärung für das erhöhte Risiko kardiovaskulärer Ereignisse unter Domperidon wäre die Inhibition des humanen ERG genannten, spannungsaktivierten, verzögert gleichrichtenden Kaliumkanals. Sie konnte für Domperidon schon mehrfach experimentell nachgewiesen werden (Drolet et al., 2000; Claassen und Zünkler, 2005; Stork et al., 2007) und liegt mit einem ermittelten IC_{50} -Wert von etwa 24 ng / ml (Claassen und Zünkler, 2005) geradezu beunruhigend nah am therapeutisch beobachteten Blutplasmaspiegel Domperidons. Allerdings muss dabei beachtet werden, dass einerseits an den ERG-Kanal lediglich von intrazellulär gebunden werden kann und andererseits der Blutplasmaspiegel nur sehr bedingt aussagekräftig ist, um abzuschätzen, in welchen Konzentrationen Domperidon intrazellulär in den Kardiomyozyten vorliegt (Michaud und Turgeon, 2013).

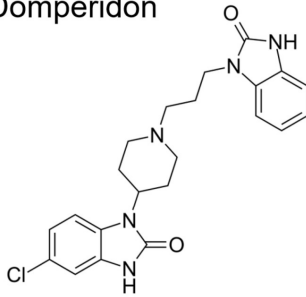
Metoclopramid



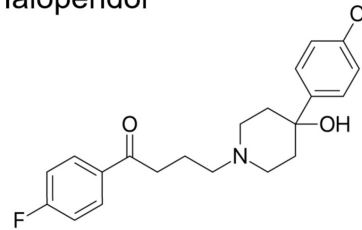
Procainamid



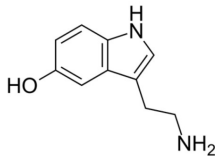
Domperidon



Haloperidol



Serotonin



Isoprenalin

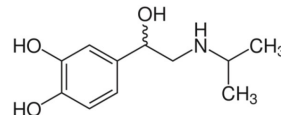


Abb. 1: Strukturformeln von Metoclopramid, Procainamid, Domperidon, Haloperidol, Serotonin und racemischen Isoprenalin

1.2 Der 5-HT₄-Rezeptor

Das Monoamin Serotonin (Abb. 1) kann seine Wirkung durch eine Familie von Liganden modulierten Ionenkanälen und durch bis zu 13 verschiedene, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermitteln. Diese Rezeptoren und Kanäle sind aufgrund ihrer strukturellen und funktionellen Eigenschaften in sieben Klassen (5-HT₁₋₇) unterteilt (Hoyer et al., 2002), wovon im Folgenden genauer auf die 5-HT₄-Rezeptoren eingegangen werden soll.

Der 5-HT₄-Rezeptor wurde in den 1980er Jahren erstmals in collikulären Neuronen von Mäuseembryonen pharmakologisch beschrieben (Dumuis et al., 1988) und in den 1990er Jahren erstmals aus dem Gehirn von Ratten kloniert (Gerald et al., 1995). Im Menschen wurde das Gen für den humanen 5-HT₄-Rezeptor auf dem langen Arm von

Chromosom 5 nachgewiesen (Claeyssen et al., 1997). Aus diesem Gen entstehen beim Menschen eine Reihe von Isoformen durch alternatives Spleißen, die sich, abgesehen von einer Isoform (5-HT_{4hb}-Rezeptor), bis zur Aminosäure Leucin an Stelle 358 nicht unterscheiden. Erst danach unterscheiden sich die Isoformen, indem sie sich entweder mit unterschiedlichen Enden in C-terminaler Richtung fortsetzen (5-HT_{4a-i}-Rezeptor) oder an dieser Stelle bereits enden (5-HT_{4n}-Rezeptor). Die Bedeutung dieser Vielzahl an Spleißvarianten ist jedoch noch weitgehend unverstanden (Kaumann und Levy, 2006; Barnes et al., 2021).

Funktionelle 5-HT₄-Rezeptoren hat man in vielen menschlichen Geweben gefunden, in denen sie zahlreiche physiologische Serotonineffekte vermitteln (Medhurst et al., 2001). Dazu zählen das ZNS (Dumuis et al., 1988), die Lunge (Richter et al., 2003), der Magen-Darm-Trakt (Tuladhar et al., 1996; Broad et al., 2014), die Nebennierenrinde (Lefebvre et al., 2001), die Harnblase (Richter et al., 2003), das Gefäßsystem (Hegde und Eglén, 1996) und auch das Herz (Bach et al., 2001). Vor allem den 5-HT₄-Rezeptoren im Herzen kommt dabei eine besondere Bedeutung zu, weil bereits gezeigt werden konnte, dass sie auch an Pathologien des Herzens, wie beispielsweise Arrhythmien (Kaumann und Sanders, 1994; Pau et al., 2003), beteiligt sind. Allerdings können auch positiv inotrope, positiv lusitrope (Kaumann et al., 1990) und positiv chronotrope Effekte (Pino et al., 1998; Gergs et al., 2017) am menschlichen Herzen durch den 5-HT₄-Rezeptor vermittelt werden. Die bisher bekannten Mechanismen hinter diesen Effekten sollen im Folgenden näher beleuchtet und anhand der Abbildung 2 veranschaulicht werden.

Wenn ein Agonist, wie Serotonin, an den 5-HT₄-Rezeptor von Kardiomyozyten bindet, führt dies zu einer Konformationsänderung des Rezeptors. Infolgedessen wird das aus α -, β - und γ -Untereinheit bestehende G_s-Protein aktiviert, indem das an der α -Untereinheit gebundene GDP durch das GTP ausgetauscht wird und diese α -Untereinheit dadurch von der β - und γ -Untereinheit dissoziiert. Anschließend aktiviert die α -Untereinheit mit dem GTP die Adenylatcyclase (AC), welche aus dem ATP das cAMP bildet (Dumuis et al., 1988; Afzal et al., 2009). Erhöhte intrazelluläre cAMP-Spiegel steigern wiederum die Aktivität der Proteinkinase A (PKA) (Sanders und

Kaumann, 1992). Die PKA ihrerseits phosphoryliert daraufhin verschiedene Proteine, wie den L-Typ-Calciumkanal (LTCC), wodurch sich dessen Offenwahrscheinlichkeit und somit der Calciumeinstrom durch diesen erhöht (Ouadid et al., 1992; Pau et al., 2003). Des Weiteren phosphoryliert die PKA auch das in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums sitzende Phospholamban (PLB) (Gergs et al., 2009), sowie den ebenfalls dort befindlichen Ryanodin-Rezeptor (RyR) (Kaumann et al., 1990). Die Phosphorylierung von letzterem erhöht den Calciumionenausstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in das Zytoplasma und die zytoplasmatisch vorliegenden Ca^{2+} -Ionen binden unter anderem wiederum an das Troponin C (TnC), was unmittelbar die Muskelkontraktion und somit den positiv inotropen Effekt bedingt (Pau et al., 2003). Das phosphorylierte Phospholamban hingegen dissoziiert von der sarkoplasmatischen Calcium-ATPase (SERCA), wodurch die Inhibition dieser aufgehoben wird und die SERCA durch aktiven Transport Ca^{2+} -Ionen zurück ins sarkoplasmatische Retikulum pumpt. Dies schlägt sich in einer schnelleren Relaxation des Kardiomyozyten nieder und kann somit als direktes Korrelat des positiv lusitropen Effektes angesehen werden (Simmerman und Jones, 1998; Haghighi et al., 2014; Neumann et al., 2017; Hamstra et al., 2020).

Zwar ist es noch nicht abschließend geklärt, aber es wird derzeit angenommen, dass der positiv chronotrope Effekt von Serotonin beim Menschen über einen Agonismus am 5-HT₄-Rezeptor vermittelt wird (LeMessurier et al., 1959; Kaumann, 1994; Pino et al., 1998; De Maeyer et al., 2006; Gergs et al., 2017). Vermutlich kann der 5-HT₄-Rezeptor auch in Zellen des Sinusknotens einen cAMP-Anstieg über das G_s-Protein und die AC vermitteln (Übersicht: Neumann et al., 2017), wie zuvor schon für die Kardiomyozyten beschrieben. Das cAMP kann in diesem Fall die Offenwahrscheinlichkeit von Kationenkanälen, die durch Hyperpolarisation aktiviert und durch zyklische Nukleotide moduliert werden, (HCN-Kanäle) erhöhen (Pino et al., 1998; Ulens und , 2001; De Maeyer et al., 2006), was die Depolarisation beschleunigt und somit frequenzsteigernd, also positiv chronotrop, wirkt (DiFrancesco und Tortora, 1991).

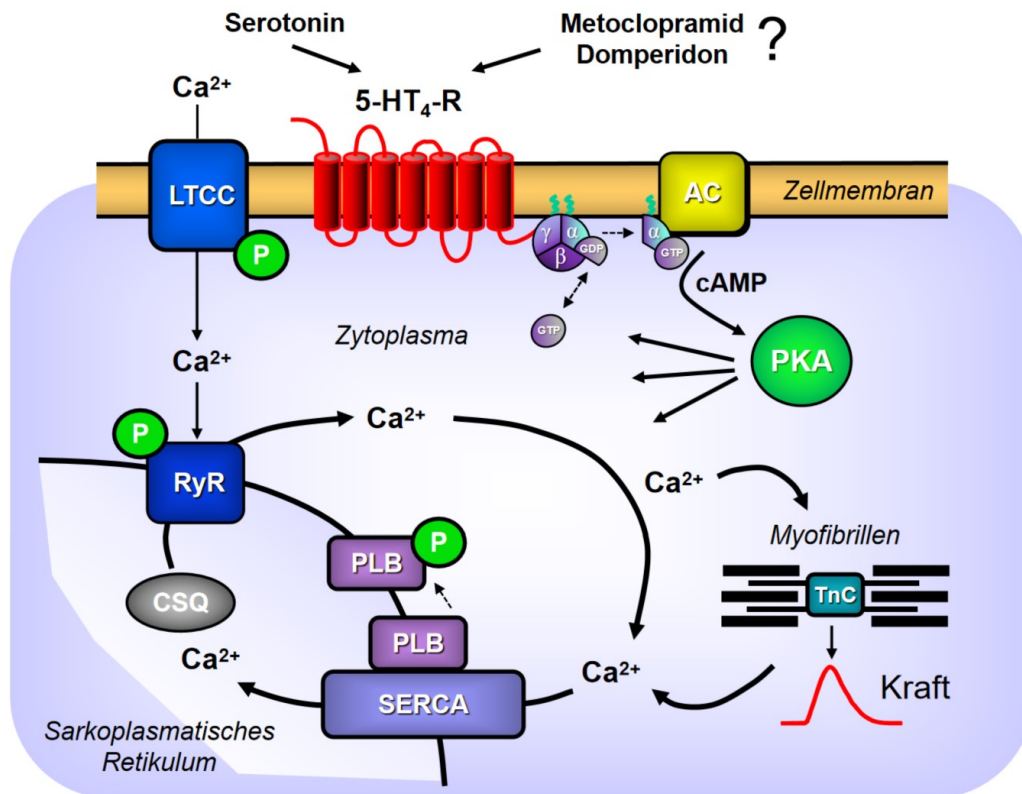


Abb. 2: Schema der Signaltransduktion via 5-HT₄-Rezeptoren in Kardiomyozyten

α / β / γ, α- / β- / γ-Untereinheit des stimulatorischen G-Proteins – AC, Adenylatzyklase – Ca²⁺, Calcium-Ion – cAMP, zyklisches Adenosinmonophosphat – CSQ, Calsequestrin – GDP, Guanosindiphosphat – GTP, Guanosintriphosphat – LTCC, L-Typ-Calcium-Kanal – P, Phosphorylierung – PKA, Proteinkinase A – PLB, Phospholamban – RyR, Ryanodin-Rezeptor – SERCA, sarkoplasmatische Calcium-ATPase – TnC, Troponin C – 5-HT₄-R, Serotonin₄-Rezeptor

2 Zielsetzung und klinische Relevanz

MCP und Domperidon sind, wie einleitend schon aufgezeigt, beides häufig eingesetzte Prokinetika und Antiemetika und erfreuen sich in den letzten Jahren erhöhter klinischer Beliebtheit (Tonini et al., 2004; Pasricha et al., 2006; Lohse und Mössner, 2019). Im Vergleich zu MCP besitzt Domperidon wohl den Vorteil seltener zentralnervöse Störungen zu bedingen (Bor et al., 2018). Jedoch ist in einigen Fachkreisen die Wirksamkeit Domperidons umstritten (Hondegheem, 2013). Beide haben allerdings die Gemeinsamkeit schon seit längerem mit kardialen Nebenwirkungen in Verbindung gebracht zu werden (Midttun und Oberg, 1994; Grenier und Drolet, 2003; Straus et al., 2005; Johannes et al., 2010; Al-Shaer et al., 2015). Vor allem in den letzten zehn Jahren häufen sich die Studien, in denen ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse unter Metoclopramid- oder Domperidoneinnahme gezeigt werden konnte (Hondegheem, 2013; Arana et al., 2015; Bor et al., 2018). Demzufolge gibt es auch immer wieder Anregungen, eine der beiden Substanzen vom Markt zu nehmen (Michaud und Turgeon, 2013) oder in ihrer Zulassung weiter zu beschränken (vgl. 1.1). Warum unter Metoclopramid- oder Domperidoneinnahme vermehrt kardiovaskuläre Ereignisse beobachtet werden können, ist allerdings noch Anlass aktueller Forschung, wobei mehrere Erklärungsansätze verfolgt werden (vgl. 1.1.2). Ein möglicher Ansatz sind Interaktionen am 5-HT₄-Rezeptor, worauf im Folgenden näher eingegangen werden soll.

Wie in Kapitel 1.2 erläutert, kann der 5-HT₄-Rezeptor eine höhere Offenwahrscheinlichkeit sowohl des LTCC als auch des HCN-Kanals vermitteln, was zu Tachykardien und supraventrikulären Arrhythmien führen kann (Pino et al., 1998). In früheren Arbeiten konnten auch schon über den 5-HT₄-Rezeptor vermittelte Arrhythmien nachgewiesen werden (Kaumann und Sanders, 1994; Gergs et al., 2010; Keller et al., 2017). Des Weiteren sollen die proarrhythmischen Eigenschaften des 5-HT₄-Rezeptors durch längere Einnahme von β -Blockern gesteigert werden (Kaumann und Sanders, 1994). Außerdem konnte in Experimenten an jungen Schweinen gezeigt werden, dass ein selektiver Antagonist am 5-HT₄-Rezeptor antiarrhythmisch wirkt (Rahme et al., 1999). Dies in Verbindung mit dem Wissen, dass MCP mit diesem Rezeptor interagiert

(Medhurst und Kaumann, 1993; Tonini 1996; Broad et al., 2014), qualifiziert den 5-HT₄-Rezeptor ausreichend, um hier in den Fokus der Versuche mit den antiemetisch und prokinetisch wirksamen Medikamenten MCP und Domperidon gestellt zu werden. Bekanntlich kann das Prokinetikum Cisaprid, ein Agonist am 5-HT₄-Rezeptor, Arrhythmien vermitteln (Humphrey und Bunce, 1992; Keller et al., 2017).

Ziel dieser Arbeit ist es daher zu klären, welche kardialen Wirkungen MCP und vergleichend dazu Domperidon am Herzen von Wildtyp-Mäusen und 5-HT_{4a}-überexprimierenden Mäusen sowie an menschlichen Vorhöfen ausüben, um damit abschätzen zu können, inwieweit diese als Erklärung für die kardiovaskulären Nebenwirkungen dieser Medikamente herangezogen werden können bzw. um damit einen grundlegenden Beitrag zu diesem aktuellen Forschungsgegenstand zu leisten.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Der Umgang und die Haltung der Labormäuse entsprach dem deutschen Tierschutzgesetz und wurde von der Tierschutz-Kommission der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg genehmigt. So bekamen die Mäuse Wasser und handelsübliches Labortierfutter ad libitum. Außerdem wurden sie geschlechtsgetrennt gehalten und nur zum Zweck der Verpaarung zusammengesetzt.

Für die Kontraktionsexperimente wurden insgesamt 59 Mäuse des Auszuchtstammes CD1 verwendet, die ein durchschnittliches Alter von 155 ± 6 Tagen aufwiesen. Diese ließen sich weiter aufgliedern in 17 5-HT_{4a}-Rezeptor transgene männliche und 20 5-HT_{4a}-Rezeptor transgene weibliche Mäuse sowie zwölf männliche Wildtyp-Vergleichsmäuse und zehn weibliche Wildtyp-Vergleichsmäuse. Die unterschiedliche Anzahl von transgenen und Wildtyp-Mäusen entspricht den verschiedenen Versuchsanordnungen, die im Folgenden noch näher charakterisiert werden (s. 3.4.5).

Alle der zuvor genannten Versuchstiere kamen bei den nachfolgend beschriebenen Kontraktionsversuchen zum Einsatz, wobei von diesen fünf männliche TG- und fünf männliche WT- sowie vier weibliche TG- und vier weibliche WT-Mäuse zusätzlich für das Western-blotting herangezogen wurden.

3.2 Generierung der transgenen Mäuse

Die in den Versuchen verwendete transgene Mauslinie weist eine funktionelle, herzspezifische Überexpression des humanen 5-HT_{4a}-Rezeptors auf (Gergs et al., 2010; Gergs et al., 2013). Mittels RT-PCR wurde hierfür ein 1.206 bp langes DNA-Produkt, welches die kodierende Sequenz des menschlichen 5-HT_{4a}-Rezeptors enthielt, aus menschlichem Herzgewebe isoliert. Durch die Restriktionsendonukleasen KpnI und SacI wurde aus dem PCR-Produkt die 1.164 bp lange, codierende Sequenz des Rezeptors ausgeschnitten und diese Sequenz anschließend in eine Expressionskassette eingefügt. Die Expressionskassette bestand aus der Promotersequenz der α -Isoform der schweren Kette des Myosins, einem

mausspezifischen Promoter, um eine gewebespezifische Expression der Sequenz zu gewährleisten, und einer Polyadenilierungssignalsequenz des Siamivirus 40, die die Transkription terminierte. Mit Hilfe eines 7,1 kbp langem Nrul-Fragments wurde eine Mikroinjektion des so erstellten Transgens in befruchtete Eizellen von Mäusen vorgenommen. Die dadurch erzeugten, transgen positiven Mäuse wurden mittels Southern-blotting und PCR identifiziert und anschließend in den CD1 Auszuchtstamm eingekreuzt (Gergs et al., 2010).

Wenn im Folgenden von transgenen Mäusen (TG) die Rede ist, wird sich auf die hier beschriebene, transgene Mauslinie bezogen.

3.3 Genotypisierung der Mäuse

3.3.1 Extraktion und Isolation der DNA

Im Alter von ungefähr vier Wochen trennte man allen Mäusen zur Genotypisierung ein ca. 2 mm langes Stück der Schwanzspitze durch Scherenschnitt ab. Im Zuge dessen erhielten die Mäuse eine Ohrmarke mit dreistelliger Nummer zur Identifikation. Die abgetrennten Schwanzbiopsien wurden danach zusammen mit 25 mM NaOH und 0,1 mM EDTA in 250 µL Wasser für 20 Stunden unter Bewegung bei 56 °C in einem Eppendorfgefäß inkubiert. Im Anschluss wurden diesem Gefäß 250 µL Wasser mit darin gelösten 1,5 mM Tris HCl zur Neutralisation beigefügt, für eine ausreichende Vermischung gesorgt und das entstandene Gemisch für eine PCR bereitgehalten.

3.3.2 PCR-Amplifikation der DNA und Agarosegel-Elektrophorese

Mittels PCR wurde ein 508 bp langes Fragment der für den humanen 5-HT_{4a}-Rezeptor codierenden DNA-Sequenz vervielfältigt. Dafür wurde in ein Eppendorfgefäß der Reaktionsansatz, bestehend aus 10 µl Mastermix, 0,5 µl Forward-Primer, 0,5 µl Reverse-Primer und 8 µl Wasser, gegeben und 1 µl des zuvor erstellten Gemisches (s. 3.3.1) hinzugefügt. Das befüllte Gefäß gab man daraufhin in das PCR-Gerät und startete das im Anhang aufgeführte PCR-Programm.

Im Anschluss erfolgte eine Agarosegel-Elektrophorese zur Auftrennung der DNA-Fragmente unter Mitführung einer 1 kbp DNA-Leiter sowie einer Positiv- und einer

Negativkontrolle. Hierfür wurde ein einprozentiges Agarosegel gegossen, indem man je 1 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer kochte und mit 10 μ l RedSafe in der entsprechenden Form polymerisieren ließ. Nach Pipettierung von 15 μ l des nach Ablauf des Programms aus dem PCR-Gerät entnommenen Gemisches bzw. 8 μ l der als Marker dienenden 1 kbp DNA - Leiter in die jeweilige Tasche des Agarosegels wurde die Agarosegel-Elektrophorese-Einheit für ca. 30 Minuten bei 100 mA betrieben und das Ergebnis fotodokumentiert (Green und Sambrook, 2012).

3.4 Kontraktionsversuche

3.4.1 Vorbereitung

Die Messanlage für die Kontraktionsversuche bestand aus vier Doppelwandgefäßen mit einem inneren Volumen von 10 ml (Abb. 3), sodass an jedem Versuchstag zwei Mäuse präpariert werden konnten. Zu Beginn des Versuches wurde die Aufzeichnungseinheit, das Bad-Umwälzthermostat und das mit den Reizelektroden verbundene Reizgerät eingeschaltet sowie der Computer mit der Software Windows 7 gestartet. Auf dem Computer wurde das Programm LabChart 8 geöffnet und die Kalibrierung der Messanlage vorgenommen. Hierfür wurde jeweils die Vorrichtung zum Einspannen des Vorhofes aus dem Doppelwandgefäß gehoben und die Gewichtskraft des Drahtes, welcher die Verbindung zwischen Kraftaufnehmer und Atrium herstellen soll, als Kraft Null eingestellt. Anschließend wurde ein Gewicht, welches eine Kraft von 5 mN erzeugt, an das untere Ende des Drahtes angehängt und der entsprechende Messwert am Computer als 5 mN festgelegt.

Des Weiteren musste die benötigte Tyrode-Lösung für den Versuch hergestellt werden. Dafür füllte man 800 ml Wasser in einen Messzylinder und gab 40 ml Stammlösung I, 38 ml Stammlösung II und 20 ml Stammlösung III hinzu (für die Zusammensetzung der Stammlösungen siehe Kapitel 9.2). Im Anschluss begann man mit der ab diesem Zeitpunkt durchgehenden Begasung der Lösung mit Carbogen. Nach zehn Minuten, in denen sich der pH-Wert auf ca. 7,4 eingestellt hatte, gab man 0,8 ml Stammlösung IV sowie 1 g Glucose, 49 mg Ascorbinsäure und 19,9 mg EDTA hinzu und füllte den Messzylinder mit Wasser auf einen Liter auf. Die fertige Tyrode-Lösung verblieb

zunächst bei Raumtemperatur (ca. 20 °C), wobei zeitgleich schon ein Wasserbecken durch ein Wärmethermostat bei 37 °C temperiert wurde.

Außerdem wurden die Doppelwandgefäße vor jedem Versuch fünfmal mit Wasser und im Anschluss einmal mit Tyrode-Lösung gespült und danach mit 10 ml Tyrode-Lösung befüllt. Letztlich wurde noch die Carbogenbegasung der Doppelwandgefäße zugeschaltet.

Darüber hinaus wurde einerseits der Arbeitsplatz zur Organentnahme sorgfältig vorbereitet und ein Behältnis mit Tyrode-Lösung an diesem bereitgestellt, und andererseits der Arbeitsplatz zur Präparation der Atrien eingerichtet, indem eine silikonbeschichtete Schale mit Tyrode-Lösung befüllt und mit Carbogen begast wurde.

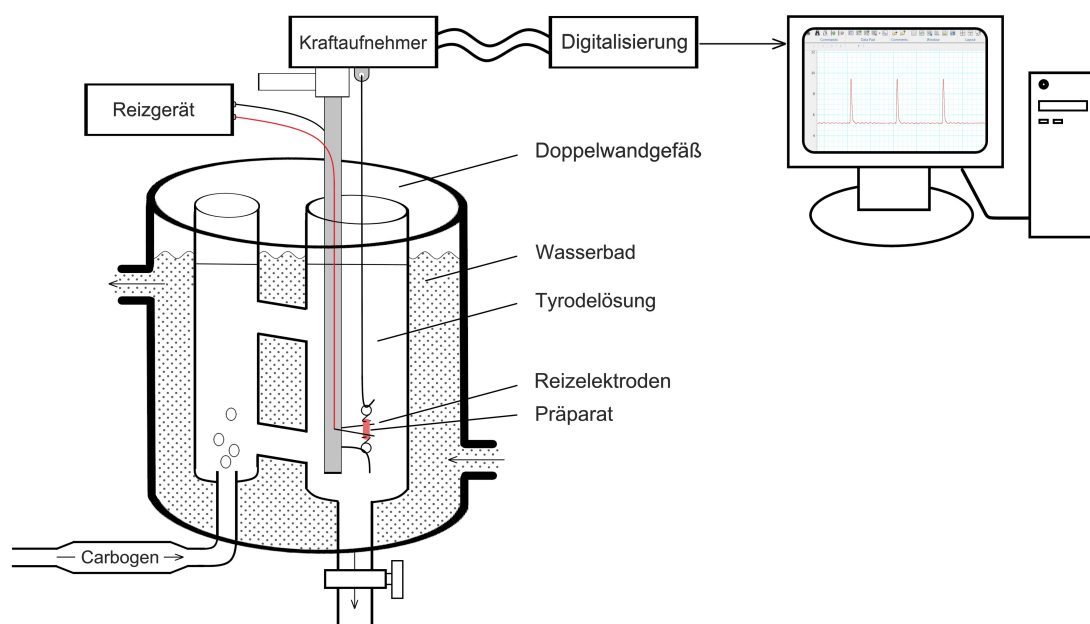


Abb. 3: Messanlage für Kontraktionsversuche im Schema

Die Abbildung zeigt schematisch eines der vier Doppelwandgefäße mit einem darin eingespannten Präparat, das zwischen den mit dem Reizgerät verbundenen Reizelektroden hängt. Über den Kraftaufnehmer wird die Kraft des Präparates gemessen, digitalisiert und am Computer als Mechanogramm aufgezeichnet. Das Präparat befindet sich in der mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begasteten Tyrode-Lösung von 37 °C, die durch das Wasserbad im Doppelwandgefäß über ein Bad-Umwälzthermostat temperiert wird.

3.4.2 Organentnahme bei den Mäusen

Zunächst wurde die Maus anhand ihrer Ohrmarke identifiziert und gewogen, um das Narkosemittel gewichtsadaptiert spritzen zu können. Im Anschluss wurden dem Versuchstier 1000 IE Heparin intraperitoneal gespritzt, um relevanten Thrombosen in Ventrikeln oder Atrien unter der Präparation vorzubeugen. Im gleichen Zuge wurden dem Tier auch 0,25 mg Pentobarbital pro Gramm Körpergewicht intraperitoneal verabreicht. Diese Art der Narkotisierung wurde ausgewählt, um eine tiefe Form der Sedierung, bei gleichzeitig unterdrückter Schmerzempfindung, zu erreichen. Dies war insbesondere von Bedeutung, weil eine schmerzbedingte Katecholaminausschüttung durch entsprechende kardiale Wirkungen die nachfolgenden Messungen möglicherweise verfälscht hätten. Der Narkotisierungserfolg wurde mit unterschiedlich intensiven Schmerzreizen überprüft, bevor man die Maus in Rückenlage auf einer silikonbeschichteten Schale mittels Stecknadeln fixierte. Nach Palpation des Sternums wurde die Haut kaudal davon durch einen Scherenschnitt entfernt. Mit einem weiteren Schnitt eröffnete man den Bauchraum und verschaffte sich Sicht auf das Zwerchfell. Nun konnte das Zwerchfell gezielt durchtrennt werden, wodurch die Lunge kollabierte und die Rippen samt Muskeln und darüber liegender Haut auf beiden Seiten in ihren lateralen Anteilen von kaudal nach kranial durchschnitten werden konnten. Das so geschaffene, sternocostale Schild wurde mit Hilfe einer Klemme nach kranial umgeschlagen und dort so fixiert, dass man Einblick von ventral auf das pulsierende Herz-Lungen-Paket erhielt (Frenker, 2013). Somit wurde ermöglicht, mit einer gebogenen Pinzette von dorsal unter das Herz-Lungen-Paket zu greifen, es nach ventral zu mobilisieren und es anschließend mittels Durchtrennung von Aortenbogen, Vena cava superior und inferior sowie Trachea zu entnehmen. Das entnommene Paket wurde unverzüglich in ein Behältnis mit Tyrode-Lösung überführt und das Herz durch leichte Palpation zwischen Zeigefinger und Behältniswand blutleer gepumpt. Zum Wiegen auf einer Analysenwaage entnahm man das Organpaket nochmals kurz aus der Tyrode-Lösung, tupfte überschüssige Flüssigkeit ab und platzierte es in einem Waageschälchen, ehe es wieder zurück ins Behältnis mit Tyrode-Lösung gelegt werden konnte.

Außerdem wurden ca. 5 mm von der Schwanzspitze der Maus abgetrennt und in einem beschrifteten 2 ml Eppendorfgefäß eingefroren, um bei etwaigen Auffälligkeiten eine erneute Genotypisierung durchführen zu können. Der übrige Kadaver wurde ordnungsgemäß entsorgt.

3.4.3 Präparation der Mäuseherzen

Das Herz-Lungen-Paket wurde in die bereits vorbereitete, silikonbeschichtete Schale mit begaster Tyrode-Lösung gelegt und die Ventrikel durch eine Stecknadel im Gefäß fixiert. Anschließend wurden die Lungenflügel abpräpariert und in einem separaten Plastischälchen aufbewahrt. Danach platzierte man das Herz so, dass die Atrien für den Präparator gut sichtbar waren. Reste des Perikards oder der Aorta wurden gegebenenfalls entfernt und zur abpräparierten Lunge gelegt. Der linke Vorhof konnte dann mit einem Scherenschnitt zwischen Ventrikel und Vorhof abgetrennt werden. Mittels Nadelhalter wurde ein feiner Metallhaken in den Knotenpunkt der Muskelfaserverläufe des Vorhofs gestochen. Einen zweiten Haken platzierte man längs in Faserrichtung zum ersten sowie möglichst weit entfernt von diesem. Um die Gefahr zu minimieren, dass der Haken während des Versuches ausriss, durfte dieser allerdings nicht zu nah am Rand des Atriums eingestochen werden (Frenker, 2013).

Der so vorbereitete, linke Vorhof wurde mit den Haken aus der Präparationsschale entnommen, ohne Verzögerung zur Messanlage der Kontraktionsversuche gebracht und dort mit an den Metallhaken befindlichen Ösen zwischen dem feststehenden und dem mit dem Kraftaufnehmer verbundenen Draht eingespannt (Abb. 3). Diese Vorrichtung senkte man dann vorsichtig in die beheizte und begaste Tyrode-Lösung des Doppelwandgefäßes ab. Danach erfolgte die Stimulation des linken Vorhofs mit einer Rechteckspannung von 10 - 20 % oberhalb der Reizschwelle des Atriums für eine Dauer von jeweils 5 ms und einer Frequenz von 1 Hz. Der Vorhof wurde dabei über zwei nicht direkt mit diesem in Kontakt stehenden Reizelektroden zur Kontraktion angeregt, was insofern notwendig war, weil das linke Atrium selbst über keine relevanten Schrittmacherzellen verfügt. Des Weiteren wurde der Vorhof mittels einer Stellschraube auf 5 mN vorgespannt, um eine isometrische Kontraktion zu erreichen.

Zur Präparation des rechten Vorhofes bedurfte es einer leicht abgewandelten Vorgehensweise, um die sensiblen Schrittmacherzellen des Sinusknoten nicht zu gefährden. Hierfür wurde zunächst vorhofnah mit der Schere quer durch den Ventrikel geschnitten, sodass man den Vorhof zusammen mit dem Übergang zur Kammer von der übrigen Kammer abtrennte. Danach wurde seitens der Kammer diese präzise vom Atrium abgesetzt. Der noch immer rhythmisch kontrahierende, rechte Vorhof wurde anschließend ebenfalls mit zwei Haken versehen. Der erste Haken wurde dabei möglichst lateral der Cavaeinmündung, der zweite am apikal gelegenen Teil des Atriums platziert. Das weitere Vorgehen ist abgesehen davon, dass der rechte Vorhof keine äußere elektrische Stimulation benötigte, identisch mit dem beim linken.

Darüber hinaus wurde vom Inhalt des Schälchens mit den Lungenflügeln das Abtropfgewicht mit der Analysenwaage ermittelt und vom Gewicht des Herz-Lungen-Pakets subtrahiert, um das Herzgewicht zu erhalten. Als zweiter Parameter diesbezüglich wurde der verbliebene Ventrikel gewogen und als Restherzgewicht notiert. Danach wurde alles Benötigte zur Präparation der zweiten Maus vorbereitet sowie der Messzylinder mit Tyrode-Lösung in das mit dem Wärmethermostat erwärmte Becken gestellt. Das Vorgehen bei dieser Maus erfolgte analog zur ersten.

Sobald alle vier Vorhöfe eingehängt waren, wurde vor dem eigentlichen Versuchsbeginn dreimal die Tyrode-Lösung in den Doppelwandgefäßen ausgetauscht und anschließend jeweils zehn Minuten gewartet. Dies geschah um den Versuchsbeginn zu standardisieren und die anfänglichen Schwankungen der atrialen Kontraktionskraft und Frequenz durch die Manipulation bei der Präparation im auszuwertenden Versuchsteil möglichst gering zu halten. Außerdem bestand unmittelbar nach der zweiten dieser Spülungen die Möglichkeit, wenn nötig, die Atrien wieder auf eine optimale Vorspannung zu korrigieren, sofern diese sich zuvor verändert hatte.

3.4.4 Menschliche Vorhofpräparate

Aufgrund einer Kooperation mit der Herz-Thorax-Chirurgie des Universitätsklinikums Halle (Saale) gelang es, einige Versuche an rechten menschlichen Vorhofpräparaten durchzuführen. Dies geschah entsprechend dem Ethikantrag (hm-bü 04.08.2005), der durch die Ethikkommission der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg genehmigt worden war und fußte auf der Deklaration von Helsinki. Die Patienten wurden vor der Entnahme aufgeklärt. Eine tabellarische Aufführung wichtiger Patientendaten befindet sich im Anhang (s. 9.5).

Für die Experimente wurden Gewebestücken von ca. 1 cm² Fläche, die bei Bypass-Operationen zum Anschluss der Herz-Lungen-Maschine entnommen wurden, innerhalb einer Stunde in das hiesige Institut für Pharmakologie und Toxikologie überführt.

In einer mit begaster Tyrode-Lösung vorbereiteten, silikonbeschichteten Schale wurde dieses Gewebestück präpariert, indem man einzelne Trabekel von etwa 5 mm Länge mit einer Schere vorsichtig abtrennte. Diese Muskelbälkchen durchstach man, in Längsrichtung voneinander weitest möglich entfernt, mit zwei der zuvor beschriebenen Metallhaken (s. 3.4.3) und hing diese Trabekel mit Hilfe der daran befindlichen Ösen, wie zuvor bei der Präparation der Mäuseherzen beschrieben, einzeln im Organbad ein. Auch alle übrigen Schritte erfolgten wie zuvor bei den Mäuseversuchen beschrieben, mit dem einzigen Unterschied, dass die menschlichen rechten Vorhofpräparate allesamt eine äußere elektrische Stimulation mit Rechteckimpulsen von 5 ms Dauer und 5 V Reizspannung mit einer Frequenz von 1 Hz bedurften.

3.4.5 Versuchsdurchführung an den Mäuseatrien

Nachdem wie zuvor beschrieben (s. 3.4.3) ein mehrmaliger Badwechsel stattfand, um eine konstante Ausgangslage hinsichtlich der Kraft bei den linken Atrien (LA) und hinsichtlich der Frequenz bei den rechten Atrien (RA) zu erreichen, wurden nach erneutem Abwarten von mindestens zehn Minuten nach dem letzten Badwechsel die gemessenen Parameter (s. 3.6.1) als Ruhelage bzw. Kontrolle (Ktr) des entsprechenden Atriums deklariert. Unmittelbar danach konnte mit der Zugabe der

Substanzen, wie in Abb. 4 veranschaulicht, begonnen werden. Sofern innerhalb von fünf Minuten vor der ersten Substanzzugabe Arrhythmien aufgetreten sind, wurden diese als basale Arrhythmien benannt.

Die Substanzzugabe erfolgte, indem zu den vier, mit je 10 ml Tyrode-Lösung gefüllten Organbädern zwischen 10 μ l und 100 μ l der jeweiligen Substanz, aus einer zuvor entsprechend vorbereiteten Verdünnungsreihe, möglichst kurz hintereinander zupipettiert wurden und im gleichen Zuge entsprechend dazu am Computer eine Markierung in der Aufzeichnung gesetzt wurde. Die zugesetzte Substanzmenge hat man dabei so gewählt, dass in der zugehörigen Konzentrations-Wirkungs-Kurve (KWK) die kumulative Konzentration einer Substanz in logarithmischer Darstellung mit hinreichender Genauigkeit in 0,5er-Schritten, also um $10^{0,5}$, ansteigt.

Nach jeder Applikation wartete man entweder bis bei positiv inotropen Substanzen ein stabiles Plateau bei der Kraft der linken Vorhöfe erreicht wurde oder mindestens fünf Minuten, sofern in dieser Zeitspanne augenscheinlich kein Effekt auf die Kraft bei den LAs festgestellt werden konnte.

Sollten in einem Versuch zwei nicht zueinander kumulative KWKs erfolgen, wurde nach der ersten KWK ein vier- bis fünfmaliger Badwechsel, jeweils im Abstand von sieben bis zehn Minuten, mit frischer, begaster Tyrode-Lösung vorgenommen und anschließend nochmals mindestens zehn Minuten gewartet, um möglichst die Ruhelage der Atrien wieder zu erreichen. Dieser Vorgang wird im Folgenden als Auswaschen (Ausw) bezeichnet.

Am Ende des Versuches wurde außerdem jedem Organbad eine Menge von 1 μ M Isoprenalin zugesetzt, um einen maximalen β -adrenergen Effekt zu erzielen und die mögliche Änderung der Parameter zu verdeutlichen bzw. zu beweisen, dass die Atrien prinzipiell noch fähig waren, mit einem Frequenzanstieg (RA) oder Kraftanstieg (LA) zu reagieren.

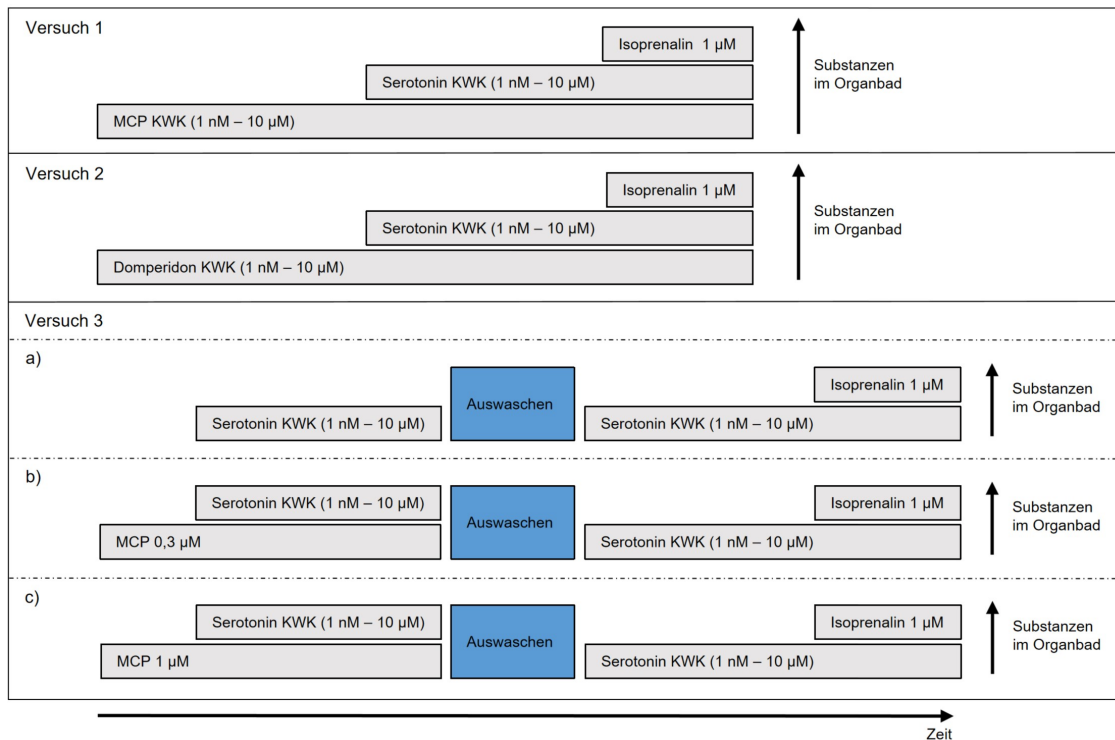


Abb. 4: Die einzelnen Versuche an den Vorhofpräparaten der Mäuse im Schema

Jeder Versuch wurde durch die Hinzugabe von 1 µM Isoprenalin beendet.

Die Balkenlänge entspricht nicht dem realen Zeitintervall, sondern ist so gewählt, dass die Substanznamen und Konzentrationen gut lesbar sind. Vor der Hinzugabe der nächsten Substanz wartete man mindestens fünf Minuten oder bis der Effekt der vorherigen Substanzzugabe sein Plateau erreichte.

KWK, Konzentrations-Wirkungs-Kurve – MCP, Metoclopramid

Experimente zu den Eigeneffekten von Metoclopramid und Domperidon

Die Versuche 1 und 2 wurden so angelegt, um etwaige Unterschiede der vermuteten Eigeneffekte der Substanzen MCP und Domperidon sowohl zwischen einander, als auch im Vergleich zwischen Mäusen mit und ohne humanen Serotoninrezeptor vom Typ 4a feststellen zu können und um dementsprechend auch den über den 5-HT_{4a}-Rezeptor vermittelten Effekt beider Substanzen herausarbeiten zu können. Außerdem sollte es durch den Versuchsablauf möglich sein, diese etwaigen Effekte ins Verhältnis zum Serotonineffekt am gleichen Rezeptor sowie den maximalen β-adrenergen Effekt durch Isoprenalin setzen zu können.

Versuch 1: Für Versuch 1 wurde pro Versuchstag eine WT und eine TG Maus verwendet. Die Mäuse wurden nacheinander präpariert (s. 3.4.2 u. 3.4.3) und die Atrien

einer Maus in jeweils benachbarte Organbäder eingehängt. Die Reihenfolge, in der die Organentnahme und Präparation an WT und TG Mäusen erfolgte sowie die Organbäder, in welche die Vorhöfe eingehängt wurden, wurden dabei von Tag zu Tag variiert, um systematischen Fehlern vorzubeugen. Allen vier Präparaten eines Versuchstages wurden zum nahezu gleichen Zeitpunkt die gleichen Stoffmengen an Substanzen (aus der gleichen Verdünnungsreihe) zugesetzt.

Nach Erreichen der Ruhelage wurden dem Organbad 1 nM MCP und in acht weiteren Schritten die KWK bis auf eine Konzentration von 10 µM MCP im Organbad aufdosiert. Ca. 15 Minuten nachdem letztmalig MCP hinzugegeben wurde, führte man ohne Auswaschen der Konzentration von 10 µM MCP im Organbad zusätzlich eine KWK, in den gleichen Konzentrationsschritten wie zuvor bei MCP (also von 1 nM bis 10 µM), mit Serotonin durch. Abschließend fügte man fünf Minuten nach der letzten Serotoninzugabe und ohne Wechsel der Tyrode-Lösung 1 µM Isoprenalin hinzu.

Versuch 2: Versuch 2 wurde, in Anlehnung an Versuch 1, so ähnlich wie möglich gestaltet, um die Vergleichbarkeit zwischen Domperidon und MCP zu gewährleisten. Demnach wurde, abgesehen davon, dass anstelle von MCP die Substanz Domperidon verwendet wurde, alles übrige nach dem gleichen Protokoll wie in Versuch 1 durchgeführt: So wurde an eine KWK von 1 nM bis 10 µM Domperidon ohne Auswaschen eine KWK von 1 nM bis 10 µM Serotonin angeschlossen und schließlich 1 µM Isoprenalin dem Organbad zugegeben.

Experimente zu den antagonistischen Eigenschaften von Metoclopramid

Nach den Experimenten zum Eigeneffekt von MCP stellte sich die Frage, inwiefern diese Substanz auch antagonistische Effekte am humanen 5-HT_{4a}-Rezeptor vermittelt. Dazu wurde in Vorversuchen ein Protokoll getestet, in dem am selben TG Atrium zwei durch Auswaschen getrennte Serotonin-KWKs von 1 nM bis 10 µM durchgeführt wurden. Diese KWKs unterschieden sich darin, dass jeweils abwechselnd vor einer der beiden Konzentrations-Wirkungs-Kurven eine Konzentration von MCP verabreicht wurde, die in der Größenordnung des vorher ermittelten EC₅₀-Wertes von MCP lag. Ziel dieser Vorgehensweise war es, herauszufinden, ob man Unterschiede zwischen den

KWKs mit Serotonin auf das zuvor hinzugefügte MCP zurückführen könne. Jedoch zeigte sich, dass die vermuteten Effekte überlagert wurden. Eine mögliche Erklärung dafür wären Desensibilisierungseffekte am Serotoninrezeptor (Gergs et al., 2017), die die zweite Serotonin-KWK in dieser Versuchsanordnung verfälschte.

Als Konsequenz daraus wurde das Versuchsprotokoll, wie in Versuch 3 folgt, abgeändert, um die Einflüsse einer vorherigen Zugabe von MCP auf den Serotonineffekt sowie den Einfluss dieser Metoclopramidgabe auf die Desensibilisierung am 5-HT_{4a}-Rezeptor näher beleuchten zu können.

Versuch 3: Hier werden drei ähnliche Versuchsreihen, 3a), 3b) und 3c), unterschieden. Diese wurden mit dem RA und LA der gleichen TG Maus entweder im direkten Vergleich (also am selben Versuchstag in Organbädern derselben Versuchsanlage) zu einer WT Maus und unter Zugabe der gleichen Substanzkonzentrationen oder im direkten Vergleich zu einer zweiten TG Maus einer anderen Versuchsreihe aus Versuch 3 durchgeführt. Dies erfolgte wiederum, um systematische Fehler zu minimieren und eine möglichst gute Vergleichbarkeit der Versuchsreihen untereinander zu erreichen. Lediglich in Versuchsreihe 3a) wurde auf WT Mäuse verzichtet, weil daraus keine weiteren Erkenntnisse erwartet wurden.

Versuchsreihe 3a): Nach Erreichen der Ruhelage wurde vorerst keine Substanz zugegeben, sondern ca. zehn Minuten gewartet bis parallel mit der im direkten Vergleich durchgeführten weiteren Versuchsreihe (also 3b) oder 3c)) eine Serotonin-KWK, beginnend mit 1 nM Serotonin und endend mit einer Konzentration von 10 µM, durchgeführt werden konnte. Fünf Minuten nach der letzten Substanzzugabe folgte das Auswaschen. Daran schloss sich wiederum ein Serotonin-KWK von 1 nM bis 10 µM an. Etwa fünf Minuten nach dieser KWK wurde zum Abschluss noch zusätzlich 1 µM Isoprenalin zugegeben.

Versuchsreihe 3b): Unmittelbar nach der Ruhelage wurde dem Organbad eine Konzentration von 0,3 µM MCP zugesetzt. Nachdem sich am linken transgenen Atrium, ausgehend von der Kraftentwicklung, ein Plateau für mindestens eine Minute eingestellt hatte, wurde eine KWK mit Serotonin (1 nM - 10 µM) erstellt. Daran anschließend wurde, wie auch schon in Versuchsreihe 3a) beschrieben, ausgewaschen, eine Serotonin-KWK

von 1 nM bis 10 μ M durchgeführt und mit der Zugabe von 1 μ M Isoprenalin abgeschlossen.

Versuchsreihe 3c): In Versuchsreihe 3c) wurde, im Gegensatz zu 3b), zu Versuchsbeginn dem Organbad 1 μ M MCP zugefügt. Nach Erreichen des Plateaus, wie zuvor beschrieben, wurde weiter wie in Versuchsreihe 3b) verfahren: Nach erreichtem Plateau wurde eine Serotonin-KWK (1 nM - 10 μ M) durchgeführt, gefolgt vom Auswaschen und einer erneuten Serotonin-KWK (1 nM - 10 μ M), woran sich die abschließende Hinzugabe von 1 μ M Isoprenalin anschloss.

3.4.6 Versuchsdurchführung an menschlichen Vorhofpräparaten

Aufgrund der einsetzenden COVID-19-Pandemie und der damit verbundenen Vielzahl an Einschränkungen in der Forschung und der stationären Gesundheitsversorgung gelang es leider nur eine sehr begrenzte Anzahl an menschlichen Vorhofpräparaten für Experimente ins hiesige Institut zu überführen. Um diesem Umstand Rechnung zu tragen, musste man sich auf die nachfolgend veranschaulichte (Abb. 5) und beschriebene Versuchsreihe begrenzen.

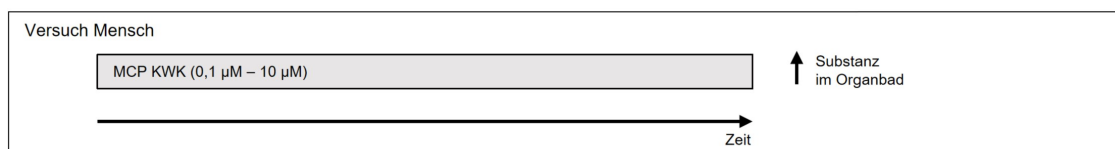


Abb. 5: Der Versuch an den menschlichen Vorhofpräparaten im Schema

KWK, Konzentrations-Wirkungs-Kurve – MCP, Metoclopramid

Vor dem Hintergrund der zu diesem Zeitpunkt bereits vorliegenden Ergebnisse aus den Versuchen an den Mäuseatrien fiel die Entscheidung darauf eine MCP-KWK durchzuführen. In Anlehnung an Versuch 1 (s. 3.4.5) wurde hierfür, nach mehrmaligem Badwechsel und nochmaligem Zuwarten von zehn Minuten nach dem letzten Wechsel, um eine konstante Ausgangslage hinsichtlich der Kraft zu erreichen, 0,1 μ M MCP zupipettiert. In vier weiteren Schritten wurde, nach bewährtem Schema mit mindestens fünf Minuten Wartezeit oder bis ein Plateau der Kraft optisch festzustellen war, eine

Aufdosierung bis 10 μM MCP vorgenommen. Im Anschluss wurde wiederum für mindestens fünf Minuten oder bis ein Plateau der Kraft feststellbar war weiter aufgezeichnet, womit der jeweilige Versuch dann endete.

3.5 Western-blotting

3.5.1 Inkubation der Mäuseventrikel

Einige der bei der Präparation der Mäuseherzen verbliebenen Restherzen wurden nach dem Wiegen weiter in der begasten Tyrode-Lösung belassen und zur Inkubation vorbereitet. Hierfür wurde ein Restherz in acht bis zehn möglichst gleich große Ventrikelstücke von schätzungsweise 10 - 20 mg geteilt. Auf ähnliche Weise sollte ursprünglich auch mit einigen Gewebestücken der menschlichen Vorhofpräparate verfahren werden, aufgrund der in 3.4.6 aufgeführten Gründe musste darauf aber letztlich verzichtet werden.

Zuvor bereitete man entsprechend beschriftete und in Eiswasser gekühlte Eppendorfgefäße vor, indem man sie mit 1 ml begaster Tyrode-Lösung befüllte und als Kontrolle so beließ oder Stoffkonzentrationen von entweder 10 μM MCP, Domperidon oder Serotonin oder 1 μM Isoprenalin hinzugab. Anschließend gab man einzeln die Ventrikelstücke der Maus in jeweils eines dieser Eppendorfgefäße. Wenn dies mit allen Proben des jeweiligen Versuchstages geschehen war, überführte man mit Hilfe einer Halterung alle bestückten Eppendorfgefäße in einen auf 37,5 °C erhitzten Inkubator und beließ sie dort für zehn Minuten, ehe man alle Gefäße wieder zurück ins Eiswasser überführte. Daran anschließend entnahm man die Muskelstückchen, tupfte sie kurz auf Zellstoff ab und frohr sie einzeln in beschrifteten Eppendorfgefäßen mit flüssigem Stickstoff ein. Am Ende des jeweiligen Versuchstages wurden die bis dahin in flüssigem Stickstoff gekühlten Eppendorfgefäße im Ultratiefkühlschrank bei -80 °C archiviert.

3.5.2 Homogenisation der Mäuseventrikel

Die im Ultratiefkühlschrank archivierten, mit inkubierten Mäuseventrikelstücken befüllten Eppendorfgefäße wurden entnommen und mit flüssigem Stickstoff weiter gekühlt. Auf die gleiche Weise wurden ein zum Mikrodismembrator gehöriges

Teflongefäß sowie eine Wolframkugel vorgekühlt. Anschließend wurde das Behältnis mit der Wolframkugel, einem Muskelstück und 100 µl SDS-Homogenisationspuffer befüllt, verschlossen und im Mikrodismembrator eingespannt, welcher mit einer Frequenz von 2700 pro Minute für 60 Sekunden arbeitete. Im Anschluss wurde das entnommene Gefäß geöffnet, die Kugel entfernt und das entstandene Pulver mit einem Spatel in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Diesem Eppendorfgefäß wurden weitere 200 µl des SDS-Homogenisationspuffer zugeführt und das so entstandene Gemisch unter Eiswasserkühlung im Ultraschall-Homogenisator für zweimal 30 Sekunden bei 75 % der maximalen Leistung homogenisiert. Abschließend wurde die Suspension für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, für weitere 30 Minuten in einer Zentrifuge bei 14000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und 240 µl des Überstandes in ein Eppendorfgefäß abpipettiert.

3.5.3 Gel-Elektrophorese und Western-blotting

Zunächst wurden 10 µl des zuvor hergestellten Überstandes (s. 3.5.2) mit 10 µl SDS-Homogenisationspuffer und 20 µl Laemmli-Lösung verdünnt. Hiervon wiederum wurden 10 µl in eine Tasche eines Gradientengels pipettiert und in einer mit Gelelektrophorese-Puffer befüllten Gel-Elektrophorese-Einheit für 70 Minuten bei 126 V und 400 mA zusammen mit einer mit 3 µL Rainbow™-Marker befüllten Tasche laufen gelassen, um die enthaltenen Proteine nach ihrem Gewicht zu trennen. Dabei sammeln sich gleich schwere Proteine in diskreten Zonen, den sogenannten Banden.

Im Anschluss wurde das Gradientengel entnommen, auf eine Blottingmembran gelegt und zwischen Blottingpapier und Schwämmen in der zur Transfer-Einheit gehörigen Transferkassette fixiert. Diese bestückte Transferkassette wurde in die mit Transfer-Puffer befüllte Kammer der Transfer-Einheit gestellt und eine Spannung von 5 V bei 200 mA für 20 Stunden angelegt.

Anschließend wurde die Membran wieder entnommen und unter Berücksichtigung des Rainbow™-Markers bei ungefähr 38 kDa geteilt. Auf dem oberen Teil der Membran, also dem mit Proteinen größer 38 kDa, sollte der Calsequestrinnachweis erfolgen und auf dem unteren der Nachweis des an Serin-16 phosphorylierten Phospholambans.

Hierzu wurden zunächst beide Membranteile für dreimal zehn Minuten mit TBST gewaschen. Der obere Teil wurde sodann für eine Stunde mit 5 % Milchpulver in TBST und der untere zeitgleich mit 2 % Rinderalbumin in TBST geblockt. Danach wurde der entsprechende erste Antikörper, also Anti-Calsequestrin 1 : 1000 in 5 % Milchpulver in TBST bzw. Anti-Ser16P-PLB 1 : 5000 in 2 % Rinderalbumin in TBST, für 20 Stunden bei 4 °C inkubiert. Die Membranteile wurden dann wiederum für dreimal zehn Minuten mit TBST gewaschen. Daran angeschlossen wurde der zweite Antikörper (Anti-Rabbit IgG) 1 : 1000 in 5 % Milchpulver in TBST für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für dreimal zehn Minuten mit TBST und zweimal zwei Minuten mit AP-Puffer gewaschen. Für weitere zwei Minuten wurde im Dunkeln das ECF-Substrat (Chemofluoreszenz-Substrat) in AP-Puffer inkubiert und das Fluoreszenzsignal im Anschluss mit dem Typhoon-Scanner bei 600 V und der Einstellung „green Fluoreszenz“ bei 532 nm ausgelesen.

3.6 Auswertung

3.6.1 Kontraktionsversuche

Zur Auswertung der Kontraktionsversuche wurde das Programm LabChart 8 verwendet (die nachfolgend angeführten Bezeichnungen in Anführungszeichen beziehen sich auf Namen in diesem Programm), das auch zur Aufzeichnung der Versuche benutzt wurde. Nach Zugabe der jeweiligen Substanz oder zum Zeitpunkt der Ruhelage, wurde jeweils im Plateaubereich des jeweiligen Effektes ein Zeitraum von mindestens 30 Sekunden markiert, über welchen die erhobenen Parameter gemittelt wurden.

An den linken Mausatrien und rechten menschlichen Vorhöfen wurde auf diesen Zeitraum die gemittelte Kraft, indem man vom „Average Cyclic Maximum“ in mN das „Average Cyclic Minimum“ in mN subtrahierte, ermittelt. Des Weiteren wurden auch die Anspannungszeit (T1), indem man die „T Rise“ in ms zwischen 10 % und 90 % der Kraft, die Erschlaffungszeit (T2), indem man die „T Fall“ in ms zwischen 90 % und 10 % der Kraft, der maximale Kraftanstieg, indem man die „Max Slope“ in mN/s, und der maximale Kraftabfall, indem man die „Min Slope“ in mN/s der einzelnen Kontraktionen durch das Programm bestimmen ließ und von diesen Werten den Durchschnitt aller in

diesem Zeitraum markierten Kontraktionen bildete, bei den jeweils angegebenen Substanzkonzentrationen ermittelt.

An den rechten Mausvorhöfen wurde die Frequenz durch die Funktion „Average Cyclic Rate“ in bpm des Programmes ermittelt.

Abgesehen davon wurden die Zeiträume der verschiedenen Versuchsbedingungen im Organbad nach Unregelmäßigkeiten in der Folge der Schläge durchsucht, Auffälligkeiten dahingehend als Arrhythmie bezeichnet und einzeln für jedes Atrium aufgelistet.

3.6.2 Western-blotting

Mit Hilfe des Programmes ImageQuant wurden die mit dem Typhoon-Scanner eingelesenen Western-Blots ausgewertet. Hierfür wurden die Spuren, in denen sich die Banden befanden, digital in einheitlicher Breite markiert und das Hintergrundsignal mit der „rolling ball“-Funktion abgezogen. Daraufhin markierte das Programm automatisch die Peaks und der Auswerter konnte, sofern notwendig, korrigierend einwirken. Als Maßzahl für die jeweilige Bande wurde das von der Software errechnete Volumen unter dem zugehörigen Peak herangezogen.

3.6.3 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurden als erstes alle erhobenen Parameter in Tabellen des Programmes Microsoft Excel gesammelt, geordnet und die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler des arithmetischen Mittelwertes (SEM) berechnet. Mit dem Programm Prism 5 wurden schließlich alle abgebildeten Diagramme erstellt. Außerdem wurde mit diesem Programm die statistische Analyse durchgeführt: Für den Vergleich zweier Gruppen miteinander wurde jeweils ein t-Test für verbundene oder unverbundene Stichproben und für den Vergleich mehrerer Gruppen untereinander eine einfaktorielle Varianzanalyse (one-way ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Wenn geprüft werden sollte, ob zwei Merkmale voneinander stochastisch unabhängig verteilt sind, wurde der Chi-Quadrat-Test angewandt. Bei allen drei Analysen wurden Überschreitungswahrscheinlichkeiten bzw. p -Werte, die kleiner als 0,05 waren,

($p < 0,05$) als signifikant angesehen.

Zudem wurden mit dem Programm Prism 5 mit Hilfe nichtlinearer Regression für „Sigmoidal dose - response“ - Funktionen die EC_{50} - Werte der Konzentrations - Wirkungs-Kurven ermittelt und als negativer Logarithmus der EC_{50} -Werte (pEC_{50}) dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Mausversuche

4.1.1 Genotypisierung der Versuchstiere

Wie in 3.3 näher erläutert, wurde zur Identifizierung der transgenen Mäuse eine Genotypisierung anhand der aus der Schwanzspitze gewonnenen DNA vorgenommen. Hierbei wurde versucht ein 508 bp langes DNA-Fragment aus der DNA des humanen 5-HT_{4a}-Rezeptors zu amplifizieren und anschließend nachzuweisen. Gelingt dies, indem in entsprechender Höhe eine Bande in der Agarosegel-Elektrophorese sichtbar war, wurde die jeweilige Maus als transgen für den humanen 5-HT_{4a}-Rezeptor (TG) bezeichnet. Gelingt dies nicht, also zeigte sich in entsprechender Höhe keine Bande, wurde von einer Wildtypmaus (WT) ausgegangen.

Nachstehend ist beispielhaft das Ergebnis einer solchen Genotypisierung dargestellt. Für die eigentliche Anzahl der verwendeten WT und TG Mäuse sowie deren Grunddaten darf auf 4.1.2 verwiesen werden.

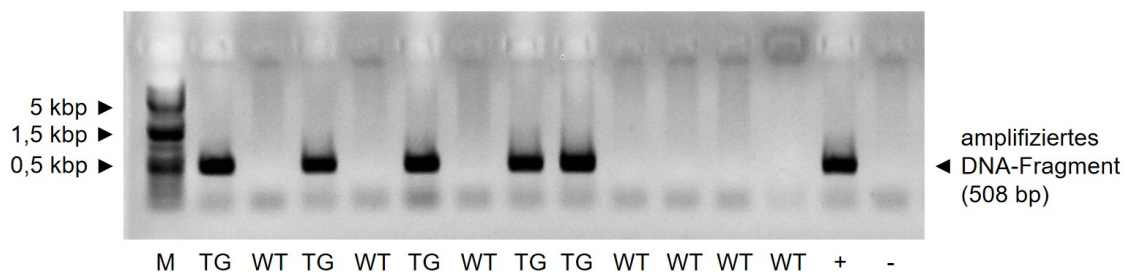


Abb. 6: Beispielhaftes Ergebnis der Genotypisierung der Mäuse

Dargestellt ist das Negativbild eines Fotoausschnittes als Dokumentation der Genotypisierung. Auf der linken Seite des Ausschnittes ist die Länge der jeweiligen Referenzbanden der als Marker (M) dienenden 1 kbp DNA-Leiter in Kilobasenpaaren (kbp) angegeben. Rechts vom Ausschnitt ist die erwartete Länge der Bande des amplifizierten DNA-Fragmentes gekennzeichnet.

bp, Basenpaare – TG, transgen – WT, wildtyp – +, Positivkontrolle – -, Negativkontrolle

4.1.2 Grunddaten der Versuchstiere

Für die Versuche wurden 59 Mäuse verwendet, die durchschnittlich $35,6 \pm 0,8$ g wogen. Zwischen dem Gewicht der WT und TG Mäuse gab es keinen Unterschied. Jedoch

waren die Weibchen mit $32,7 \pm 1,1$ g signifikant leichter als die Männchen mit $38,6 \pm 1,0$ g.

Das ermittelte Herzgewicht der TG Mäuse (s. 3.4.3) war mit 241 ± 7 mg signifikant leichter als das der WT Mäuse (278 ± 10 mg). Auch das Herzgewicht der Weibchen lag mit 226 ± 7 mg signifikant unter dem der Männchen (285 ± 7 mg). Setzte man allerdings das Herzgewicht ins Verhältnis zum Körpergewicht (= relatives Herzgewicht), zeigten sich keine Unterschiede mehr. Das Herzgewicht aller Versuchstiere betrug im Mittel $0,73 \pm 0,02$ % ihres Körpergewichtes. Für das durchschnittliche Restherzgewicht aller verwendeten Tiere (158 ± 3 mg) zeigte sich zwar auf ähnliche Weise ein geringeres bei den Weibchen, jedoch ergaben sich in Relation zum Körpergewicht wiederum keine Unterschiede (s. Abb. 7e)).

Das durchschnittliche Alter der WT Mäuse betrug 153 ± 5 Tage und das der Transgenen 156 ± 10 Tage, sodass dahingehend kein signifikanter Unterschied bestand.

Die in 3.6.1 ausgewertete Kraft der linken Atrien aller 59 verwendeten Präparate betrug durchschnittlich $5,2 \pm 0,3$ mN und unterschied sich sowohl zwischen WT und TG als auch zwischen männlichen und weiblichen Mäusen nicht signifikant. Die Anspannungszeit dieser Atrien in Ruhelage lag mit $14,5 \pm 0,1$ ms bei den Wildtypen allerdings signifikant unter der der Transgenen ($15,2 \pm 0,1$ ms). Unter basalen Bedingungen zeigten sich bei der Erschlaffungszeit keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) zwischen den Geschlechtern oder zwischen WT ($39,7 \pm 2,4$ ms) und TG ($42,0 \pm 1,9$ ms) Mäusen. Ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen Untergruppen zeigten sich zu Versuchsbeginn im Hinblick auf den maximalen Kraftanstieg und maximalen Kraftabfall der linken Atrien. Im Durchschnitt lag der maximale Kraftanstieg für alle 59 Präparate bei 325 ± 18 mN/s und der maximale Kraftabfall bei 168 ± 9 mN/s. Unter diesen basalen Bedingungen wiesen außerdem 0 von 22 (0 %) LAs von Wildtypmäusen und 5 von 37 (14 %) LAs von transgenen Mäusen Arrhythmien auf. Die Nullhypothese des zugehörigen Chi-Quadrat-Tests konnte allerdings nicht verworfen werden.

3 der 59 präparierten, rechten Mausvorhöfe zeigten zu Versuchsbeginn gar keine spontanen Kontraktionen und konnten somit nicht ausgewertet werden. Die übrigen 56

Vorhöfe schlugen durchschnittlich mit 400 ± 11 bpm in Ruhelage, wobei die TG Atrien mit 424 ± 9 bpm eine signifikant höhere Frequenz als die 19 Wildtypen (389 ± 11 bpm) aufwiesen. Zwischen den Vorhöfen männlicher und weiblicher Versuchstiere bestand bei diesem Parameter in Ruhelage kein signifikanter Unterschied. Arrhythmien wiesen unter diesen Bedingungen 3 der 19 (16 %) WT Atrien und 5 der 37 (14 %) TG Atrien auf.

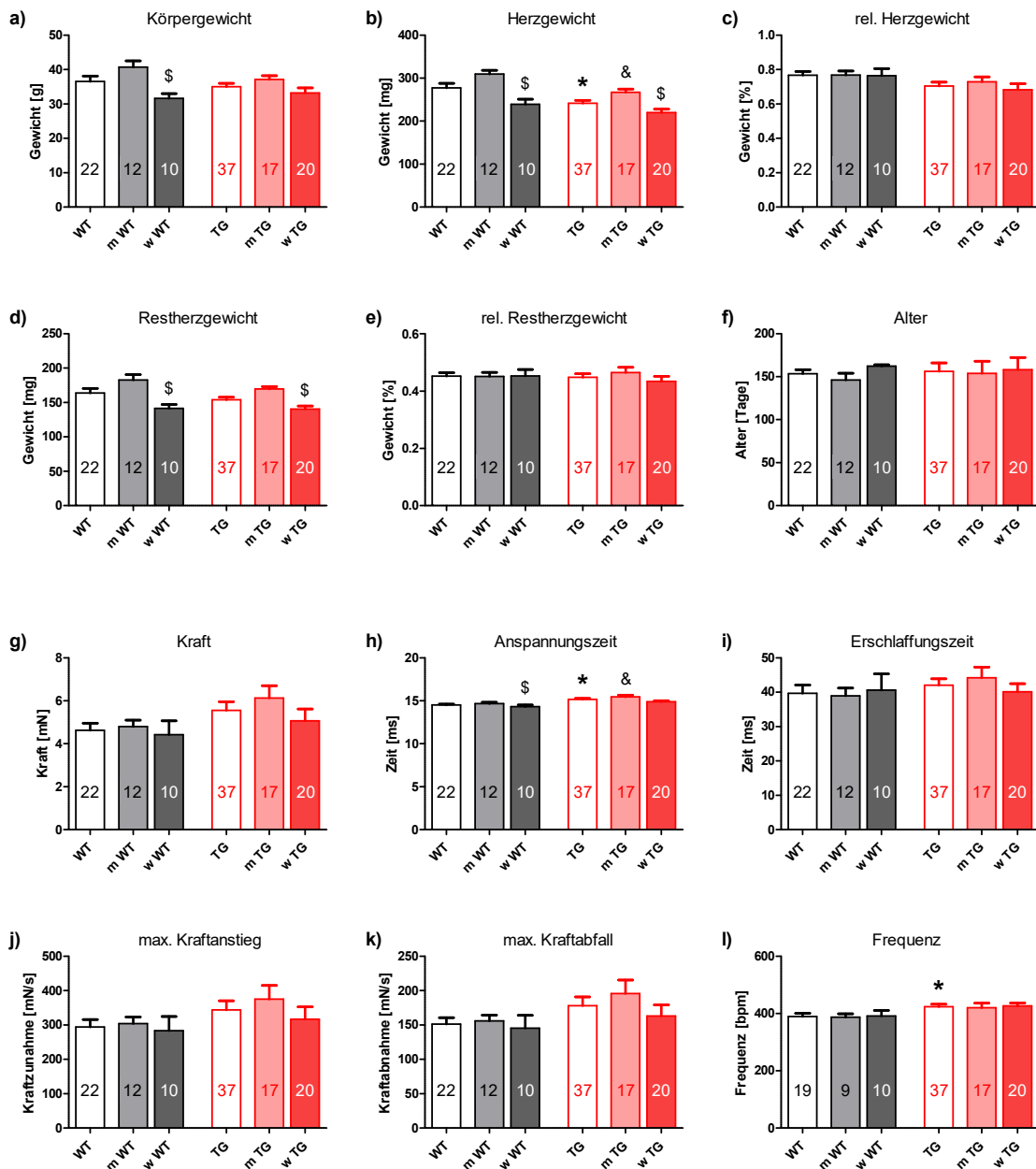


Abb. 7: Übersicht über die Grunddaten der Versuchstiere als Säulendiagramm

Die Höhe der Säule entspricht dem Durchschnittswert und der Querstrich darüber steht für den Standardfehler des Mittelwertes. Die Zahl in der Säule gibt die Anzahl der Versuchstiere wieder.

Die schwarz umrandeten Säulen symbolisieren WT Mäuse, wobei die erste Säule der jeweiligen Dreiergruppe die gesamten Wildtypmäuse (WT) darstellt und mit der zweiten und dritten Säule jeweils eine Geschlechterunterscheidung, also männliche WT (m WT) und weibliche WT (w WT), vorgenommen wird. Selbiges gilt für die rot umrandeten TG-Säulen: Die vierte Säule des jeweiligen Diagramms stellt die gesamten transgenen Mäuse (TG) dar, die fünfte die männlichen TG (m TG) und die sechste die weiblichen (w TG).

In a) wird das Körpergewicht in Gramm (g), in b) das Herzgewicht in Milligramm (mg), in c) das relative Herzgewicht in Prozent des Körpergewichts (%), in d) das Restherzgewicht in Milligramm (mg), in e) das relative Restherzgewicht in Prozent des Körpergewichts (%) und in f) das Alter in Tagen dargestellt. Die Säulen in g) zeigen die Kraft der linken Vorhöfe in Ruhelage in Millinewton (mN), in h) und i) die durchschnittliche Anspannungs- und Erschlaffungszeit der einzelnen Kontraktionen der linken Vorhöfe in Ruhelage in Millisekunden (ms), in j) und k) den durchschnittlichen maximalen Kraftanstieg und -abfall der einzelnen Kontraktionen der linken Vorhöfe in Ruhelage in Millinewton pro Sekunde (mN/s) und in l) die Frequenz der rechten Vorhöfe in Ruhelage in Schlägen pro Minute (bpm).

* $p < 0,05$ vs. WT; § $p < 0,05$ vs. m; & $p < 0,05$ vs. m WT

4.1.3 Kontraktionsversuche

Hinsichtlich der unter den Kontraktionsversuchen aufgetretenen Arrhythmien zeigt Abb. 8 eine tabellarische Übersicht. Dabei ist zu beachten, dass Vorhöfe, die bereits unter basalen Bedingungen Arrhythmien aufwiesen, in der Betrachtung der Arrhythmien unter Substanzzugabe ausgeschlossen wurden. Insgesamt konnten für die hier einzeln aufgeführten Gruppen keine Signifikanzen im Chi-Quadrat-Test festgestellt werden. Lediglich wenn man alle beobachteten Arrhythmien während der MCP KWK aus Versuch 1 zusammenfasst (7 / 22 (LA (WT + TG) + RA (WT + TG))) und selbiges für die Domperidon-KWK in Versuch 2 vollzieht (0 / 23), stellt man einen signifikanten Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen fest. Ein Erklärungsansatz, warum hingegen unter MCP-Gabe in Versuch 3 keine Arrhythmien beobachtet wurden, soll in Kapitel 5.2 gegeben werden.

Versuch 1-3		
Arrhythmien unter:	Basalen Bedingungen	
LA		
WT	0 / 22	
TG	5 / 37	
RA		
WT	3 / 22	
TG	5 / 37	

Versuch 1			
Arrhythmien unter:	MCP KWK	5-HT KWK	Iso 1 µM
LA			
WT	2 / 6	0 / 6	0 / 6
TG	2 / 6	1 / 6	0 / 6
RA			
WT	1 / 5	1 / 5	0 / 5
TG	2 / 5	2 / 5	2 / 5

Versuch 2			
Arrhythmien unter:	Dom KWK	5-HT KWK	Iso 1 µM
LA			
WT	0 / 6	0 / 6	0 / 6
TG	0 / 6	1 / 6	0 / 6
RA			
WT	0 / 5	0 / 5	2 / 5
TG	0 / 6	3 / 6	3 / 6

Versuch 3					
3a)					
Arrhythmien unter:		5-HT KWK	Nach Auswaschen	5-HT KWK	Iso 1 µM
LA					
-					
TG		1 / 6	0 / 6	2 / 6	1 / 6
RA					
-					
TG		3 / 7	2 / 7	3 / 7	1 / 7

3b)					
Arrhythmien unter:	MCP 0,3 µM	5-HT KWK	Nach Auswaschen	5-HT KWK	Iso 1 µM
LA					
WT	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
TG	0 / 4	1 / 4	0 / 4	0 / 4	1 / 4
RA					
WT	0 / 4	1 / 4	0 / 4	0 / 4	1 / 4
TG	0 / 5	3 / 5	0 / 5	3 / 5	2 / 5

3c)					
Arrhythmien unter:	MCP 1 µM	5-HT KWK	Nach Auswaschen	5-HT KWK	Iso 1 µM
LA					
WT	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
TG	0 / 7	0 / 7	0 / 7	0 / 7	0 / 7
RA					
WT	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
TG	0 / 7	3 / 7	0 / 7	2 / 7	2 / 7

Abb. 8: Tabellarische Übersicht über die aufgetretenen Arrhythmien in den verschiedenen Versuchen

Die Zahl vor dem Schrägstrich steht für die Anzahl der Vorhöfe an denen Arrhythmien beobachtet wurden und die Zahl hinter dem Schrägstrich für die Anzahl der beobachteten Vorhöfe in der jeweiligen Gruppe. Die Vorhöfe, an denen schon unter basalen Bedingungen Arrhythmien beobachtet wurden, wurden aus der nachfolgenden Betrachtung ausgeschlossen. Dom, Domperidon – Iso, Isoprenalin – KWK, Konzentrations-Wirkungs-Kurve – LA, linkes Atrium – MCP, Metoclopramid – RA, rechtes Atrium – TG, transgen – WT, wildtyp – 5-HT, Serotonin

Experimente zu den Eigeneffekten von Metoclopramid und Domperidon

Versuch 1: Auf die Zugabe von MCP haben WT Mäuse nicht reagiert (s. Abb. 9b), 10b), 11b)).

Bei den transgenen Versuchstieren zeigte sich allerdings ab einer Konzentration von 1 μM MCP sowohl gegenüber der Ausgangslage ($p < 0,05$) als auch gegenüber den WT Tieren ($p < 0,05$) ein Kraftanstieg (s. Abb. 12). Dieser positiv inotrope Effekt (PIE) erreichte bei 10 μM MCP sein Maximum, bei dem die linken Vorhöfe mit $7,7 \pm 0,7$ mN die ungefähr doppelte Kraft (207 ± 10 %) gegenüber der Ausgangslage entwickelten. Durch die anschließend zusätzliche Hinzugabe von Serotonin ließ sich die relative Kraft dieser Atrien, nach Zugabe auf 0,3 μM Serotonin im Organbad, auf $9,4 \pm 0,7$ mN weiter steigern ($p < 0,05$) (s. Abb. 12b)). Bei den Wildtypmäusen zeigte sich wiederum keine Kraftzunahme bzw. -abnahme, die über die zeitliche Erschlaffung der Präparate hinausging. Nach der abschließenden Gabe von 1 μM Isoprenalin lag die Kraft der TG Vorhöfe bei $10,6 \pm 0,7$ mN und unterschied sich somit unwesentlich von den WT Vorhöfen ($10,6 \pm 1,1$ mN). Der maximale PIE von MCP an TG Mäusen, und damit die Effektivität dieser Substanz, entsprach 81 ± 2 % des in diesem Versuch erreichten, maximal serotonergen und 72 ± 3 % des maximal β -adrenergen Effekts. Die Potenz, ausgedrückt als negativer Logarithmus des EC_{50} -Wertes (pEC_{50}), betrug bei MCP in Bezug auf den PIE $6,0 \pm 0,1$. Ein Vergleich der EC_{50} -Werte aller Versuchsreihen ist in Abb. 19 dargestellt. Die Anspannungszeit (T1) der linken TG Atrien verkürzte sich unter Metoclopramid-Gabe signifikant gegenüber des Ausgangswertes ($15,1 \pm 0,2$ ms) und den WT Atrien ($14,9 \pm 0,2$ ms (MCP 10 μM)) zum gleichen Zeitpunkt auf $13,8 \pm 0,1$ ms bei einer Konzentration von 10 μM MCP im Organbad (s. Abb. 13a)). Nach Gabe von 10 μM Serotonin betrug die T1 durchschnittlich $13,4 \pm 0,1$ ms an den transgenen LAs, während sich bei den Wildtypen ($15,1 \pm 0,2$ ms (Serotonin 10 μM)) weitestgehend keine Veränderung zeigte. Unter Zugabe von 1 μM Isoprenalin fiel auch die T1 der WT Vorhöfe ($p < 0,05$) auf $13,2 \pm 0,1$ ms und glich damit hinreichend genau der Zeit der Transgenen ($13,2 \pm 0,1$ ms) unter den gleichen Bedingungen. In Relation zur Ausgangslage betrachtet, verkürzte sich auch die Erschlaffungszeit (T2) der transgenen Vorhöfe durch MCP 10 μM auf 82 ± 4 % ($27,5 \pm 0,4$ ms) signifikant gegenüber der als

100 % ($33,8 \pm 1,9$ ms) definierten Ausgangslage und den WT Vorhöfen, deren T2 91 ± 1 % ($29,2 \pm 1,0$ ms) ihrer Ausgangslage unter MCP $10 \mu\text{M}$ betrug. Interessanterweise verlängerte sich die Erschlaffungszeit ($p < 0,05$) bei den TG Präparaten unter der daran angeschlossenen Serotonin-KWK von $23,9 \pm 0,4$ ms (Serotonin 30 nM) auf $26,7 \pm 0,2$ ms (Serotonin $3 \mu\text{M}$) (s. Abb. 13b)). Nach Isoprenalingabe betrug die T2 der Wildtyp-Mäuse $29,6 \pm 0,6$ ms und die der Transgenen $27,4 \pm 0,3$ ms. Der maximale Kraftanstieg (max. Anstieg) und der maximale Kraftabfall (max. Abfall) zeigten im Versuchsverlauf ein ähnliches Verhalten wie die Kraft selbst (s. Abb. 14): So zeigte MCP und Serotonin keinen Einfluss an WT LAs. Bei den Transgenen LAs erhöhte MCP ($10 \mu\text{M}$) allerdings den Anstieg und Abfall auf mehr als das in etwa Doppelte (max. Anstieg: 228 ± 12 %; max. Abfall: 218 ± 8 %) des Ausgangswertes (max. Anstieg: 232 ± 25 mN/s; max. Abfall: 128 ± 14 mN/s). Zudem steigerte Serotonin ($3 \mu\text{M}$) diese Werte weiter ($p < 0,05$) und zwar auf das fast Dreifache (max. Anstieg: 288 ± 14 %; max. Abfall: 274 ± 11 %) im Vergleich zu den basalen Bedingungen. Nach Isoprenalingabe stieg der maximale Kraftanstieg der Wildtypen auf 730 ± 73 mN/s sowie der maximale Kraftabfall auf 369 ± 31 mN/s und unterschied sich somit nicht signifikant von den transgenen Vorhöfen zum gleichen Zeitpunkt (max. Anstieg: 733 ± 45 mN/s; max. Abfall: 386 ± 25 mN/s).

Auch die rechten transgenen Vorhöfe zeigten ab einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ MCP eine signifikante Änderung gegenüber der Ausgangslage sowie gegenüber den Wildtypen unter den gleichen Bedingungen, indem ihre Frequenz von 379 ± 18 bpm (Ruhelage) auf 527 ± 23 bpm (MCP $10 \mu\text{M}$) anstieg (s. Abb. 15a)). Hierbei ließ sich dieser positiv chronotrope Effekt (PCE) durch zusätzliche Hinzugabe von Serotonin auf das Eineinhalbfache (150 ± 5 % (Serotonin $10 \mu\text{M}$)) der Ausgangslage weiter steigern ($p < 0,05$) (s. Abb. 15b) (Frequenz der rechten Atrien in Versuch 1 und 2)), wohingegen die WT Vorhöfe auch hierauf keine Veränderung zeigten. Nach Hinzugabe von $1 \mu\text{M}$ Isoprenalin stieg die Frequenz der Wildtypen auf 605 ± 12 bpm an und unterschied sich nicht von den TG Vorhöfen unter den gleichen Bedingungen (597 ± 24 bpm). Dieser maximale PCE von MCP in Versuch 1 entsprach 93 ± 2 % des maximalen positiv chronotropen Effektes durch zusätzliche Hinzugabe von Serotonin und 89 ± 1 % des

durch weitere Hinzugabe von Isoprenalin erreichten Effektes. Der pEC_{50} -Wert von MCP an den rechten TG Vorhöfen betrug $6,1 \pm 0,1$ und unterschied sich damit nur unwesentlich von dem der linken TG Atrien (s. Abb. 19).

Versuch 2: An den linken Vorhöfen zeigte sich unter der Domperidon-KWK keine Veränderung der Kraft, die nicht auch durch die Erschlaffung der Präparate über die Zeit erklärbar wäre (s. Abb. 9c), 9d), 10c), 10d)). So unterschieden sich die transgenen LA Präparate bei dieser KWK auch nicht von den zugehörigen Wildtypen. Jedoch vermochten die Transgenen, ab einer zusätzlichen Zugabe von 10 nM Serotonin, ihre Kraft auf bis zu $11,7 \pm 1,1$ mN (Serotonin 0,3 μ M) gegenüber der Ausgangslage und gegenüber den WT Vorhöfen unter den gleichen Bedingungen signifikant zu steigern (s. Abb. 12). Nach zusätzlicher Gabe von 1 μ M Isoprenalin zeigten sich auch hier keine Unterschiede der Kraft von WT ($10,4 \pm 1,4$ mN) und TG ($11,4 \pm 1,1$ mN) Vorhöfen. Auch im Vergleich zu der Kraftentwicklung der linken Atrien nach Isoprenalingabe aus Versuch 1 lag somit kein signifikanter Unterschied vor. Entsprechend der Kraft zeigte sich an den linken Atrien auch auf die Anspannungs- und Erschlaffungszeit (s. Abb. 13) sowie auf den maximalen Kraftanstieg und -abfall (s. Abb. 14) kein Einfluss von Domperidon an WT und TG Präparaten. T1 und T2 fielen unter der anschließenden Serotonin-KWK in Relation zur Ruhelage bei den TG Vorhöfen (T1: 87 ± 1 %; T2: 77 ± 2 % (Serotonin 10 μ M)) gegenüber den vergleichend herangezogenen Wildtypen (T1: 105 ± 1 %; T2: 88 ± 2 % (Serotonin 10 μ M)) signifikant ab. Unter abschließender Hinzugabe von 1 μ M Isoprenalin glichen sich die Werte zwischen TG (T1: $13,4 \pm 0,1$ ms; T2: $28,0 \pm 0,7$ ms) und WT wieder an (T1: $13,7 \pm 0,2$ ms; T2: $30,9 \pm 1,3$ ms). Nachdem sich eine Konzentration von 0,3 μ M Serotonin im Organbad befand, betrug der maximale Kraftanstieg und -abfall von TGs das ungefähr Dreifache (max. Anstieg: 306 ± 32 %; max. Abfall: 292 ± 22 %) der Ausgangslage. Nach Isoprenalingabe bestand zwischen WT (max. Anstieg: 703 ± 95 mN/s (271 ± 22 %); max. Abfall: 355 ± 43 mN/s (262 ± 17 %)) und TG (max. Anstieg: 767 ± 72 mN/s (300 ± 31 %); max. Abfall: 414 ± 39 mN/s (288 ± 22 %)) Vorhöfen kein signifikanter Unterschied.

Die Frequenz der rechten Atrien fiel im Verlauf der Domperidon-KWK gegenüber den basalen Bedingungen zu Versuchsbeginn (TG: 424 ± 13 bpm; WT: 385 ± 10 bpm)

sowohl bei den TG als auch bei den WT Vorhöfen signifikant ab (s. Abb. 15). So wiesen die TG Atrien unter Einfluss von 10 μM Domperidon nur noch $79 \pm 2 \%$ (333 ± 12 bpm) der Frequenz in Ruhelage auf und die WT Atrien $80 \pm 2 \%$ (309 ± 10 bpm) zum gleichen Zeitpunkt. Diese vergleichsweise starke Frequenzabnahme sowie ihr nicht linearer Verlauf weisen darauf hin, dass sich diese Änderung nicht nur durch die Ermüdung der Präparate erklären lässt, sondern wohl auch durch die Substanzzugabe von Domperidon bedingt wurde. Unter Zugabe von Serotonin stieg ab 10 nM Serotonin die Frequenz der TG Präparate gegenüber der Frequenz bei 10 μM Domperidon auf bis zu 486 ± 16 bpm (1 μM Serotonin) an ($p < 0,05$), wohingegen die Frequenz der Wildtypen weiter bis 256 ± 10 bpm ($67 \pm 3 \%$ der Ausgangslage) bei 10 μM Serotonin abfiel. Nach Hinzugabe von 1 μM Isoprenalin steigt die Frequenz der WT Vorhöfe rapide auf 532 bpm ± 15 bpm ($139 \pm 6 \%$ der Ausgangslage), liegt damit aber signifikant unter der Frequenz der WT Präparate aus Versuch 1 zu diesem Zeitpunkt (s. Abb. 15). Auch die Frequenz der transgenen Vorhöfe bleibt nach Isoprenalingabe von 1 μM mit 493 bpm ± 13 bpm ($119 \pm 5 \%$ der Ausgangslage) unter der Frequenz der transgenen RAs aus Versuch 1 zu diesem Zeitpunkt ($p < 0,05$).

Abbildungen

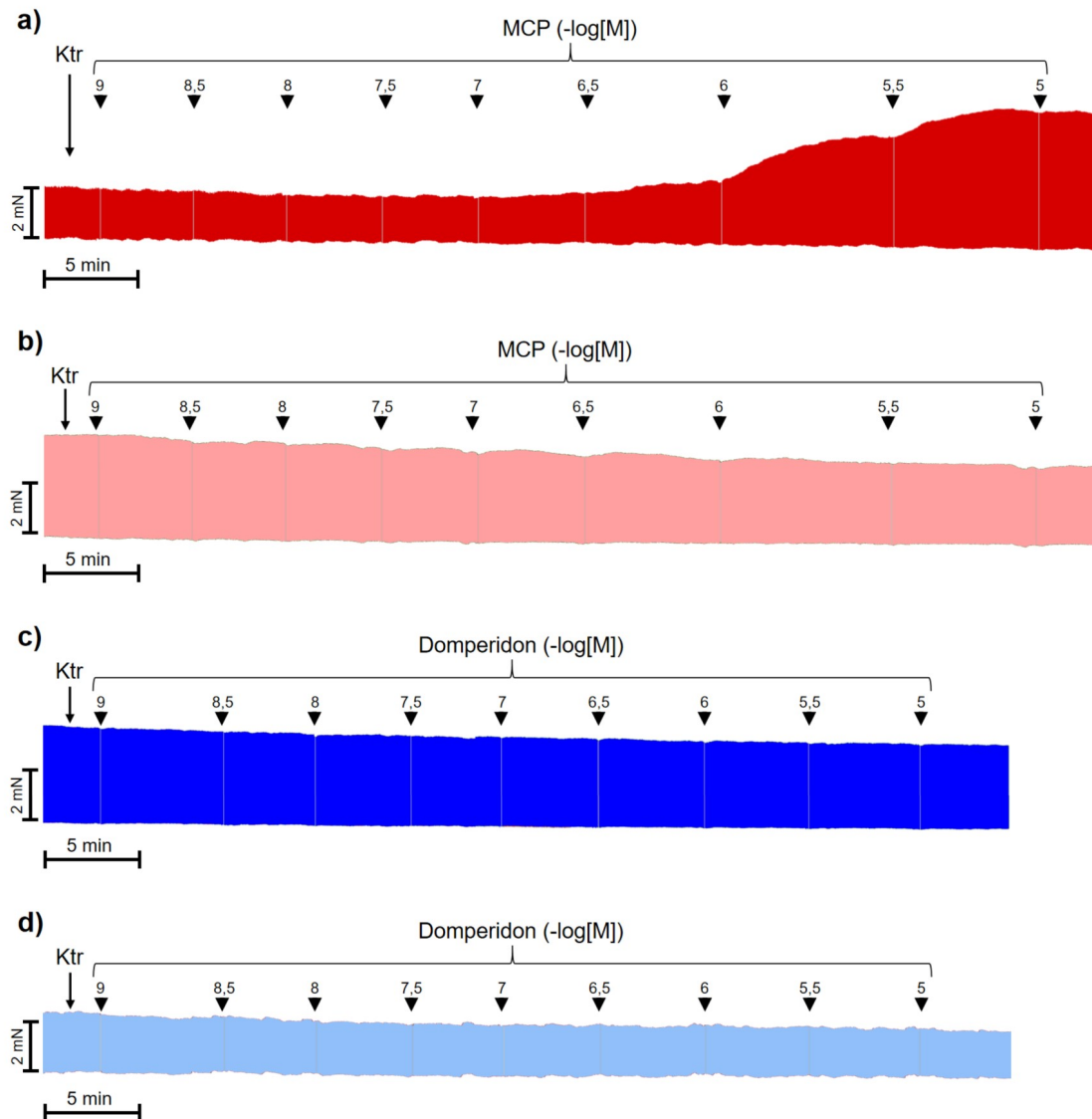


Abb. 9: Ausschnitte aus den Originalmechanogrammen linker Atrien

Die Ausschnitte zeigen Mechanogramme von Konzentrations-Wirkungs-Kurven an linken Mäuseatrien. Über den Mechanogrammen ist die aktuelle Substanzkonzentration im Organbad markiert. In x-Richtung ist die Zeit aufgetragen, in y-Richtung die Kraft. a) zeigt eine MCP-KWK an einem TG LA und b) an einem WT LA. In c) ist eine Domperidon-KWK an einem TG LA zu sehen und in d) an einem WT LA.

$-\log[M]$, negativer Logarithmus der Substanzkonzentration M im Organbad – Ktr, Kontrollzeitpunkt (Ruhelage) – KWK, Konzentrations-Wirkungs-Kurve – LA, linkes Atrium – MCP, Metoclopramid – min, Minuten – mN, Millinewton – TG, transgen – WT, wildtyp

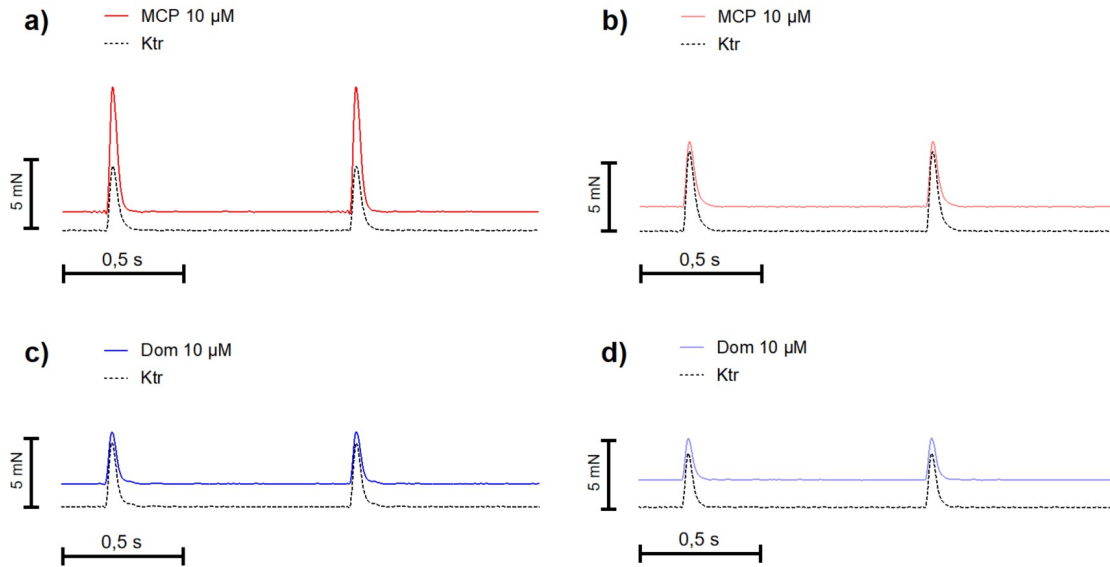


Abb. 10: Beispielhafte Kontraktionen linker Atrien

Die Ausschnitte zeigen beispielhaft einzelne Kontraktionen linker Atrien, die mit 1 Hz elektrisch stimuliert wurden, in Ruhelage (schwarz) und zum Zeitpunkt der jeweils maximalen Substanzkonzentration im Organbad (farbig). In x-Richtung ist die Zeit aufgetragen und in y-Richtung die Kraft. In a) wurde MCP einem TG LA zugegeben und in b) einem WT LA. In c) wurde Domperidon einem TG LA zugegeben und in d) einem WT LA.

Dom, Domperidon – Ktr, Kontrollzeitpunkt (Ruhelage) – LA, linkes Atrium – MCP, Metoclopramid – mN, Millinewton – s, Sekunden – TG, transgen – WT, wildtyp – μM , Mikromolar

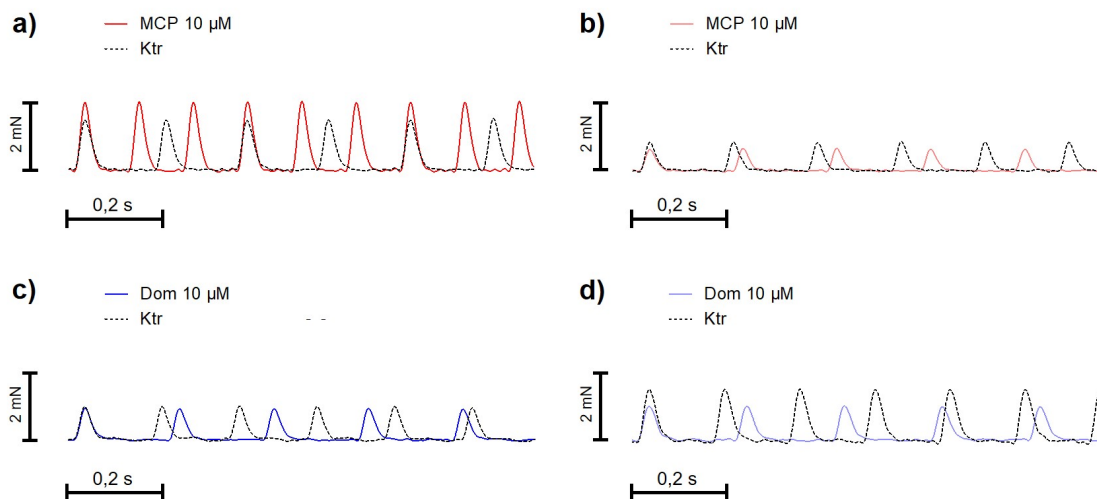


Abb. 11: Beispielhafte Kontraktionen rechter Atrien

Die Ausschnitte zeigen beispielhaft einzelne Kontraktionen spontan schlagender rechter Atrien in Ruhelage (schwarz) und zum Zeitpunkt der jeweils maximalen Substanzkonzentration im Organbad (farbig). In x-Richtung ist die Zeit aufgetragen und in y-Richtung die Kraft. In a) wurde MCP einem TG RA zugegeben und in b) einem WT RA. In c) wurde Domperidon einem TG RA

zugegeben und in d) einem WT RA.

Dom, Domperidon – Ktr, Kontrollzeitpunkt (Ruhelage) – MCP, Metoclopramid – mN, Millinewton – RA, rechtes Atrium – s, Sekunden – TG, transgen – WT, wildtyp – μM , Mikromolar

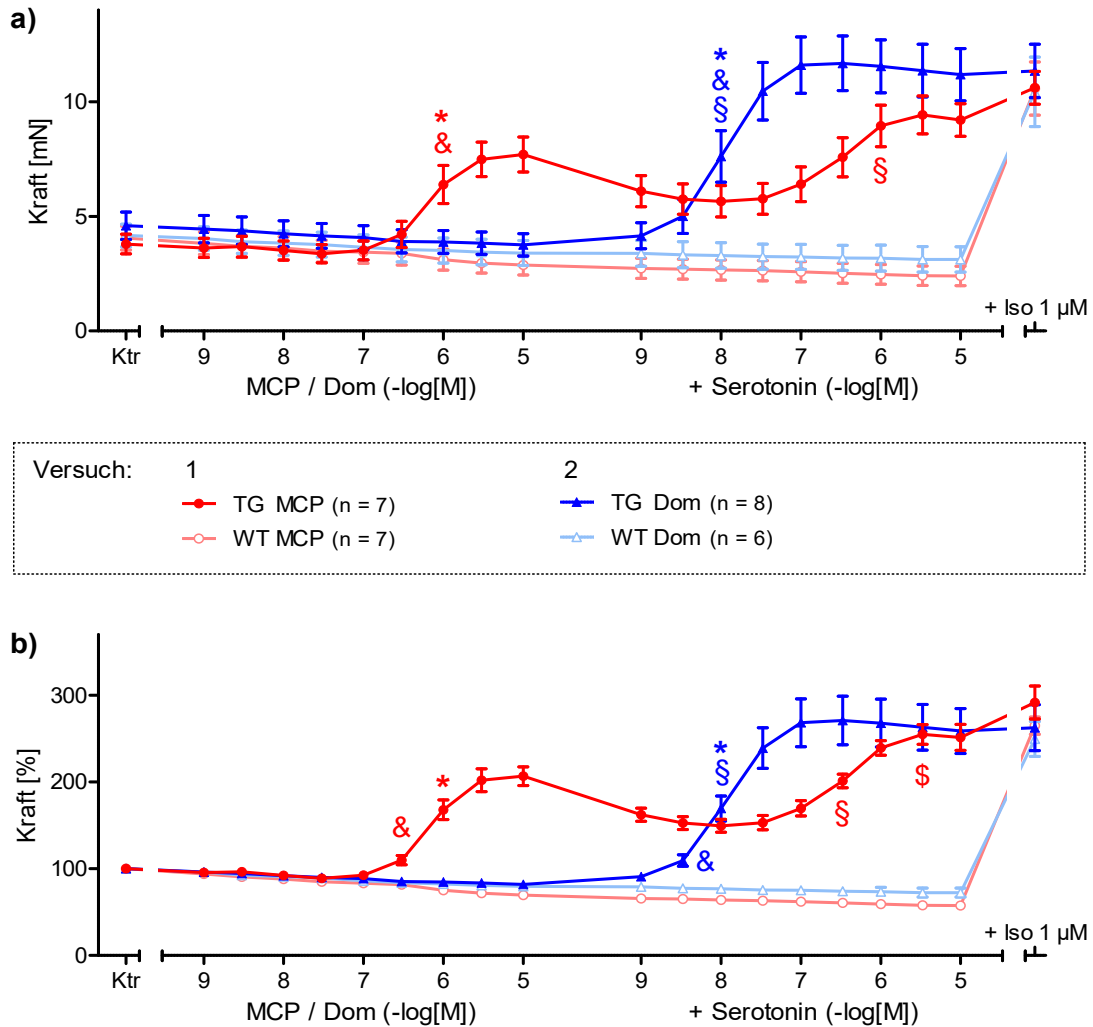


Abb. 12: Kraft der linken Atrien in Versuch 1 und 2

Auf der x-Achse ist die Substanzkonzentration im Organbad aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Kraft der linken Atrien als Mittelwert mit Standardfehler in Millinewton (mN) (a)) bzw. in Prozent (%) der Kraft in Ruhelage (Ktr) (b)) aufgetragen.

* erstes $p < 0,05$ vs. Ktr – & erstes $p < 0,05$ vs. WT – § erstes $p < 0,05$ vs. Serotonin 1 nM – $\$ p < 0,05$ vs. MCP 10 μM

-log[M], negativer Logarithmus der Substanzkonzentration M im Organbad – Dom, Domperidon – Iso, Isoprenalin – Ktr, Kontrollzeitpunkt (Ruhelage) – MCP, Metoclopramid – mN, Millinewton – n, Anzahl der Einzelversuche – nM, Nanomolar – TG, transgen – WT, wildtyp – μM , Mikromolar

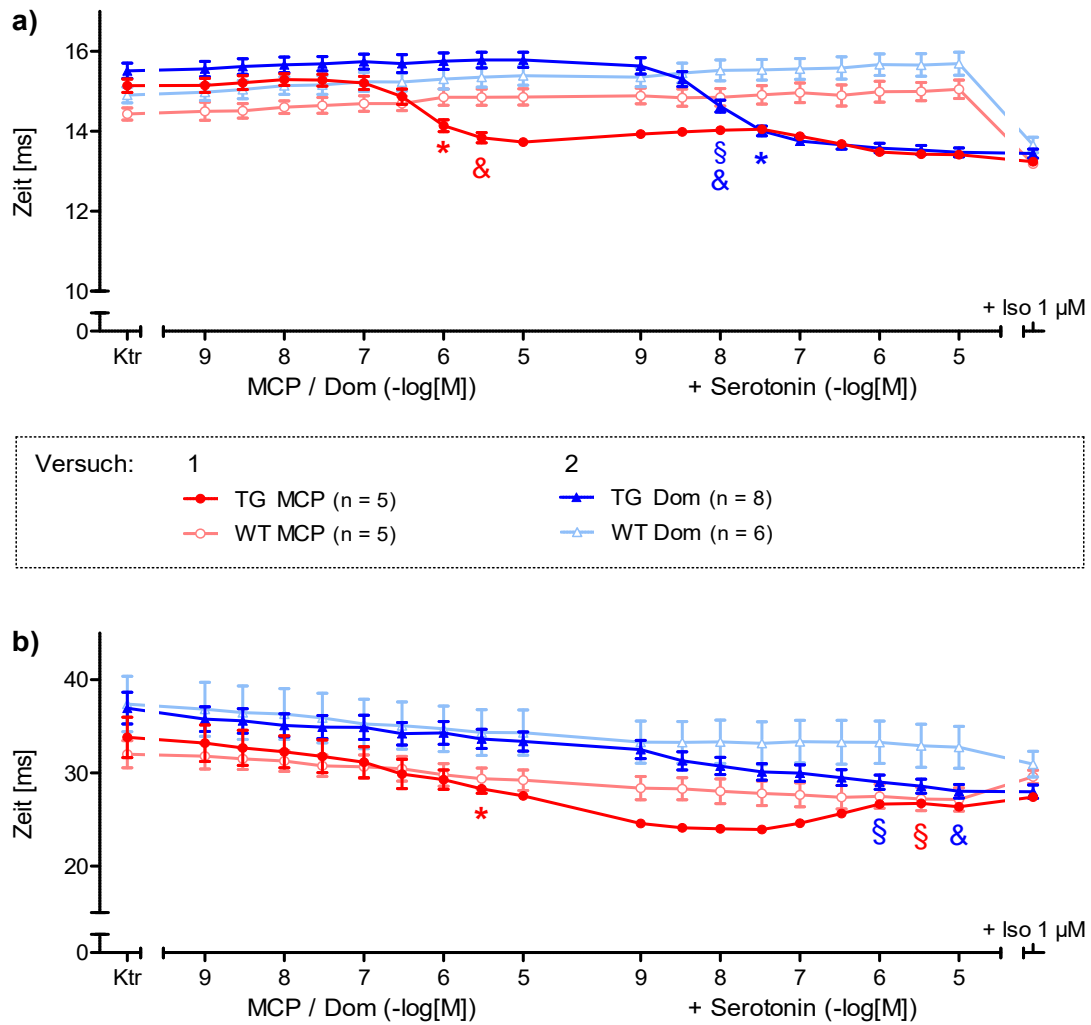


Abb. 13: Anspannungs- und Erschlaffungszeit der linken Atrien in Versuch 1 und 2

Auf der x-Achse ist die Substanzkonzentration im Organbad aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Anspannungs- (a) und Erschlaffungszeit (b) der einzelnen Kontraktionen der linken Atrien als Mittelwert mit Standardfehler in Millisekunden (ms) aufgetragen.

* erstes $p < 0,05$ vs. Ktr – & erstes $p < 0,05$ vs. WT – § erstes $p < 0,05$ vs. Serotonin 1 nM -log[M], negativer Logarithmus der Substanzkonzentration M im Organbad – Dom, Domperidon – Iso, Isoprenaline – Ktr, Kontrollzeitpunkt (Ruhelage) – MCP, Metoclopramid – ms, Millisekunden – n, Anzahl der Einzelversuche – nM, Nanomolar – TG, transgen – WT, wildtyp – μ M, Mikromolar

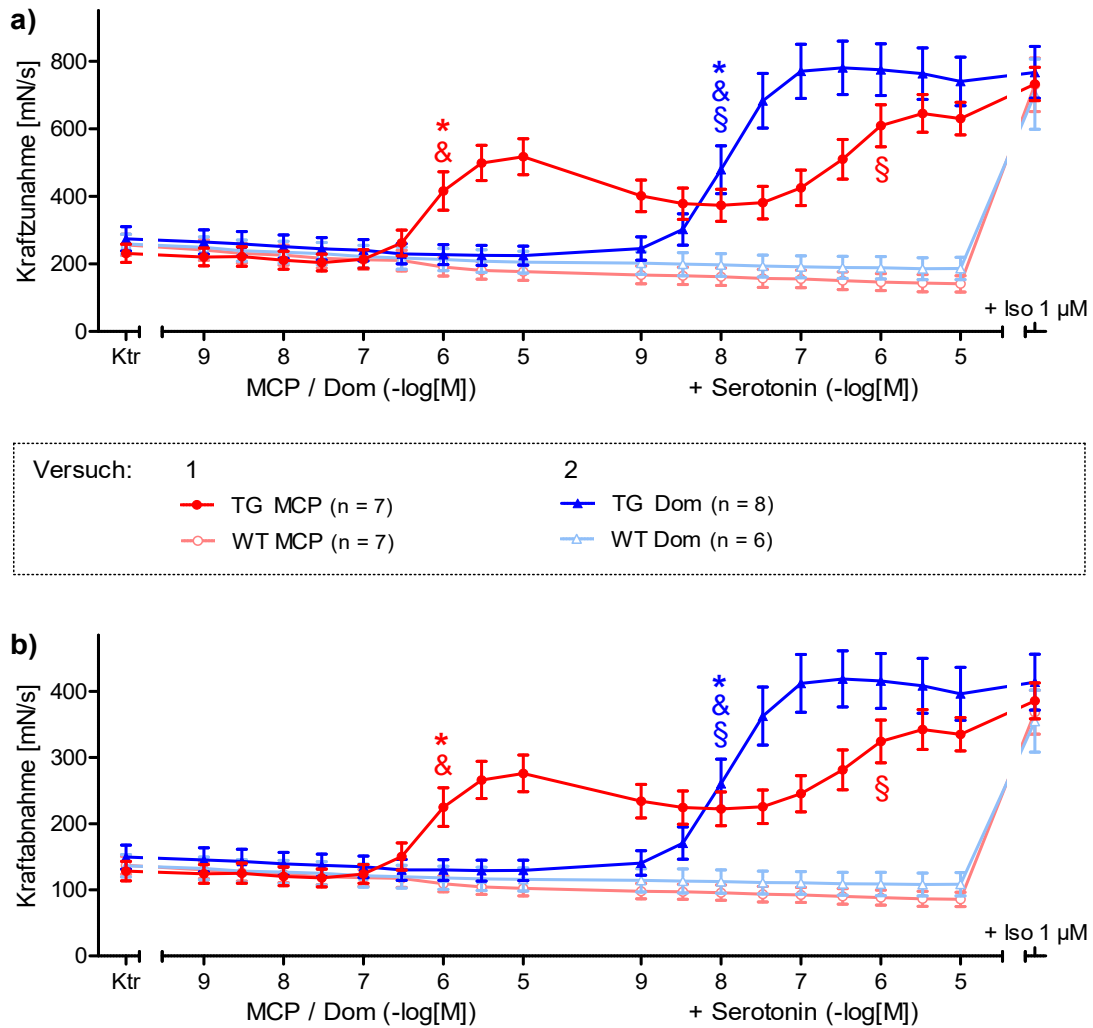


Abb. 14: Maximaler Kraftanstieg und -abfall der linken Atrien in Versuch 1 und 2

Auf der x-Achse ist die Substanzkonzentration im Organbad aufgetragen. Auf der y-Achse ist der maximale Kraftanstieg (a)) und -abfall (b)) der einzelnen Kontraktionen der linken Atrien als Mittelwert mit Standardfehler der Kraftzunahme bzw. Kraftabnahme in Millinewton pro Sekunde (mN/s) aufgetragen.

* erstes $p < 0,05$ vs. Ktr – & erstes $p < 0,05$ vs. WT – § erstes $p < 0,05$ vs. Serotonin 1 nM
 -log[M], negativer Logarithmus der Substanzkonzentration M im Organbad – Dom, Domperidon
 – Iso, Isoprenalin – Ktr, Kontrollzeitpunkt (Ruhelage) – MCP, Metoclopramid – mN, Millinewton –
 n, Anzahl der Einzelversuche – nM, Nanomolar – s, Sekunde – TG, transgen – WT, wildtyp – µM,
 Mikromolar

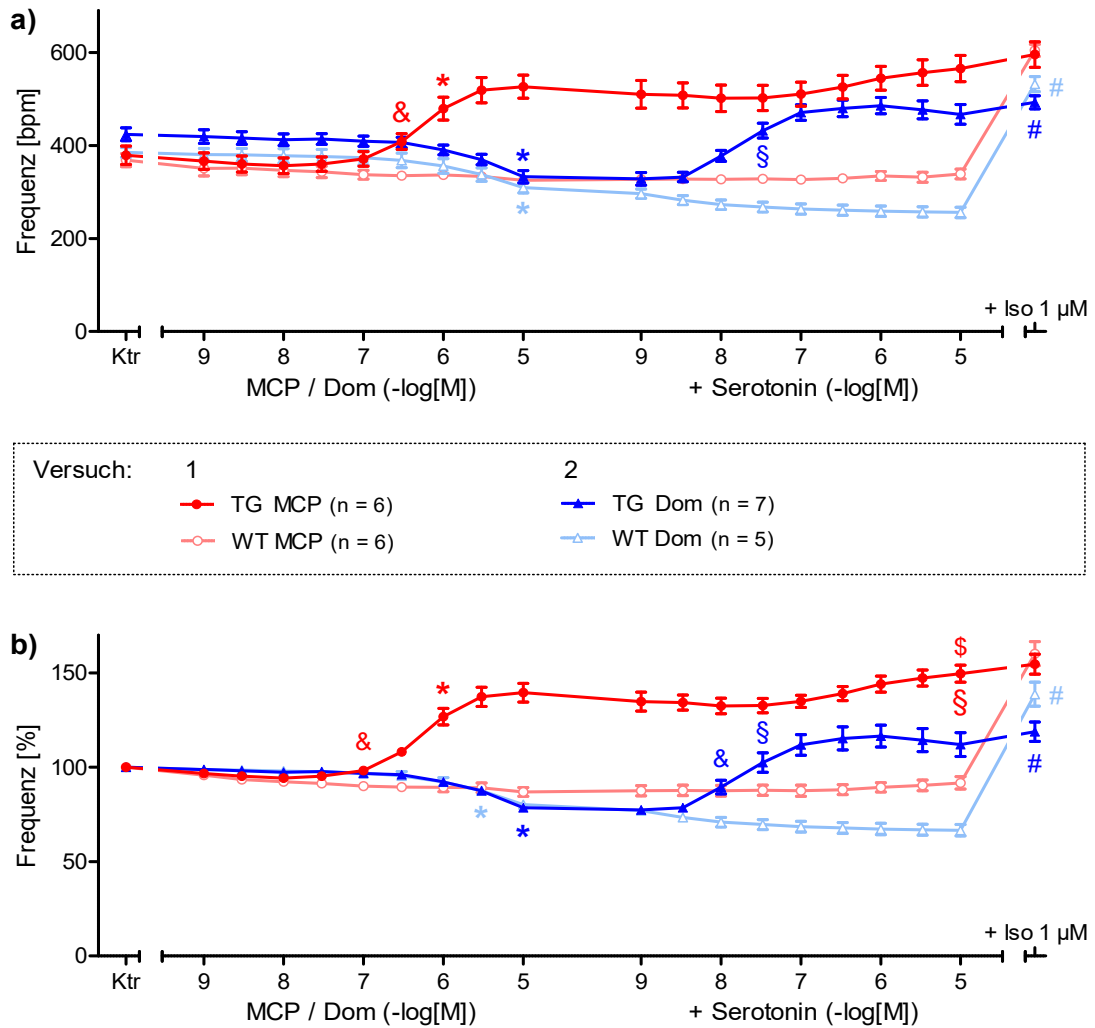


Abb. 15: Frequenz der rechten Atrien in Versuch 1 und 2

Auf der x-Achse ist die Substanzkonzentration im Organbad aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Frequenz der rechten Atrien als Mittelwert mit Standardfehler in Schlägen pro Minute (bpm) (a) bzw. in Prozent (%) der Frequenz in Ruhelage (Ktr) (b) aufgetragen.

* erstes $p < 0,05$ vs. Ktr – & erstes $p < 0,05$ vs. WT – § erstes $p < 0,05$ vs. Serotonin 1 nM – $\$ p < 0,05$ vs. MCP 10 μ M – # $p < 0,05$ vs. MCP (Iso 1 μ M)

-log[M], negativer Logarithmus der Substanzkonzentration M im Organbad – bpm, Schläge (beats) pro Minute – Dom, Domperidon – Iso, Isoprenalin – Ktr, Kontrollzeitpunkt (Ruhelage) – MCP, Metoclopramid – n, Anzahl der Einzelversuche – nM, Nanomolar – TG, transgen – WT, wildtyp – μ M, Mikromolar

Experimente zu den antagonistischen Eigenschaften von Metoclopramid

Nachdem in Versuch 1 gezeigt werden konnte, dass MCP agonistische Eigenschaften am humanen 5-HT_{4a}-Rezeptor besitzt, im Vergleich zu Serotonin aber nur einen submaximalen Effekt zu vermitteln vermag, wurde die Vermutung aufgestellt, dass es sich bei MCP um einen Partialagonisten an diesem Rezeptor handelt. Um die Wirkung von MCP besser charakterisieren zu können, stellte sich die Frage, inwieweit diese Substanz auch antagonistische Eigenschaften am 5-HT_{4a}-Rezeptor vermittelt.

Versuch 3: Die Kraft der linken Atrien zu Versuchsbeginn unterschied sich zwischen keiner der fünf Versuchsgruppen signifikant zueinander (s. Abb. 16a)): So betrug die Kraft der linken TG Vorhöfe in Ruhelage aus Versuchsreihe 3a) durchschnittlich $6,2 \pm 0,7$ mN, die aus 3b) $6,0 \pm 1,1$ mN und die aus 3c) $5,2 \pm 0,9$ mN. Die LAs der Wildtypen aus Versuchsreihe 3b) kontrahierten unter diesen Bedingungen im Mittel mit $4,8 \pm 1,0$ mN und die aus 3c) mit $5,8 \pm 0,5$ mN. Wiederum zeigten sich unter Hinzugabe von sowohl MCP als auch Serotonin in Versuch 3 keinerlei messbare Reaktionen von WT Vorhöfen auf diese Substanzen. Nach abschließender Hinzugabe von $1 \mu\text{M}$ Isoprenalin in alle Organbäder, zeigte sich zwischen den fünf Versuchsgruppen wiederum kein signifikanter Kraftunterschied der linken Atrien: Die TGs aus 3a) kontrahierten mit $11,3 \pm 1,0$ mN, die aus 3b) mit $10,8 \pm 1,9$ mN und die aus 3c) mit $11,1 \pm 0,7$ mN. Bei den Wildtypen ergaben sich zu diesem Zeitpunkt des Versuches Werte von $7,9 \pm 2,5$ mN in Versuchsreihe 3b) und $9,8 \pm 0,9$ mN in 3c) für die gemittelte Kontraktionskraft.

Im folgenden Abschnitt wird sich daher nur mit den linken transgenen Atrien dieser drei Versuchsreihen befasst. Der PIE von $0,3 \mu\text{M}$ MCP in Versuchsreihe 3b) entsprach 150 ± 14 % der Ausgangslage und lag bei dieser Konzentration in der MCP-KWK über dem in Versuch 1 festgestellten Wert (110 ± 5 %) ($p < 0,05$). Der festgestellte Kraftzuwachs auf 195 ± 32 % der Ausgangslage in 3c) nach Gabe von $1 \mu\text{M}$ MCP lag tendenziell auch über dem vergleichbaren Wert (168 ± 10 %) aus der MCP-KWK bei $1 \mu\text{M}$, jedoch war dies kein signifikanter Unterschied. In der direkt daran anschließenden Serotonin-KWK konnten bei entsprechenden Konzentrationen in allen drei Versuchsreihen ein signifikanter Kraftzuwachs gegenüber der MCP-Gabe (3b),3c)), bzw. der Ausgangslage (3a)) erreicht werden (s. Abb. 16a)). Der maximale positiv inotrope Effekt in dieser

Konzentrations-Wirkungs-Kurve mit Serotonin wurde in Versuchsreihe 3a) bei einer Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ mit einer Kraft von $13,5 \pm 0,8 \text{ mN}$, in 3b) bei $0,3 \mu\text{M}$ mit einer Kraft von $13,7 \pm 1,0 \text{ mN}$ und in 3c) bei $1 \mu\text{M}$ Serotonin mit einer Kraft von $11,3 \pm 0,7 \text{ mN}$ erreicht. Der in 3.6.1 näher beschriebene negative Logarithmus des EC_{50} -Wertes von Serotonin betrug für die in 3a) ohne vorherige Gabe von MCP durchgeführten KWKs im Mittel $8,6 \pm 0,1$, für die in 3b) nach Hinzugabe von $0,3 \mu\text{M}$ MCP durchgeführten KWKs $8,4 \pm 0,2$ und für die in 3c) nach Hinzugabe von $1 \mu\text{M}$ MCP durchgeführten KWKs $8,0 \pm 0,3$ (s. Abb. 18a)). Der pEC_{50} -Wert Serotonins für die zuerst durchgeführte Serotonin-KWK in Versuchsreihe 3a) unterschied sich somit von dem aus 3c) ($p < 0,05$). Nach Auswaschen dieser Konzentrationen aus den Organbädern erreichte die durchschnittliche Kraft aller TGs $99 \pm 9 \%$ ($5,5 \pm 0,2 \text{ mN}$) der Ausgangslage, wobei zwischen den drei Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede bestanden (s. Abb. 16b)). In der anschließend in allen drei Versuchsreihen gleich durchgeführten zweiten Serotonin-KWK zeigten sich zwischen den drei Reihen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Kontraktionskraft: So erreichte der PIE von Serotonin bei einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ sein Maximum mit einer Kraft von $11,3 \pm 1,0 \text{ mN}$ in 3a), $11,7 \pm 1,1 \text{ mN}$ in 3b) und $10,6 \pm 0,6 \text{ mN}$ in 3c). Die pEC_{50} -Werte von Serotonin bei den zweiten KWKs betrugen $8,0 \pm 0,1$ (3a)), $7,6 \pm 0,1$ (3b)) und $7,7 \pm 0,1$ (3c)). Damit unterschieden sich die negativen Logarithmen der EC_{50} -Werte der zweiten KWKs aus Versuchsreihe 3a) und 3b) voneinander ($p < 0,05$). Signifikante Unterschiede zeigte auch der Vergleich zwischen den pEC_{50} -Werten Serotonins der ersten und zweiten KWKs (s. Abb. 18a)): So war dieser Wert sowohl in Versuchsreihe 3a) als auch 3b) bei der zweiten KWK kleiner als bei der ersten ($p < 0,05$). Auch bei der zweiten KWK in Versuchsreihe 3c) war der pEC_{50} signifikant kleiner als bei der Ersten in 3a). Wenn man sich zudem vor Augen führt, dass die ersten KWK in Versuchsreihe 3a) eine Serotonin-KWK an linken transgenen Atrien ist, denen vorher keine anderweitige Substanz zugeführt wurde, liegt ein Vergleich mit dem EC_{50} -Wert von MCP aus Versuch 1 nahe (s. Abb. 19). Somit drücken diese Werte aus, dass Serotonin wesentlich potenter als MCP ist (pEC_{50} Serotonin: $8,6 \pm 0,1$ vs. pEC_{50} MCP: $6,0 \pm 0,1$).

Die Frequenz der rechten Atrien unterschied sich zu Versuchsbeginn zwischen den

beiden WT-Gruppen nicht signifikant, lag aber in den drei TG-Gruppen tendenziell etwas höher, wie auch schon in 4.1.2 über alle Versuche beobachtet. So betrug die Frequenz der sieben auswertbaren WT RAs aus Versuchsreihe 3b) und 3c) im Mittel 413 ± 23 bpm in Ruhelage. Die 20 ausgewerteten transgenen rechten Vorhöfe aus Versuch 3 kontrahierten zu diesem Versuchszeitpunkt mit durchschnittlich 424 ± 10 bpm. Nach MCP-Gabe von $0,3 \mu\text{M}$ bzw. $1 \mu\text{M}$ wiesen die sieben rechten Vorhofpräparate der WT Mäuse eine Frequenz von 100 ± 2 % des Ausgangswertes auf (s. Abb. 17b)). Die fünf transgenen RAs aus Versuchsreihe 3b) reagierten auf die Gabe von $0,3 \mu\text{M}$ MCP mit einem Frequenzanstieg auf 112 ± 2 % der Ruhelage und die sechs transgenen RAs aus Versuchsreihe 3c) reagierten auf die Gabe von $1 \mu\text{M}$ MCP mit einem Frequenzanstieg auf 120 ± 3 % der Ruhelage. Bei den zwei nachfolgenden Serotonin-KWKs konnte jedoch keine kausal dadurch in Verbindung stehende Reaktion der WT Präparate festgestellt werden. Nachdem dem Organbad abschließend Isoprenalin zugegeben wurde, kontrahierten die rechten Vorhöfe der WT Versuchstiere mit einer Frequenz von 635 ± 13 bpm und unterschieden sich somit nicht signifikant von den Transgenen zum vergleichbaren Zeitpunkt (615 ± 12 bpm). Untereinander unterschieden sich die rechten TG Präparate der drei Versuchsreihen nach Isoprenalingabe hinsichtlich ihrer Frequenz ebenfalls nicht signifikant (3a): 600 ± 23 bpm; 3b): 620 ± 29 bpm; 3c): 626 ± 12 bpm). Aufgrund der fehlenden Effekte auf Wildtypen beziehen sich die in diesem Absatz folgenden Betrachtungen der Serotonin-KWKs lediglich auf die transgenen rechten Vorhöfe. Bei der ersten Serotonin-KWK konnte in allen drei Versuchsreihen ein signifikanter Frequenzzuwachs gegenüber der Metoclopramidgabe (3b,c)) bzw. der Ausgangslage (3a)) auf 619 ± 15 bpm in 3a), auf 646 ± 13 bpm in 3b) und auf 621 ± 21 bpm in 3c) bei einer Konzentration von jeweils $10 \mu\text{M}$ Serotonin verzeichnet werden (s. Abb. 17a)). Auch bei der zweiten KWK mit Serotonin an den gleichen Atrien konnte die Frequenz durch $10 \mu\text{M}$ Serotonin signifikant auf durchschnittlich 141 ± 4 % (3a)), 146 ± 11 % (3b)) und 154 ± 4 % (3c)) gegenüber der Schlagrate nach dem Auswaschen gesteigert werden (s. Abb. 17b)). Der $p\text{EC}_{50}$ -Wert der ersten Serotonin-KWK in Versuchsreihe 3b) an rechten Vorhöfen war mit $7,5 \pm 0,1$ größer als der entsprechende $p\text{EC}_{50}$ -Wert der zweiten mit $7,0 \pm 0,1$ ($p <$

0,05) (s. Abb. 18b)). Auch die pEC_{50} -Werte in Versuchsreihe 3c) waren mit $7,2 \pm 0,1$ bei der ersten Serotonin-KWK tendenziell größer als bei der zweiten ($-\log EC_{50}$: $7,0 \pm 0,1$), jedoch nicht signifikant. Selbiges gilt auch für Versuchsreihe 3a). Hier betrug der errechnete pEC_{50} -Wert der ersten KWK $7,8 \pm 0,2$ und der zweiten $7,5 \pm 0,2$. Anhand der EC_{50} -Werte beurteilt, war jedoch die Serotonin-KWK nach Hinzugabe von $1 \mu M$ MCP in 3c) sowie die zweite Serotonin-KWK in 3b) und 3c) signifikant nach rechts verschoben gegenüber der ersten Serotonin-KWK ohne vorherige MCP-Gabe aus 3a). Ebenfalls war die MCP-KWK (pEC_{50} : $6,1 \pm 0,1$) aus Versuch 1 gemessen am EC_{50} -Wert signifikant nach rechts verschoben gegenüber dieser ersten Serotonin-KWK in 3a), was auch an den rechten Atrien für eine geringere Potenz Metoclopramids am humanen $5-HT_{4a}$ -Rezeptors gegenüber Serotonin spricht (s. Abb. 19).

Abbildungen

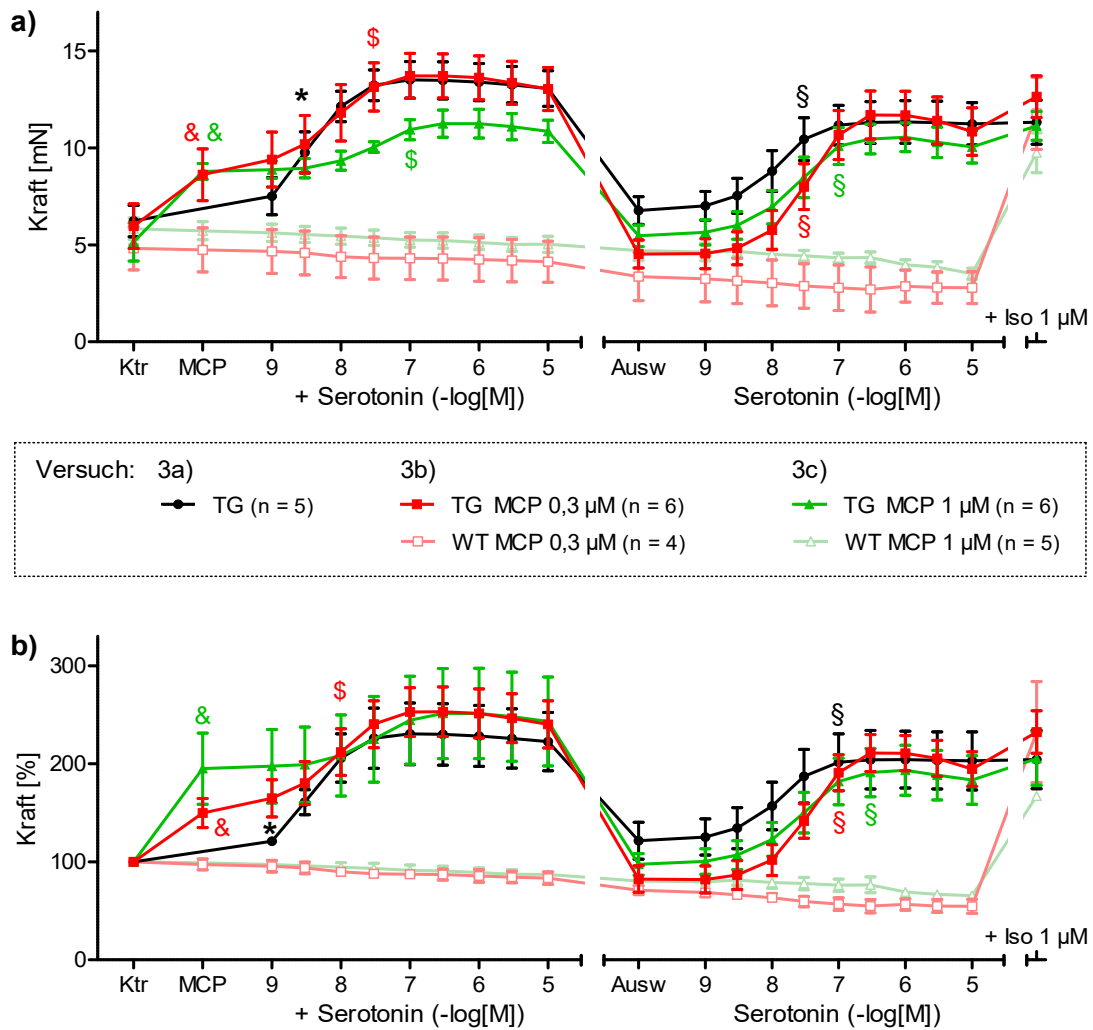


Abb. 16: Kraft der linken Atrien in Versuch 3

Auf der x-Achse ist die Substanzkonzentration im Organbad aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Kraft der linken Atrien als Mittelwert mit Standardfehler in Millinewton (mN) (a) bzw. in Prozent (%) der Kraft in Ruhelage (Ktr) (b) aufgetragen.

& $p < 0,05$ vs. WT – * erstes $p < 0,05$ vs. Ktr – \$ erstes $p < 0,05$ vs. MCP – § erstes $p < 0,05$ vs. Ausw

-log[M], negativer Logarithmus der Substanzkonzentration M im Organbad – Ausw, Zeitpunkt nach dem Auswaschen – Iso, Isoprenalin – Ktr, Kontrollzeitpunkt (Ruhelage) – MCP, Metoclopramid – mN, Millinewton – n, Anzahl der Einzelversuche – TG, transgen – WT, wildtyp – μM, Mikromolar

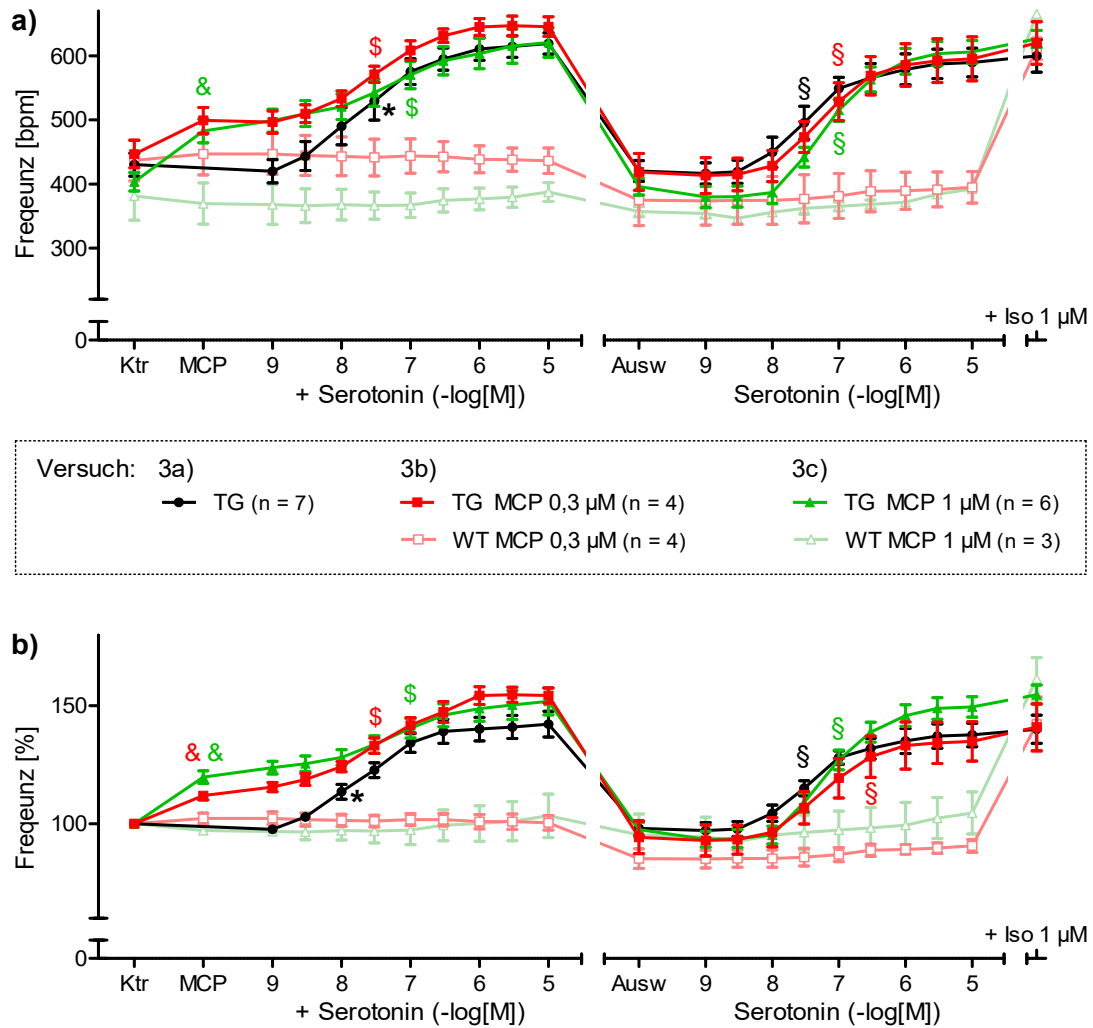


Abb. 17: Frequenz der rechten Atrien in Versuch 3

Auf der x-Achse ist die Substanzkonzentration im Organbad aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Frequenz der rechten Atrien als Mittelwert mit Standardfehler in Schlägen pro Minute (bpm) (a) bzw. in Prozent (%) der Frequenz in Ruhelage (Ktr) (b) aufgetragen.

& $p < 0,05$ vs. WT – * erstes $p < 0,05$ vs. Ktr – \$ erstes $p < 0,05$ vs. MCP – § erstes $p < 0,05$ vs. Ausw

-log[M], negativer Logarithmus der Substanzkonzentration M im Organbad – Ausw, Zeitpunkt nach dem Auswaschen – bpm, Schläge (beats) pro Minute – Iso, Isoprenalin – Ktr, Kontrollzeitpunkt (Ruhelage) – MCP, Metoclopramid – n, Anzahl der Einzelversuche – TG, transgen – WT, wildtyp – μM, Mikromolar

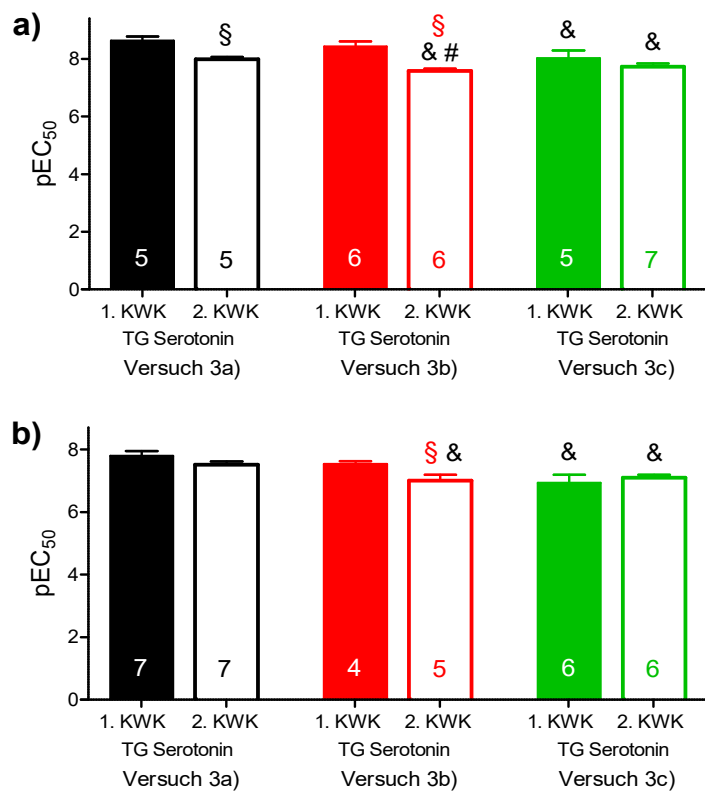


Abb. 18: pEC₅₀-Werte von Serotonin in Versuch 3

Auf der Y-Achse ist der pEC₅₀-Wert von Serotonin aufgetragen. Die Zahl in der Säule entspricht der Anzahl der Einzelversuche. Die Markierung oberhalb der Säule kennzeichnet den Standardfehler des Mittelwerts. In a) sind die für die Kraft der linken Atrien ermittelten pEC₅₀-Werte dargestellt und in b) die für die Frequenz der rechten Atrien.

§ $p < 0,05$ vs. 1. KWK – & $p < 0,05$ vs. 1. KWK in Versuch 3a) – # $p < 0,05$ vs. 2. KWK in Versuch 3a)

pEC₅₀, negativer Logarithmus der mittleren effektiven Konzentration – 1. KWK, erste mit Serotonin durchgeführte Konzentrations-Wirkungs-Kurve in Versuch 3 – 2. KWK, zweite mit Serotonin durchgeführte Konzentrations-Wirkungs-Kurve in Versuch 3 – TG, transgen

Substanz	Kraft		T1		Frequenz	
	pEC ₅₀	n	pEC ₅₀	n	pEC ₅₀	n
MCP (Versuch 1)	6,0 ± 0,1	7	6,1 ± 0,1	7	6,1 ± 0,1	7
5-HT (Versuch 3a))	8,6 ± 0,1 ^{\$}	5	8,1 ± 0,2 ^{\$}	5	7,8 ± 0,2 ^{\$}	7
5-HT (nach MCP KWK) (Versuch 1)	6,5 ± 0,1 ^{&}	7	6,5 ± 0,1 ^{&}	7	6,2 ± 0,2 ^{&}	6
5-HT (nach Dom KWK) (Versuch 2)	8,0 ± 0,1 ^{\$\$*}	8	8,0 ± 0,1 ^{\$\$*}	8	7,7 ± 0,1 ^{\$\$*}	7
5-HT (nach MCP 0,3 µM) (Versuch 3b))	8,4 ± 0,2 ^{\$\$*}	6	-	-	7,5 ± 0,1 ^{\$\$*}	4
5-HT (nach MCP 1 µM) (Versuch 3c))	8,0 ± 0,3 ^{\$\$*}	5	-	-	7,2 ± 0,1 ^{\$\$*}	6
5-HT (2. KWK) (Versuch 3a))	8,0 ± 0,1 ^{\$\$*}	5	-	-	7,5 ± 0,1 ^{\$\$*}	7
5-HT (2. KWK) (Versuch 3b))	7,6 ± 0,1 ^{\$\$**}	6	-	-	7,0 ± 0,2 ^{\$\$**}	5
5-HT (2. KWK) (Versuch 3c))	7,7 ± 0,1 ^{\$\$*}	7	-	-	7,0 ± 0,1 ^{\$\$*}	6

Abb. 19: Tabellarische Übersicht der pEC₅₀-Werte aus allen Versuchen

An den linken Atrien sind die ermittelten pEC₅₀-Werte hinsichtlich der Kraft und Anspannungszeit (T1) der verschiedenen Substanzen in den verschiedenen Versuchen als Mittelwert ± Standardfehler angegeben und für die rechten Atrien die ermittelten pEC₅₀-Werte hinsichtlich der Frequenz.

^{\$} $p < 0.05$ vs. MCP – [&] $p < 0.05$ vs. 5-HT – ^{*} $p < 0.05$ vs. 5-HT (nach MCP KWK) – [§] $p < 0.05$ vs. 5-HT (nach MCP 0,3 µM)

pEC₅₀, negativer Logarithmus der mittleren effektiven Konzentration – Dom, Domperidon – MCP, Metoclopramid – n, Anzahl der Einzelversuche – T1, Anspannungszeit der linken Atrien – 2. KWK, zweite Konzentrations-Wirkungs-Kurve in Versuch 3 – 5-HT, Serotonin

4.1.4 Western-blotting

Die gesuchten Banden von Calsequestrin 2 und dem an Serin 16 phosphoryliertem Phospholamban (P-PLB) zeigten sich jeweils in dem Bereich, der dem Molekulargewicht der jeweiligen Proteine entspricht: So zeigte sich beim Calsequestrinnachweis eine deutliche Bande leicht über der 52 kDa-Bande des Rainbow™-Markers (Molekulargewicht: ca. 55 kDa) und für phosphoryliertes Phospholamban zwischen der 17 kDa- und 24 kDa-Bande des Markers (Molekulargewicht: 5 kDa (Monomer) - 25 kDa (Pentamer)), wie auch in Abb. 20 zu sehen.

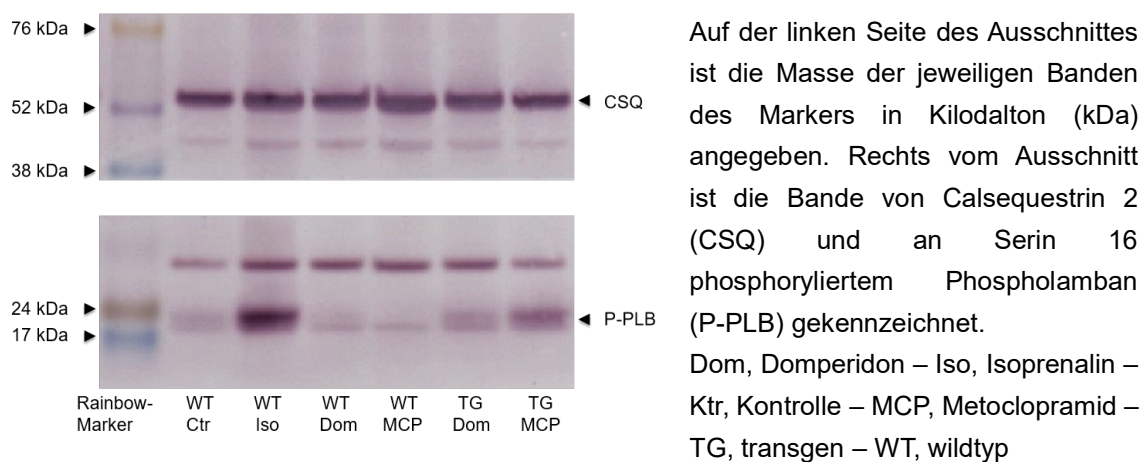


Abb. 20: Beispielhafter Ausschnitt eines Western-blots

Calsequestrin wurde dabei als Ladungskontrolle verwendet, um den Proteingehalt der Probe anzuzeigen, und Phospholamban (PLB) als Zielprotein, das bei gesteigerter PKA-Aktivität phosphoryliert wird und somit einen cAMP-Anstieg in den untersuchten Zellen (z.B. in Folge der Aktivierung von G_s -Protein gekoppelten Rezeptoren) anzuzeigen vermag. Dies bedeutet auf das Experiment übertragen, dass anhand des Quotienten aus dem an Serin 16 phosphorylierten Phospholamban zu Calsequestrin 2, eine durch die jeweils inkubierte Substanz erfolgte Stimulation des 5-HT_{4a}-Rezeptors oder β -Adrenozeptors nachgewiesen werden soll. Dabei konnte Folgendes, wie auch in Abb. 21 zu sehen ist, gezeigt werden, wobei die unterschiedliche Anzahl von Einzelversuchen durch nicht auswertbare Proben, wie z.B. schräges Laufen von

Banden in der Gel-Elektrophorese oder punktuelle Übertragungslücken beim Transfer auf die Membran, erklärbar sind.

Die 10-minütige Inkubation der Ventrikelstücke in 10 μM MCP in Tyrode-Lösung führte bei transgenen Präparaten ($0,40 \pm 0,09$) zu einer signifikanten Steigerung des beschriebenen P-PLB / CSQ-Quotienten gegenüber WT-Präparaten ($0,11 \pm 0,02$) sowie gegenüber transgenen Kontroll-Präparaten ($0,16 \pm 0,04$), die lediglich in Tyrode-Lösung inkubiert wurden. Bei Domperidon zeigte sich kein Unterschied dieses Quotienten zwischen TG ($0,19 \pm 0,05$) und WT ($0,13 \pm 0,03$) Ventrikelstücken oder im Vergleich zu den entsprechenden Präparationen der beschriebenen Kontrollgruppe (TG: $0,16 \pm 0,04$; WT: $0,15 \pm 0,04$). 10 μM Serotonin verhielten sich in diesem Versuch ähnlich wie die gleiche Menge MCP und erhöhten den Quotienten aus phosphoryliertem Phospholamban durch Calsequestrin bei transgenen Mausventrikeln ($0,43 \pm 0,09$) im Vergleich zu den Wildtypen ($0,15 \pm 0,06$) unter gleichen Bedingungen ($p < 0,05$). Nach der Inkubation von 1 μM Isoprenalin betrug der Quotient bei TG Ventrikeln $0,39 \pm 0,06$ und bei WT Ventrikeln $0,43 \pm 0,07$, was einer signifikanten Erhöhung gegenüber den jeweils entsprechenden Kontrollgruppen entsprach.

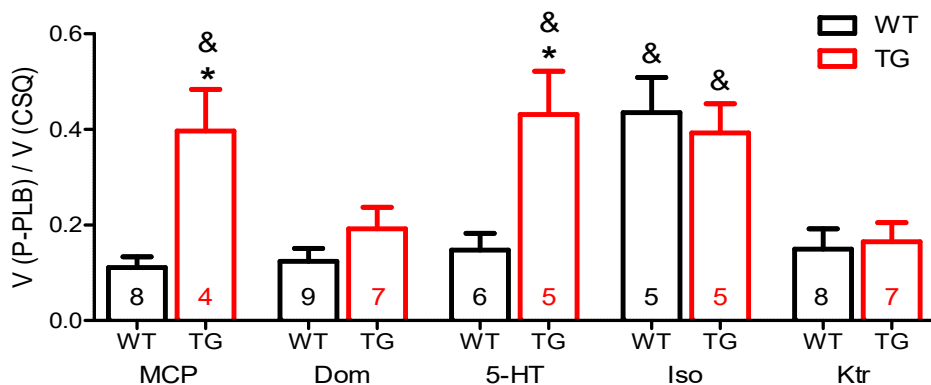


Abb. 21: Die Ergebnisse der Western-Blots als Säulendiagramm

Auf der Y-Achse ist der Quotient aus dem Volumen der P-PLB-Bande durch das Volumen der CSQ-Bande aufgetragen. WT-Präparate sind als rot umrandete, TG-Präparate als schwarz umrandete Säule dargestellt. Die Zahl in der Säule entspricht der Anzahl der Einzelversuche. Die Markierung oberhalb der Säule kennzeichnet den Standardfehler des Mittelwerts.

* $p < 0,05$ vs. WT – & $p < 0,05$ vs. Ktr.

CSQ, Calsequestrin – Dom, Domperidon – Iso, Isoprenalin – Ktr, Kontrolle – MCP, Metoclopramid – P-PLB, an Serin 16 phosphoryliertes Phospholamban – TG, transgen – V, Volumen – WT, wildtyp – 5-HT, Serotonin

4.2 Versuche an menschlichen Vorhofpräparaten

Für die Versuchsreihe an menschlichen rechten Vorhofpräparaten konnten insgesamt drei Patienten und aus diesen wiederum jeweils zwei bzw. drei funktionell vitale Trabekelpräparate gewonnen werden (vgl. 9.5), sodass in insgesamt sieben Einzelversuchen eine MCP-KWK durchgeführt werden konnte.

Hierbei zeigte sich auch an mit 1 Hz elektrisch stimulierten menschlichen Trabekelpräparaten ein positiv inotroper Effekt durch MCP (s. Abb. 22). So konnten nämlich 10 μM MCP die Kraft der Trabekel auf durchschnittlich $133 \pm 5 \%$ ($6,2 \pm 1,6 \text{ mN}$) gegenüber der Ausgangslage ($4,9 \pm 1,6 \text{ mN}$) erhöhen ($p < 0,05$) sowie den maximalen Kraftanstieg ($95 \pm 7 \text{ mN/s}$ (Ktr)) und -abfall ($56 \pm 5 \text{ mN/s}$ (Ktr)) auf $130 \pm 4 \%$ ($122 \pm 8 \text{ mN/s}$) bzw. $122 \pm 4 \%$ ($67 \pm 5 \text{ mN/s}$) steigern (s. Abb. 23a), 23b), 23e), 23f)). Hinsichtlich der Anspannungs- und Erschlaffungszeit der Präparate konnten allerdings keine klaren Effekte erkannt werden (s. Abb. 23c), 23d)). So betrug die Anspannungszeit zum Kontrollzeitpunkt $50,4 \pm 2,1 \text{ ms}$ bzw. unter 10 μM MCP $49,6 \pm 2,1 \text{ ms}$ und die Erschlaffungszeit $113 \pm 5 \text{ ms}$ (Ktr) bzw. $118 \pm 5 \text{ ms}$ (10 μM MCP). Außerdem ließ sich kein EC_{50} -Wert bezüglich der Inotropie bestimmen, weil, bei vermutlich unter 10 μM MCP noch nicht erreichtem maximalen PIE, sich keine sigmoidalen Konzentrations-Wirkungskurven zeigten. Daher ist aber auch davon auszugehen, dass die Potenz von MCP an menschlichen Vorhofpräparaten geringer ist als an transgenen linken Mäuseatrien (vgl. 4.1.3).

Abbildungen

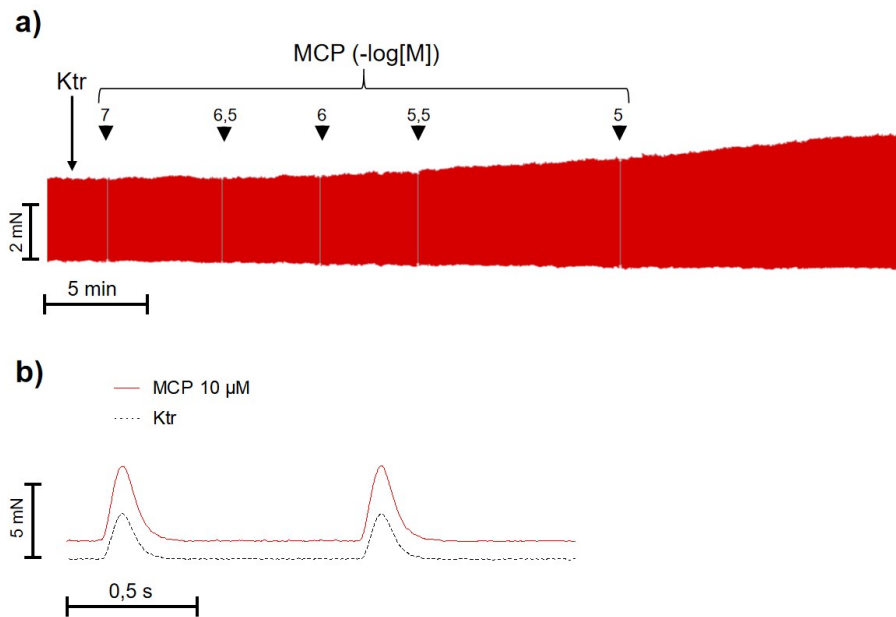


Abb. 22: Ausschnitt aus einem Originalmechanogramm eines Trabekelpräparates eines menschlichen rechten Atriums sowie beispielhafte Kontraktionen

Der Ausschnitt in a) zeigt ein Mechanogramm einer MCP-KWK an einem menschlichen rechten Atrium. Über dem Mechanogramm ist die aktuelle Substanzkonzentration im Organbad markiert. In x-Richtung ist die Zeit aufgetragen, in y-Richtung die Kraft. Der Ausschnitt in b) zeigt beispielhaft einzelne Kontraktionen des selben menschlichen rechten Atriums, das mit 1 Hz elektrisch stimuliert wurde, in Ruhelage (schwarz) und zum Zeitpunkt der maximalen MCP-Konzentration im Organbad (rot). In x-Richtung ist die Zeit aufgetragen und in y-Richtung die Kraft.

-log[M], negativer Logarithmus der Substanzkonzentration M im Organbad – Ktr, Kontrollzeitpunkt (Ruhelage) – KWK, Konzentrations-Wirkungs-Kurve – MCP, Metoclopramid – min, Minuten – mN, Millinewton – s, Sekunden – μ M, Mikromolar

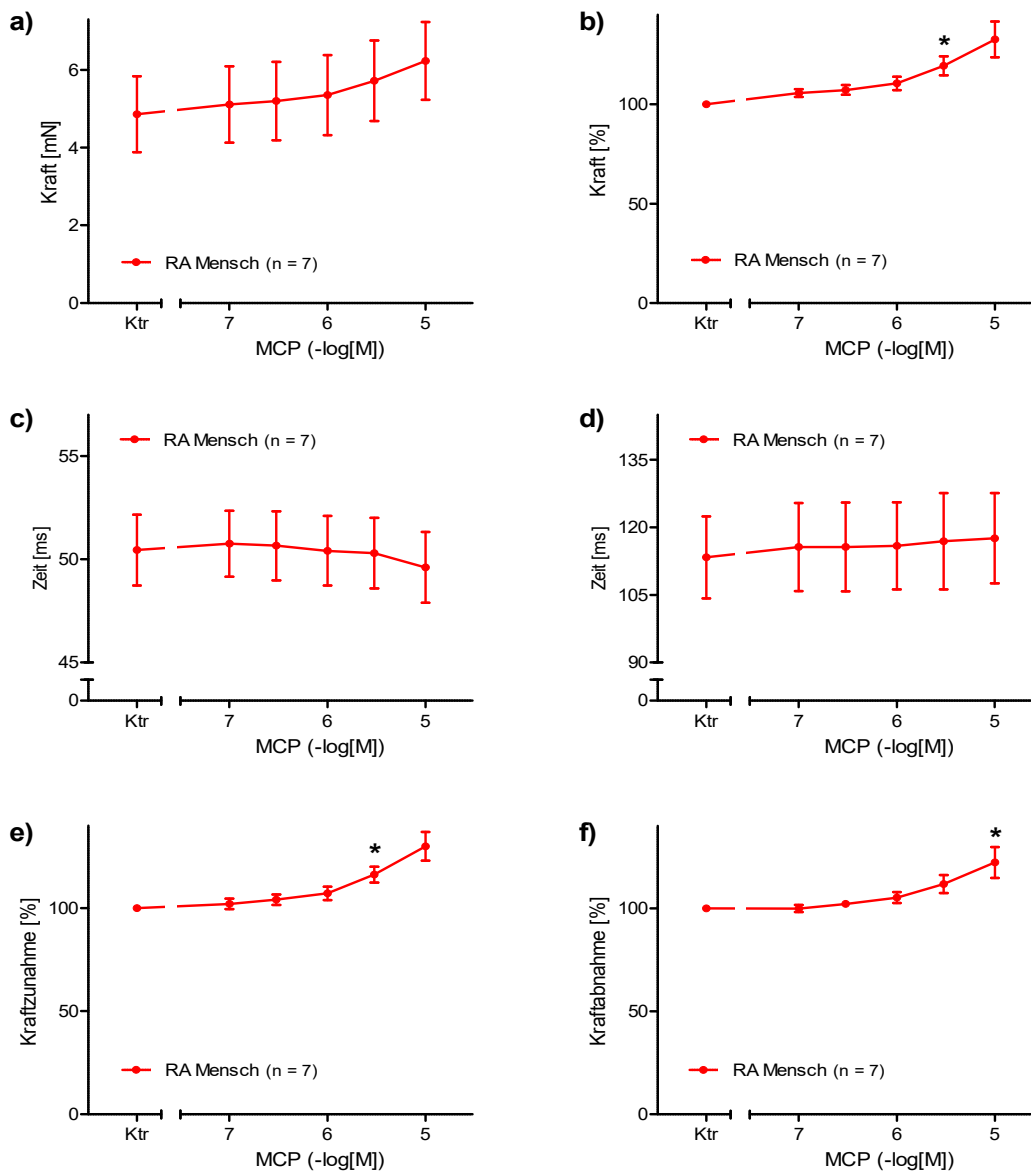


Abb. 23: Kontraktionsversuche an den Trabekelpräparaten menschlicher rechter Atrien

Auf der x-Achse ist die Substanzkonzentration im Organbad aufgetragen. Auf der y-Achse ist als Mittelwert mit Standardfehler in a) die Kraft in Millinewton (mN), in b) die Kraft in Prozent (%) der Ruhelage (Ktr), in c) die Anspannungs- bzw. in d) die Erschlaffungszeit der einzelnen Kontraktionen in Millisekunden (ms) und in e) der maximale Kraftanstieg bzw. in f) -abfall der einzelnen Kontraktionen in Millinewton pro Sekunde (mN/s) der menschlichen rechten Atrien aufgetragen.

* erstes $p < 0,05$ vs. Ktr

-log[M], negativer Logarithmus der Substanzkonzentration M im Organbad – Ktr, Kontrollzeitpunkt (Ruhelage) – MCP, Metoclopramid – mN, Millinewton – ms, Millisekunden – n, Anzahl der Einzelversuche – s, Sekunde – RA, rechtes Atrium

5 Diskussion

5.1 Diskussion der angewandten Methoden

Um die über den Serotoninrezeptor vermittelten kardialen Wirkungen der Medikamente MCP und Domperidon näher zu beleuchten, ist ein geeignetes Tiermodell nötig, weil menschliche Herzmuskelpräparate nur selten zur Verfügung stehen und, sofern sie keinen intakten Sinusknoten besitzen, auch nicht für die Beurteilung chronotroper Effekte herangezogen werden können. Da bereits gezeigt wurde, dass an menschlichen Vorhofpräparaten der 5-HT₄-Rezeptor von besonderer Bedeutung bei der Vermittlung von positiv inotropen Effekten über eine cAMP-Erhöhung ist (Kaumann et al., 1990; Gergs et al., 2009) und dieser Rezeptor auch im menschlichen Ventrikel nachgewiesen wurde (Brattelid et al., 2004), fiel die Entscheidung auf ein Tiermodell, das zur gezielten Untersuchung des 5-HT₄-Rezeptors geeignet ist. Dazu wurde, wie in 3.2 beschrieben, der humane 5-HT_{4a}-Rezeptor in einer transgenen Maus herzspezifisch exprimiert (Gergs et al., 2010).

An den isolierten Vorhöfen dieser transgenen Mäuse war die getrennte Untersuchung der inotropen Effekte von MCP und Domperidon an den linken und der chronotropen Effekte an den rechten Vorhöfen möglich. Allerdings erfordert die Präparation dieser, aufgrund ihrer geringen Größe und außerordentlichen Empfindlichkeit, eine hohe Achtsamkeit und Routine in der Erstellung und im Umgang, um die nachfolgenden Messungen nicht zu verfälschen. So kann z.B. der Sinusknoten des rechten Atriums schnell beschädigt werden, was bereits zu Versuchsbeginn zu Arrhythmien führen kann. Zudem war es durch die vergleichende Untersuchung atrialer Präparationen von WT und TG Mäusen möglich herauszufinden, welche Effekte durch den 5-HT₄-Rezeptor vermittelt wurden und welche nicht, da in den Herzen von WT Mäusen keine funktionellen 5-HT₄-Rezeptoren nachweisbar sind (Gergs et al., 2010). Da jedoch nur die Vorhöfe in den Kontraktionsversuchen verwendet werden konnten, wurden an einem Teil der verbliebenen Ventrikel noch zusätzlich proteinanalytische Untersuchungen mittels Western-blotting (s. 3.5) durchgeführt. Allerdings können diese Methoden keinen abschließenden Aufschluss darüber geben, welchen Einfluss diese beiden Medikamente am gesamten lebenden Organismus und im speziellen am

intakten und innervierten Herzen ausüben.

Um abschätzen zu können, inwieweit die Ergebnisse aus dem Tiermodell tatsächlich auf den Menschen übertragbar sind, wurde ein Teil der Versuche auch an Trabekelpräparaten rechter Vorhöfe von kardial vorerkrankten Personen durchgeführt.

5.2 Wirkungen von Metoclopramid

Durch die Zugabe von MCP erhöhte sich an den Vorhof-Präparationen von TG Mäusen die Kontraktionskraft, wohingegen sich bei WT Vorhöfen kein Effekt zeigte. Dies spricht dafür, dass dieser positiv inotrope Effekt über den 5-HT_{4a}-Rezeptor vermittelt wird. Der pEC₅₀-Wert dieses Effektes betrug $6,0 \pm 0,1$ und die maximale Kraft 207 ± 10 % gegenüber der Ausgangslage. Parallel dazu konnte ebenfalls gezeigt werden, dass 10 μ M MCP an Langendorff-Herzen von TG Mäusen die Kontraktionskraft steigerte und an WT Herzen nicht (Neumann et al., 2021). Zuvor konnte schon in Kontraktionsversuchen an menschlichen Magenpräparaten festgestellt werden, dass MCP dort einen PIE (pEC₅₀: $5,0 \pm 0,5$) via 5-HT₄-Rezeptoren von maximal 195 ± 29 % gegenüber der Kraft vor Substanzzugabe vermittelte (Broad et al., 2014). Durch MCP wurde auch ein positiv lusitroper Effekt bei linken Vorhöfen transgener Mäuse erzielt, was daran erkennbar ist, dass diese Substanz die Erschlaffungszeit dieser verkürzte und deren maximalen Kraftabfall erhöhte. Dies spricht, neben der Tatsache, dass dies an Vorhofpräparaten von WT Mäusen nicht beobachtet wurde, wiederum für einen 5-HT₄-Rezeptor vermittelten Effekt. Der Grund dieser Annahme ist, dass ein positiv lusitroper Effekt unter anderem durch eine erhöhte Aktivität der sarkoplasmatischen Calciumpumpe (SERCA) in Folge einer cAMP abhängigen Phosphorylierung von PLB durch die PKA erklärt wird (Katz and Lorell, 2000) und vom 5-HT₄-Rezeptor bekannt ist, dass er eben diese Signalkaskade als G_s-Protein gekoppelter Rezeptor vermitteln kann (Neumann et al., 2017). Auch in Experimenten an collikulären Neuronen von Mäuseembryonen in Primärkulturen konnte bereits gezeigt werden, dass über die Stimulierung des 5-HT₄-Rezeptors der cAMP-Spiegel in diesen Zellen stieg (Dumuis et al., 1988). Weiter bekräftigend konnte durch Western-blotting die Erkenntnis gewonnen werden, dass in den Proben transgener Ventrikelpräparate der Maus die

Phosphorylierung von PLB an Serin-16 durch MCP gesteigert werden konnte, wohingegen sich bei WT-Präparaten dieser Effekt nicht zeigte. Zudem wurde nachgewiesen, dass MCP die linksventrikuläre Ejektionsfraktion als Ausdruck der Kontraktilität in narkotisierten TG Mäusen erhöht, in WT Mäusen jedoch wiederum nicht (Neumann et. al., 2021). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass MCP, sehr wahrscheinlich über den 5-HT_{4a}-Rezeptor vermittelt, einen positiv chronotropen Effekt (pEC₅₀: 6,1 ± 0,1) an transgenen rechten Mäusevorhöfen bewirkt. Eine Erklärung hierfür ist, dass die wie zuvor beschriebene, ausgelöste Erhöhung des cAMP-Spiegels in den Zellen des Sinusknoten direkt zu einer erhöhten Aktivierbarkeit der HCN-Kanäle führt und dadurch die erhöhte Frequenz bedingt (Ulens und Tygat, 2001; De Maeyer et al., 2006).

Im Vergleich zu Serotonin kann MCP als Partialagonist am 5-HT_{4a}-Rezeptor bezeichnet werden. Dies stützt sich darauf, dass Serotonin in Kontraktionsversuchen an TG Atrien von Mäusen sowohl die durch MCP maximal erreichte Kraft, den maximalen Kraftabfall und die maximale Frequenz weiter steigern konnte als auch die maximalen Werte der Kraft und Schlagrate in der Serotonin-KWK (13,5 ± 0,8 mN; 619 ± 15 bpm) über denen der MCP-KWK (7,7 ± 0,7 mN; 527 ± 23 bpm) lagen. Ähnliches konnte auch in Experimenten an collikulären Neuronen von Mäuseembryonen in Primärkulturen festgestellt werden, an denen MCP verglichen mit Serotonin ebenfalls nur einen Teil des durch Stimulierung mit Serotonin erfolgten cAMP-Anstiegs in diesen Zellen auszulösen vermochte und daher als Partialagonist an diesem Rezeptor angesehen wurde (Dumuis et al., 1989). In den durchgeführten Western-blotting-Analysen hinsichtlich der PLB-Phosphorylierung konnte dies allerdings nicht auf signifikantem Niveau für Ventrikel von TG Mäusen bestätigt werden (V(P-PLB) / V(CSQ): MCP: 0,40 ± 0,09 (n = 4) vs. 5-HT: 0,43 ± 0,09 (n = 5)). Dies liegt möglicherweise an einer für diesen Effekt zu geringen Anzahl an Einzelversuchen oder könnte auch durch eine geringere Effektivität der Inkubation im Eppendorfgefäß verglichen mit dem Proben im Organbad erklärt werden, weil dort unter Umständen immer nur die äußerste Gewebeschicht mit dem Agonisten reagieren kann. Für einen Partialagonismus spricht weiterhin, dass auch antagonistische Eigenschaften von MCP in den Kontraktionsversuchen an TG

Mäusevorhöfen beobachtet werden konnten. So wies Serotonin, sowohl verabreicht nach der Metoclopramid-KWK bis 10 μM als auch nach der Substanzgabe von 1 μM MCP, eine geringere Potenz hinsichtlich inotroper und chronotroper Effekte im Vergleich zur Serotoningabe ohne vorherige MCP Applikation auf. Dies spricht zusammen mit den näherungsweise unveränderten Maximaleffekten der verschiedenen Serotonin-KWKs dafür, dass die antagonistischen Effekte Metoclopramids kompetitiver Art sind.

Die zuvor schon im gleichen Tiermodell nachgewiesenen Desensitivierungseffekte am 5-HT_{4a}-Rezeptor durch Serotonin (Gergs et al., 2017) konnten auch in den hier durchgeführten Versuchen beobachtet werden. Anhaltspunkte, dass ein Partialagonist die Entwicklung von Desensitivierungen vermeiden kann (Zhu, 2005), gab es allerdings nicht. So hat man keine gesteigerte Potenz von Serotonin bei einer zweiten KWK, als Ausdruck einer verminderten Desensitivierung, nach einer MCP-Gabe vor der ersten Serotonin-KWK gegenüber dem gleichen Versuchsablauf ohne MCP-Gabe beobachten können.

Die bereits an den 5-HT_{4a}-Rezeptor transgenen Mäusen beobachteten proarrhythmogenen Eigenschaften des Serotonins (Gergs et al., 2010; Keller et al., 2017) konnten tendenziell in den in 3.4.5 beschriebenen Experimenten auch beobachtet werden (s. Abb. 8), allerdings konnten diese nicht auf signifikantem Niveau bestätigt werden. Ähnliches gilt für MCP: So konnte kein proarrhythmogener Effekt dieser Substanz auf Signifikanzniveau nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung, warum das Signifikanzniveau hier nicht erreicht wurde, könnte die geringere Anzahl an Einzelversuchen, verglichen mit den zitierten Arbeiten, sein. Warum hingegen während der MCP-KWKs in Versuch 1 Arrhythmien beobachtet werden konnten, unter den einzelnen Gaben von MCP in Versuch 3 hingegen nicht, mag am ehesten den im Vergleich geringeren Nachbeobachtungszeiten und niedrigeren Stoffkonzentrationen in Versuch 3 geschuldet sein. Ob die proarrhythmogenen Eigenschaften des 5-HT_{4a}-Rezeptors jedoch auch die beobachteten, kardiovaskulären Ereignisse am Menschen unter MCP-Einnahme (Midttun und Oberg, 1994; Grenier und Drolet, 2003; Siddique et al., 2009; Rumore, 2012; Al-Shaer et al., 2015) erklären könnten, ist mit diesen Ergebnissen nicht abschließend beantwortbar. Denn selbst wenn bei

ausreichender Anzahl an Versuchen ein im Experiment signifikanter proarrhythmischer Effekt Metoclopramids in etwa der selben Ausprägung des Serotonineffektes gezeigt werden könnte, bleibt vorerst unklar ob die hier getesteten Konzentrationen von bis zu ca. 3 µg / ml unter Therapie am menschlichen Herzen überhaupt erreicht werden. So wurde nämlich bei gesunden Probanden lediglich eine klinisch beobachtete Plasmakonzentration von maximal 126 ng / ml für MCP nachgewiesen (Ross-Lee et al., 1981). Theoretisch könnte man diesbezüglich weiter argumentieren, dass unter bestimmten Voraussetzungen in Leber und / oder Nieren geschädigten Patienten oder bei Arzneimittelintoxikationen durchaus höhere Blutplasmaspiegel erreicht werden könnten und auch die kardiovaskulären Ereignisse nur vergleichsweise selten beobachtet werden (vgl. 1.1.2 u. 2). Allerdings kann man aufgrund der hier durchgeführten Experimente im Tiermodell diesen Erklärungsansatz für die proarrhythmogenen Eigenschaften Metoclopramids keineswegs als bewiesen ansehen und eine ganze Reihe weiterer Versuche wäre sicherlich von Nöten.

Um die Übertragbarkeit dieser Erkenntnisse aus dem Tiermodell auf das menschliche Gewebe genauer abschätzen zu können, wurden diesbezüglich auch Versuche an menschlichen Präparaten durchgeführt. Auch hier konnte in Kontraktionsversuchen an Trabekelpräparaten menschlicher rechter Vorhöfe ein positiv inotroper Effekt durch MCP von maximal $133 \pm 5 \%$ bezüglich der Kraft zum Kontrollzeitpunkt nachgewiesen werden. Als Erklärungsansätze, warum dieser Effekt aber im Vergleich zu TG Mäuseatrien deutlich geringer ausfiel, können mehrere herangezogen werden. So könnte sowohl diskutiert werden, dass bei einer vermutlich geringeren Potenz von MCP in den menschlichen Präparationen der maximale Effekt schlicht noch nicht erreicht wurde, als auch, dass die Präparate von kardial vorerkrankten Patienten prinzipiell nicht im gleichen Maße zu einer Kontraktionskraftsteigerung in der Lage sind wie „gesunde“ Mäuseatrien. Weiterhin ist es aber auch denkbar, dass der 5-HT₄-Rezeptor, der im menschlichen Vorhof in seiner funktionellen Form vorliegt (Kaumann et al., 1990; Kaumann, 1994) und im Speziellen mindestens in seinen Isoformen 4a (Blondel et al., 1998) und 4b (Bach et al., 2001), in einer verhältnismäßig geringeren Menge exprimiert wird als in unserem Modell mit kardial 5-HT_{4a}-Rezeptor überexprimierenden Mäusen

bzw. bei MCP auch eine gewisse Isoformenspezifität dahingehend besteht. Außerdem wurde auch bereits gezeigt, dass von den vielen weiteren bekannten Varianten (vgl. 1.2) zudem zumindest die 5-HT_{4g}- und 5-HT_{4i}-Spleißvarianten auch im menschlichen Herzen vorliegen (Kaumann und Levy, 2006). Zweifelsohne wäre es aber noch ein spannendes Feld für weitere Versuche, um genauere Erkenntnisse bezüglich dieser Thesen gewinnen zu können.

5.3 Wirkungen von Domperidon

Durch die Zugabe von Domperidon erhöhte sich die Kontraktionskraft an den Vorhöfen von WT und 5-HT_{4a}-Rezeptor transgenen Mäusen nicht. Ähnliches wurde für die Kontraktionskraft menschlicher, elektrisch stimulierter Magenpräparate festgestellt, an denen durch Stimulation des 5-HT₄-Rezeptors PIEs erzielt wurden, nicht aber durch Domperidon (Broad et al., 2014). Auch hinsichtlich aller anderen in den Versuchen erhobenen Parameter konnte kein Unterschied zwischen WT und TG Mäusen unter Domperidongabe festgestellt werden. Dies spricht dafür, dass Domperidon nicht in einem physiologisch relevanten Ausmaß mit dem 5-HT_{4a}-Rezeptor interagiert und seine Wirkung lediglich als Antagonist am Dopamin₂-Rezeptor entfaltet (Kohli et al., 1983; Barone, 1999; Tonini et al., 2004; Giudicessi et al., 2018). Außerdem konnte auch in den Western-blots von WT und TG Mäuseventrikelpräparaten kein Einfluss von Domperidon auf die Phosphorylierung von Phospholamban festgestellt werden. In den rechten Mauseatrien allerdings konnten unter Domperidongabe negativ chronotrope Effekte beobachtet werden. Weil dies gleichermaßen an WT und TG Präparaten geschah und Serotonin in einer anschließenden KWK an TG Vorhöfen nicht seinen maximalen PCE ausschöpfen konnte, ist beim negativ chronotropen Effekt Domperidons wiederum eine Beteiligung des 5-HT_{4a}-Rezeptors weitgehend auszuschließen. Ob es sich um einen durch den β -Adrenozeptor vermittelten Mechanismus handelt, konnte in dieser Versuchsanordnung nicht ausgeschlossen werden. Zwar konnte Isoprenalin nach vorheriger Zugabe von Domperidon seinen maximalen positiv chronotropen Effekt nicht erreichen, jedoch lässt sich aufgrund dessen, dass nur eine einzelne Konzentration des Isoprenalins zugesetzt wurde, nicht rückschließen, ob diesem Effekt ein Mechanismus

kompetitiver oder nicht-kompetitiver Art zugrunde liegt. Eine andere mögliche Erklärung für den negativ chronotropen Effekt von Domperidon wäre die Hemmung des spannungsaktivierten, verzögert gleichrichtenden Kaliumkanals ERG, welche für Domperidon schon mehrfach experimentell nachgewiesen werden konnte (Drolet et al., 2000; Claassen und Zütkler, 2005; Stork et al., 2007). Es ist denkbar, dass ein verlangsamter Kaliumausstrom im Zuge der Inhibition dieses Kanals eine verzögerte Repolarisation und infolgedessen eine verminderte Herzfrequenz, wie wir sie in diesen Versuchen beobachtet haben, zur Folge hat. Interessanterweise wird dieser Kanal aus dem gleichen Grund auch für Long-QT-Syndrome verantwortlich gemacht (Curran et al., 1995; Vandenberg et al., 2012) und somit werden ihm auch proarrhythmogene Eigenschaften zugeschrieben. Dies steht allerdings im Kontrast zu unserer Beobachtung, dass unter Domperidongabe an linken und rechten Mäusevorhöfen keine Arrhythmien festgestellt werden konnten. Dabei muss aber auch bedacht werden, dass sich die ERG-Kanäle zwischen Menschen und Mäusen durch verschiedene Isoformen unterscheiden (Lees-Miller et al., 1997; Lin et al. 2014). Möglicherweise sind dadurch die proarrhythmogenen Eigenschaften des humanen ERG-Kanals nicht eins zu eins auf unser Mausmodell übertragbar. Oder aber der hier gewählte Beobachtungszeitraum und die Versuchsanzahl haben zur korrekten Abbildung dieses Effektes nicht ausgereicht. Weiterhin wären zusätzliche Untersuchungen dahingehend sicherlich interessant gewesen, waren jedoch im Rahmen des hier beschriebenen Vorhabens nicht umsetzbar.

6 Zusammenfassung

Mit Hilfe eines transgenen Mausmodells mit kardialer Überexpression des humanen 5-HT_{4a}-Rezeptors konnte nachgewiesen werden, dass Metoclopramid (MCP) über eben diesen Rezeptor positiv inotrope, lusitrope und chronotrope Effekte in Mäusevorhöfen vermittelt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch MCP in Ventrikelpräparaten der transgenen Mäuse der Gehalt des intrazellulären an Serin 16 phosphoryliertem Phospholambans (P-PLB) vermutlich als Ausdruck eines erhöhten cAMP-Spiegels anstieg. Weiter zeigte sich, dass MCP als Partialagonist am humanen 5-HT_{4a}-Rezeptor wirkt. Dies stützt sich, wie gezeigt werden konnte, darauf, dass MCP sowohl eine definitionsgemäß geringere Effektivität (MCP (Inotropie): 81 ± 2 % des maximalen 5-HT Effektes), als auch eine typisch geringere Potenz (pEC_{50} (Inotropie): $6,0 \pm 0,1$ (MCP) vs. $8,6 \pm 0,1$ (5-HT)) und auch partialantagonistische Effekte im Vergleich mit Serotonin an diesem Rezeptor vermittelt. Ferner wurde ein positiv inotroper Effekt durch MCP auch an menschlichen rechten Vorhöfen von Patienten belegt. Diese Erkenntnisse führten dazu, dass eine ursächliche Beteiligung des 5-HT₄-Rezeptor bei beobachteten kardiovaskulären Ereignissen unter MCP-Einnahme beim Menschen prinzipiell denkbar ist, wenn auch weitere Untersuchungen zu dieser Thematik dringend notwendig wären. Unter Verwendung der gleichen experimentellen Methoden zeigte sich bei Domperidon hingegen keine relevante Wirkung am humanen 5-HT_{4a}-Rezeptor. Unabhängig vom 5-HT_{4a}-Rezeptor konnte jedoch beobachtet werden, dass Domperidon einen negativ chronotropen Effekt an spontan kontrahierenden rechten Mäuseatrien vermittelt. Inwieweit dies allerdings mit den unter der Domperidon-Einnahme beobachteten kardiovaskulären Ereignissen beim Menschen in Zusammenhang zu bringen ist, bleibt weitgehend unklar.

Zusammenfassend ist es also mit dieser Arbeit gelungen, die qualitativen kardialen Effekte des in Deutschland meist verschriebenen Gastroprokinetika (MCP), das klinisch nicht dafür vorgesehen ist eine Wirkung am Herzen zu entfalten, aufzuzeigen. Dahingegen konnten für Domperidon kardiale Effekte über den humanen 5-HT_{4a}-Rezeptor weitestgehend ausgeschlossen werden.

7 Literaturverzeichnis

Afzal F, Andressen KW, Mørk HK, Aronsen JM, Sjaastad I, Dahl CP, Skomedal T, Levy FO, Osnes J-B, Qvigstad E (2009) 5-HT₄-elicited positive inotropic response is mediated by cAMP and regulated by PDE3 in failing rat and human cardiac ventricles. *Br J Pharmacol* 155:1005-1014. DOI: 10.1038/bjp.2008.339

Arana A, Johannes CB, McQuay LJ, Varas-Lorenzo C, Fife D, Rothman KJ (2015) Risk of Out-of-Hospital Sudden Cardiac Death in Users of Domperidone, Proton Pump Inhibitors, or Metoclopramide: A Population-Based Nested Case-Control Study. *Drug Saf* 38:1187-1199. DOI: 10.1007/s40264-015-0338-0

Al-Shaer MH, Mustafa MS, Scalese MJ (2015) Metoclopramide-induced asystolic cardiac arrest. *Ann Pharmacother* 49:610-611. DOI: 10.1177/1060028015577446

Bach T, Syversveen T, Kvingedal AM, Krobert KA, Brattelid T, Kaumann AJ, Levy FO (2001) 5HT₄(a) and 5-HT₄(b) receptors have nearly identical pharmacology and are both expressed in human atrium and ventricle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 363:146-160. DOI: 10.1007/s002100000299

Barnes NM, Ahern GP, Becamel C, Bockaert J, Camilleri M, Chaumont-Dubel S, Claeysen S, Cunningham KA, Fone KC, Gershon M, Di Giovanni G, Goodfellow NM, Halberstadt AL, Hartley RM, Hassaine G, Herrick-Davis K, Hovius R, Lacivita E, Lambe EK, Leopoldo M, Levy FO, Lummis SCR, Marin P, Maroteaux L, McCreary AC, Nelson DL, Neumaier JF, Newman-Tancredi A, Nury H, Roberts A, Roth BL, Roumier A, Sanger GJ, Teitler M, Sharp T, Villalón CM, Vogel H, Watts SW, Hoyer D (2021) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CX. Classification of Receptors for 5-hydroxytryptamine; Pharmacology and Function. *Pharmacol Rev* 73(1):310-520. DOI: 10.1124/pr.118.015552

Barone JA (1999) Domperidone: a peripherally acting dopamine₂-receptor antagonist. *Ann Pharmacother* 33:429-440. DOI: 10.1345/aph.18003

Bateman DN, Gokal R, Dodd TRP, Blain PG (1981) The pharmacokinetics of single doses of metoclopramide in renal failure. *Eur J Clin Pharmacol* 19:437-441. DOI: 10.1007/BF00548588

Blondel O, Vandecasteele G, Gastineau M, Leclerc S, Dahmoune Y, Langlois M, Fischmeister R (1998) Molecular and functional characterization of a 5-HT₄ receptor cloned from human atrium. *FEBS Letters* 412:465-474. DOI: 10.1016/S0014-5793(97)00820-X

Bor S, Demir M, Ozdemir O, Yuksel K (2018) A meta-analysis on the cardiac safety profile of domperidone compared to metoclopramide. *United European Gastroenterol J* 6:1331-1346. DOI: 10.1177/2050640618799153

Boyce MJ, Baisley KJ, Warrington SJ (2012) Pharmacokinetic interaction between domperidone and ketoconazole leads to QT prolongation in healthy volunteers: a randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study. *Br J Clin Pharmacol* 73:411-421. DOI: 10.1111/j.1365-2125.2011.04093.x

Brattelid T, Qvigstad E, Lynham JA, Molenaar P, Aass H, Geiran O, Skomedal T, Osnes JB, Levy FO, Kaumann AJ (2004) Functional serotonin 5-HT₄ receptors in porcine and human ventricular myocardium with increased 5-HT₄ mRNA in heart failure. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 370:157-166. DOI: 10.1007/s00210-004-0963-0

Broad J, Goralczyk A, Mannur K, Dukes GE, Sanger GJ (2014) Drugs acting at 5-HT₄, D₂, motilin, and ghrelin receptors differ markedly in how they affect neuromuscular functions in human isolated stomach. *Neurogastroenterol Motil* 26:851-861. DOI: 10.1111/nmo.12338

Champion MC, Hartnett M, Yen M (1986) Domperidone, a new dopamine antagonist. *CMAJ* 135:457-461.

Claassen S, Zünkler BJ (2005) Comparison of the effects of metoclopramide and domperidone on HERG channels. *Pharmacology* 74:31-36. DOI: 10.1159/000083234

Claeyssen S, Faye P, Sebben M, Lemaire S, Bockaert J, Dumuis A, Taviaux S (1997) Assignment of 5-Hydroxytryptamine Receptor (HTR₄) to human chromosome 5 bands q31→q33 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 78:133-134. DOI: 10.1159/000134646

Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincen GM, Green ED, Keating MT (1995) A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 80:795-803. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90358-5

De Bruin ML, Langendijk PN, Koopmans RP, Wilde AA, Leufkens HG, Hoes AW (2007) In-hospital cardiac arrest is associated with use of non-antiarrhythmic QTc-prolonging drugs. *Br J Clin Pharmacol* 63:216-223. DOI: 10.1111/j.1365-2125.2006.02722.x

De Maeyer JH, Straetemans R, Schuurkes JA, Romain, Lefebvre A (2006) Porcine left atrial and sino-atrial 5-HT₄ receptor-induced responses: fading of the response and influence of development. *Br J Pharmacol* 147:140-157. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706497

Desta Z, Wu GM, Morocho AM, Flockhart DA (2001) The gastroprokinetic and antiemetic drug metoclopramide is a substrate and inhibitor of cytochrome P450 2D6. *Drug Metab Dispos* 30:336-343. DOI: 10.1124/dmd.30.3.336

DiFrancesco D, Tortora P (1991) Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 351:145-147. DOI: 10.1038/351145a0

Doggrell SA, Hancox JC (2013) Cardiac safety concerns for domperidone, an antiemetic and prokinetic, and galactagogue medicine. *Expert Opin Drug Saf* 13:131-138. DOI: 10.1517/14740338.2014.851193

Drolet B, Rousseau G, Daleau P, Cardinal R, Turgeon J (2000) Domperidone Should Not Be Considered a No-Risk Alternative to Cisapride in the Treatment of Gastrointestinal Motility Disorders. *Circulation* 102:1883–1885. DOI: 10.1161/01.CIR.102.16.1883

Dumuis A, Bouhelal R, Sebben M, Cory R, Bockaert J (1988) A nonclassical 5-hydroxytryptamine receptor positively coupled with adenylate cyclase in the central nervous system. *Mol Pharmacol* 34:880-887.

Dumuis A, Sebben M, Bouhelal R (1989) The gastrointestinal prokinetic benzamide derivatives are agonists at the non-classical 5-HT₄ receptor positively coupled to adenylate cyclase in neurons. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 340:403-410. DOI: 10.1007/bf00167041

European Medicines Agency (EMA) (2013) European Medicines Agency recommends changes to the use of metoclopramide. https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/metoclopramide-article-31-referral-european-medicines-agency-confirms-change-use-metoclopramide_en.pdf - 03.04.2020.

European Medicines Agency (EMA) (2014) Annex II: Scientific conclusions and grounds for revocation / variation to the terms of the Marketing Authorisations. https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/metoclopramide-article-31-referral-annex-ii_en.pdf - 03.04.2020.

Frenker J (2013) Desensitivierung humaner 5-HT_{4a}-Rezeptoren in Vorhöfen von Herzen transgener Mäuse (Dissertation). Halle: Universität.

Gerald C, Adham N, Kao HT, Olsen MA, Laz TM, Schechter LE, Bard JA, Vaysse PJ, Hartig PR, Branchek TA, Weinshank RL (1995) The 5-HT₄ receptor: molecular cloning and pharmacological characterization of two splice variants. *EMBO J* 14:2806-2815.

Gergs U, Baumann M, Böckler A, Buchwalow IB, Ebel H, Fabritz L, Hauptmann S, Keller N, Kirchhof P, Klöckner U, Pönicke K, Rueckschloss U, Schmitz W, Werner F, Neumann J (2010) Cardiac overexpression of the human 5-HT₄ receptor in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299:H788-798. DOI: 10.1152/ajpheart.00691.2009

Gergs U, Böckler A, Ebel H, Hauptmann S, Keller N, Otto V, Pönicke K, Schmitz W, Neumann J (2013) Human 5-HT₄ receptor stimulation in atria of transgenic mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 386:357-367. DOI: 10.1007/s00210-013-0831-x

Gergs U, Fritsche J, Fabian S, Christ J, Neumann J (2017) Desensitization of the human 5-HT₄ receptor in isolated atria of transgenic mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 390:987-996. DOI: 10.1007/s00210-017-1403-2

Gergs U, Neumann J, Simm A, Silber RE, Remmers FO, L er S (2009) Phosphorylation of phospholamban and troponin I through 5-HT₄-receptors in the isolated human atrium. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 379:349-359. DOI: 10.1007/s00210-008-0371-y

Giudicessi JR, Ackerman MJ, Camilleri M (2018) Cardiovascular safety of prokinetic agents: A focus on drug-induced arrhythmias. *Neurogastroenterol Motil* 30:e13302. DOI: 10.1111/nmo.13302

Granger B (1999) [The discovery of haloperidol]. *L'Enc phale* 25:59-66.

Green MR, Sambrook J (2012) *Molecular Cloning. A laboratory Manual. Volume 1, 4. Aufl.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.

Grenier Y, Drolet P (2003) Asystolic cardiac arrest: an unusual reaction following iv metoclopramide. *Can J Anaesth* 50:333-335. DOI: 10.1007/BF03021028

Haghighi K, Bidwell P, Kranias EG (2014) Phospholamban interactome in cardiac contractility and survival: A new vision of an old friend. *J Mol Cell Cardiol* 77:160-7. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2014.10.005

Hamstra SI, Whitley KC, Baranowski RW, Kurgan N, Braun JL, Messner HN, Fajardo VA (2020) The role of phospholamban and GSK3 in regulating rodent cardiac SERCA function. *Am J Physiol Cell Physiol* 319(4):C694-C699. DOI: 10.1152/ajpcell.00318.2020

Hegde SS, Eglen RM (1996) Peripheral 5-HT₄ receptors. *FASEB J* 10:1398-1407. DOI: 10.1096/fasebj.10.12.8903510

Heykants JJP, Hendriks R, Meuldermans W, Michiels M, Scheygrond H, Reyntjens H (1981) On the pharmacokinetics of domperidone in animals and man IV. The pharmacokinetics of intravenous domperidone and its bioavailability in man following intramuscular, oral and rectal administration. *Eur J Drug Metabol Pharmacokinet* 6:61-70. DOI: 10.1007/BF03189516

Hondeghem LM (2013) Domperidone: Limited Benefits With Significant Risk for Sudden Cardiac Death. *J Cardiovasc Pharmacol* 61:218-225. DOI: 10.1097/FJC.0b013e31827afd0d

Hoyer D, Hannon JP, Martin GR (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 71:533-554. DOI: 10.1016/s0091-3057(01)00746-8

Huang Y-C, Colaizzi JL, Bierman RH, Woestenborghs R, Heykants JJP (1986) Pharmacokinetics and dose proportionality of domperidone in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 26:628-632. DOI: 10.1002/j.1552-4604.1986.tb02962.x

Humphrey PP, Bunce KT (1992) Tachycardia during cisapride treatment. *BMJ* 305:1019-1020. DOI: 10.1136/bmj.305.6860.1019-b

Johannes CB, Varas-Lorenzo C, McQuay LJ, Midkiff KD, Fife D (2010) Risk of serious ventricular arrhythmia and sudden cardiac death in a cohort of users of domperidone: a nested case-control study. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 19:881-888. DOI: 10.1002/pds.2016

Jolliet P, Nion S, Allain-Veyraca G, Tilloy-Fenart L, Vanuxeem D, Berezowski V, Cecchelli R (2007) Evidence of lowest brain penetration of an antiemetic drug, metopimazine, compared to domperidone, metoclopramide and chlorpromazine, using an in vitro model of the blood-brain barrier. *Pharmacol Res* 56:11-17. DOI: 10.1016/j.phrs.2006.12.004

Katz AM, Lorell BH (2000) Regulation of cardiac contraction and relaxation. *Circulation* 102:IV-69-IV-74. DOI: 10.1161/circ.102.suppl_4.IV-69

Kaumann AJ (1994) Do human atrial 5-HT₄ receptors mediate arrhythmias?. *Trends Pharmacol Sci* 15:451-455. DOI: 10.1016/0165-6147(94)90058-2

Kaumann AJ, Levy FO (2006) 5-Hydroxytryptamine receptors in the human cardiovascular system. *Pharmacol Ther* 111:674-706. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2005.12.004

Kaumann AJ, Sanders L (1994) 5-Hydroxytryptamine causes rate-dependent arrhythmias through 5-HT₄ receptors in human atrium: facilitation by chronic beta-adrenoceptor blockade. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 349:331-337. DOI: 10.1007/bf00170877

Kaumann AJ, Sanders L, Brown AM, Murray KJ, Brown MJ (1990) A 5-hydroxytryptamine receptor in human atrium. *Br J Pharmacol* 100:879-885. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1990.tb14108.x

Keller N, Dhein S, Neumann J, Gergs U (2018) Cardiovascular effects of cisapride and prucalopride on human 5-HT₄ receptors in transgenic mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 391:975-985. DOI: 10.1007/s00210-018-1519-z

Kohli JD, Glock D, Goldberg LI (1983) Selective DA₂ versus DA₁ antagonist activity of domperidone in the periphery. *Eur J Pharmacol* 89:137-141. DOI: 10.1016/0014-2999(83)90618-0

Lees-Miller JP, Kondo C, Wang L, Duff HJ (1997) Electrophysiological characterization of an alternatively processed ERG K⁺ channel in mouse and human hearts. *Circ Res* 81(5):719-26. DOI: 10.1161/01.res.81.5.719

Lefebvre H, Compagnon P, Contesse V, Delarue C, Thuillez C, Vaudry H, Kuhn J-M (2001) Production and metabolism of serotonin (5-HT) by the human adrenal cortex: paracrine stimulation of aldosterone secretion by 5-HT. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5001-5007. DOI: 10.1210/jcem.86.10.7917

LeMessurier DH, Schwartz CJ, Whelan RF (1959) Cardiovascular effects of intravenous infusions of 5-hydroxytryptamine in man. *Br J Pharmacol Chemother* 14:246-250. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1959.tb01393.x

Lin EC, Moungey BM, Lim E, Concannon SP, Anderson CL, Kyle JW, Makielski JC, Balijepalli SY, January CT (2014) Mouse ERG K(+) channel clones reveal differences in protein trafficking and function. *J Am Heart Assoc* 3(6):e001491. DOI: 10.1161/JAHA.114.001491

Lohse AW, Huber S (2021) Magen-Darm-Mittel und Lebertherapeutika. In: Ludwig WD, Mühlbauer B, Seifert R (Hrsg): *Arzneiverordnungs-Report 2021*. Springer, Berlin, Heidelberg, S. 523-550. DOI: 10.1007/978-3-662-63825-5_32

Lohse AW, Mössner J (2019) Magen-Darm-Mittel und Lebertherapeutika. In: Schwabe U, Paffrath D, Ludwig W-D, Klauber J (Hrsg): *Arzneiverordnungs-Report 2019*. Springer, Heidelberg, S. 761-788. DOI: 10.1007/978-3-662-59046-1_34

Medhurst AD, Kaumann AJ (1993) Characterization of the 5-HT₄ receptor mediating tachycardia in piglet isolated right atrium. *Br J Pharmacol* 110:1023-1030. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1993.tb13916.x

Medhurst AD, Lezoualc'h F, Fischmeister R, Middlemiss DN, Sanger GJ (2001) Quantitative mRNA analysis of five C-terminal splice variants of the human 5-HT₄ receptor in the central nervous system by TaqMan real time RT-PCR. *Mol Brain Res* 90:125-134. DOI: 10.1016/S0169-328X(01)00095-X

Michaud V, Turgeon J (2013) Domperidone and Sudden Cardiac Death: How Much Longer Should We Wait?. *J Cardiovasc Pharmacol* 61:215-217. DOI: 10.1097/FJC.0b013e31827e2573

Midttun M, Oberg B (1994) Total heart block after intravenous metoclopramide. *Lancet* 343:182-183. DOI: 10.1016/s0140-6736(94)90978-4

Neumann J, Hofmann B, Gergs U (2017) Production and Function of Serotonin in Cardiac Cells. In: Shad KF (ed): *Serotonin. A Chemical Messenger Between All Types of Living Cells*. IntechOpen, London, pp. 271-306. DOI: 10.5772/intechopen.69111

Neumann J, **Seidler T**, Fehse C, Marušáková M, Hofmann B, Gergs U (2021) Cardiovascular effects of metoclopramide and domperidone on human 5-HT₄-serotonin-receptors in transgenic mice and in human atrial preparations. *Eur J Pharmacol* 901:174074. DOI: 10.1016/j.ejphar.2021.174074

Ouadid H, Seguin J, Dumuis A, Bockaert J, Nargeot J (1992) Serotonin increases calcium current in human atrial myocytes via the newly described 5-hydroxytryptamine₄ receptors. *Mol Pharmacol* 41:346-351.

Pasricha PJ, Pehlivanov N, Sugumar A, Jankovic J (2006) Drug Insight: from disturbed motility to disordered movement—a review of the clinical benefits and medicolegal risks of metoclopramide. *Nat Clin Prac Gastroenterol Hepat* 3:138–148. DOI: 10.1038/ncpgasthep0442

Pau D, Workman AJ, Kane KA, Rankin AC (2003) Electrophysiological effects of 5-hydroxytryptamine on isolated human atrial myocytes, and the influence of chronic beta-adrenoceptor blockade. *Br J Pharmacol* 140:1434-1441. DOI: 10.1038/sj.bjp.0705553

Pino R, Cerbai E, Calamai G, Alajmo F, Borgioli A, Braconi L, Cassai M, Montesi GF, Mugelli A (1998) Effect of 5-HT₄ receptor stimulation on the pacemaker current I_f in human isolated atrial myocytes. *Cardiovasc Res* 40:516-522. DOI: 10.1016/S0008-6363(98)00198-9

Rahme MM, Cotter B, Leistad E, Wadhwa MK, Mohabir R, Ford APDW, Eglen RM, Feld GK (1999) Electrophysiological and Antiarrhythmic Effects of the Atrial Selective 5-HT₄ Receptor Antagonist RS-100302 in Experimental Atrial Flutter and Fibrillation. *Circulation* 100:2010–2017. DOI: 10.1161/01.CIR.100.19.2010

Rao AS, Camilleri M (2009) Review article: metoclopramide and tardive dyskinesia. *Aliment Pharmacol Ther* 31:11-19. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2009.04189.x

Reddymasu SC, Soykan I, McCallum RW (2007) Domperidone: review of pharmacology and clinical applications in gastroenterology. *Am J Gastroenterol* 102:2036-2045.

Richter DW, Manzke T, Wilken B, Ponimaskin E (2003) Serotonin receptors: guardians of stable breathing. *Trends Mol Med* 9:542-548. DOI: 10.1016/j.molmed.2003.10.010

Ross-Lee LM, Eadie MJ, Hooper WD, Bochner F (1981) Single-dose pharmacokinetics of metoclopramide. *Eur J Clin Pharmacol* 20:465-471. DOI: 10.1007/BF00542101

Rumore MM (2012) Cardiovascular adverse effects of metoclopramide: Review of literature. *Int J Case Rep Imag* 3:1-10. DOI: 10.5348/ijcri-2012-05-116-RA-1

Sanders L, Kaumann AJ (1992) A 5-HT₄-like receptor in human left atrium. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 345:382-386. DOI: 10.1007/bf00176614

Schulze-Delrieu K (1981) Metoclopramide. *N Engl J Med* 305:28-33. DOI: 10.1056/NEJM198107023050106

Seifert R, Hamann K-F (2021) Antiemetika und Antivertiginosa. In: Ludwig WD, Mühlbauer B, Seifert R (Hrsg): *Arzneiverordnungs-Report 2021*. Springer, Berlin, Heidelberg, S. 261-266. DOI: 10.1007/978-3-662-63825-5_14

Siddique SM, Shariff N, Vesuwala N, Hafiz T (2009) Metoclopramide as a possible cause of prolonged QT syndrome and torsade de pointes in a patient with heart failure and renal insufficiency. *Ann Intern Med* 150:502-504. DOI: 10.7326/0003-4819-150-7-200904070-00016

Simmerman HK, Jones LR (1998) Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev* 78(4):921-47. DOI: 10.1152/physrev.1998.78.4.921

Stoetzer C, Voelker M, Doll T, Heineke J, Wegner F, Leffler A (2017) Cardiotoxic antiemetics metoclopramide and domperidone block cardiac voltage-gated Na⁺ channels. *Anesth Analg* 124:52-60. DOI: 10.1213/ANE.0000000000001673

Stork D, Timin EN, Berjukow S, Huber C, Hohaus A, Auer M, Hering S. (2007) State dependent dissociation of HERG channel inhibitors. *Br J Pharmacol* 151:1368-1376. DOI: 10.1038/sj.bjp.0707356

Straus SMJM, Sturkenboom MCJM, Bleumink GS, Dieleman JP, van der Lei J, de Graeff PA, Kingma JH, Stricker BHC (2005) Non-cardiac QTc-prolonging drugs and the risk of sudden cardiac death. *Eur Heart J* 26:2007-2012. DOI: 10.1093/eurheartj/ehi312

Svendsen K, Wood M, Olsson E, Nordeng H (2018) Reported time to onset of neurological adverse drug reactions among different age and gender groups using metoclopramide: an analysis of the global database Vigibase®. *Eur J Clin Pharmacol* 74:627–636. DOI: 10.1007/s00228-017-2407-z

Tonini M (1996) Recent advances in the pharmacology of gastrointestinal prokinetics. *Pharmacol Res* 33:217-226. DOI: 10.1006/phrs.1996.0030

Tonini M, Cipollina L, Poluzzi E, Crema F, Corazza GR, Ponti F (2004) Clinical implications of enteric and central D2 receptor blockade by antidopaminergic gastrointestinal prokinetics. *Aliment Pharmacol Ther* 19:379-390. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2004.01867.x

Tonini M, De Ponti F, Di Nucci A, Crema F (1999) Review article: cardiac adverse effects of gastrointestinal prokinetics. *Aliment Pharmacol Ther* 13:1585-1591. DOI: 10.1046/j.1365-2036.1999.00655.x

Tsujikawa K, Dan Y, Nogawa K, Sato H, Yamada Y, Murakami H, Ohtani H, Sawada Y, Iga T (2003) Potentiation of domperidone-induced catalepsy by a P-glycoprotein inhibitor, cyclosporin A. *Biopharm Drug Dispos* 24:105-114. DOI: 10.1002/bdd.343

Tuladhar BR, Costall B, Naylor RJ (1996) Pharmacological characterization of the 5-hydroxytryptamine receptor mediating relaxation in the rat isolated ileum. *Br J Pharmacol* 119:303-310. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1996.tb15986.x

Ulens C, Tygat J (2001) Gi- and Gs-coupled receptors up-regulate the cAMP cascade to modulate HCN2, but not HCN1 pacemaker channels. *Pflugers Arch* 442:928-942. DOI: 10.1007/s004240100617

Valenzuela JE, Dooley CP (1984) Dopamine antagonists in the upper gastrointestinal tract. *Scand J Gastroenterol* 96:127-136.

Vandenberg JI, Perry MD, Perrin MJ, Mann SA, Ke Y, Hill AP (2012) hERG K(+) channels: structure, function, and clinical significance. *Physiol Rev* 92:1393-478. DOI: 10.1152/physrev.00036.2011

Villalón CM, den Boer MO, Heiligers JP, Saxena PR (1991) Further characterization, by use of tryptamine and benzamide derivatives, of the putative 5-HT₄ receptor mediating tachycardia in the pig. *Br J Pharmacol* 102:107-112. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1991.tb12140.x

Ward BA, Morocho A, Kandil A, Galinsky RA, Flockhart DA, Desta Z (2004) Characterization of human cytochrome P450 enzymes catalyzing domperidone N-dealkylation and hydroxylation in vitro. *Br J Clin Pharmacol* 58:277-287. DOI: 10.1111/j.1365-2125.2004.02156.x

Yüksel K, Tuğlular I (2019) Critical review of European Medicines Agency (EMA) assessment report and related literature on domperidone. *Int J Clin Pharm* 41:387-390. DOI: 10.1007/s11096-019-00803-9

Zhu BT (2005) Mechanistic explanation for the unique pharmacologic properties of receptor partial agonists. *Biomed Pharmacother* 59:76-89. DOI: 10.1016/j.biopha.2005.01.010

8 Thesen

1. Metoclopramid ist ein Partialagonist am humanen 5-HT_{4a}-Rezeptor mit schwachen antagonistischen Eigenschaften.
2. Metoclopramid vermittelt positiv inotrope, lusitrope und chronotrope Effekte über den humanen 5-HT_{4a}-Rezeptor.
3. Der 5-HT₄-Rezeptor als mögliche Ursache für beobachtete kardiovaskuläre Ereignisse unter Metoclopramideinnahme beim Menschen ist durch die vorliegende Arbeit plausibler geworden.
4. Domperidon scheint unter Verwendung der gleichen experimentellen Methoden wie für Metoclopramid nicht auf den humanen kardialen 5-HT_{4a}-Rezeptor zu wirken.
5. Domperidon vermittelt negativ chronotrope Effekte an Mäusevorhöfen.

9 Anlagen

9.1 Substratverzeichnis

Agarose	Agarose NEEO Ultra-Qualität; Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Anti-Calsequestrin	Anti-Calsequestrin antibody, ab3516; Abcam plc, Cambridge, Großbritannien
Anti-rabbit IgG	Anti-Rabbit IgG (whole molecule) - Alkaline Phosphatase antibody produced in goat, A3687-.5ML; Merck KGaA, Darmstadt
Anti-Ser16P-PLB	Anti-Phospholamban (phospho S16) antibody, ab15000; Abcam plc, Cambridge, Großbritannien
Ascorbinsäure	L-(+)-Ascorbinsäure; Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Blottingmembran	Amersham Protran supported 0.45 µm NC; GE Healthcare GmbH, Solingen
Blottingpapier	Saugpapier; Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen
Bromphenolblau	Bromophenol Blue sodium salt, B5525; Merck KGaA, Darmstadt
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	Calciumchlorid-Dihydrat, solid, 102382; Merck KGaA, Darmstadt
Carbogen	Carbogen LAB, O ₂ 95 %, CO ₂ 5 %; Linde GmbH, Pullach
CD1 Auszuchtstamm	CD-1 IGS Mouse, outbred; Charles River Laboratories International Inc., Wilmington, USA
Domperidon	Domperidone, powder, D122; Merck KGaA, Darmstadt
DTT	DTT (Diethiothreitol), R0862; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
ECF-Substrat	ECF Substrate, RPN5785; GE Healthcare GmbH, Solingen
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat; Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Eisessig	Essigsäure 100%, 100063; Merck KGaA, Darmstadt
Forward-Primer	MHC-SEQ-P1; biomers.net GmbH, Ulm Sequenz: 5' - ACC CTT ACC CCA CAT AGA CC - 3'
Glucose	D-(+)-Glucose, powder, G7021; Merck KGaA, Darmstadt
Glycerin	Glycerin, Rotipuran, ≥ 99,5 %, 3783.2; Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Gradientengel	Novex 4-12 % Tris-Glycin Plus Midi-Gele; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Heparin	Injektionslösung, 25000 IE / 5 ml, Heparin-Natrium- 25000-ratiopharm; Ratiopharm GmbH, Ulm
Isoprenalin	(-)-Isoproterenol (+)bitartate salt, powder, I2760; Merck KGaA, Darmstadt
KCl	Kaliumchlorid, solid, 104936; Merck KGaA, Darmstadt

KpnI	KpnI, Restriction Enzyme, ER0521; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Mastermix	2x Taq Plus Master Mix, P211; Vazyme Biotech Co., Ltd, Nanching, China
Metoclopramid	Metoclopramide hydrochloride, solid, M0763; Merck KGaA, Darmstadt
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Magnesiumchlorid-Hexahydrat, solid, 105833; Merck KGaA, Darmstadt
Milchpulver	Sucofin Magermilchpulver; TSI GmbH & Co.KG, Zeven
NaCl	Natriumchlorid zur Analyse, solid, 131659; AppliChem GmbH, Darmstadt
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat, solid, 106329; Merck KGaA, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, solid, 106346; Merck KGaA, Darmstadt
NaOH	Natriumhydroxid; Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, solid, 119753; Merck KGaA, Darmstadt
NruI-Fragments	Bsp68I (NruI), Restriction Enzyme, ER0111; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Pentobarbital	Injektionslösung, 16 g / 100 ml, Narcoren Pentobarbital-Natrium; Merial GmbH, Halbergmoos
Rainbow™-Marker	Amersham™ ECL™ Rainbow™ Marker - Full-Range, RPN800E; GE Healthcare GmbH, Solingen
RedSafe	RedSafe nucleic acid staining solution; iNtRON Biotechnology Inc., Seongnam, Südkorea
Reverse-Primer	5-HT-SEQ-P1R; biomers.net GmbH, Ulm Sequenz: 5´ - AAA CAC CTC CCC ATAAAT CC - 3´
Rinderalbumin	Albumin Bovine Fraction V, ph 7.0; SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
SacI	SacI, Restriction Enzyme, ER1131; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), powder, #1610302; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Serotonin	Serotonin hydrochloride, powder, H9523; Merck KGaA, Darmstadt
Triethanolamin	Triethanolamin, ≥ 99 %, 6300.1; Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Tris Base	TRIS (Trometamol), solid, A411.2; Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Tris HCl	Trizma hydrochloride, T3253, crystalline; Merck KGaA, Darmstadt
Tween-20	Tween 20, 9127.2; Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe

Wasser	Ampuwa Spüllösung Plastipur; Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
1 kbp DNA-Leiter	GeneRuler 1 kb Plus DNA-Leiter, SM1331; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

9.2 Puffer und Lösungen

AP-Puffer	Triethanolamin 1,33 % (V / V), NaCl 0,58 % (g / V), MgCl ₂ x 6 H ₂ O 0,10 % (g / V); pH 9,4
Gelelektrophorese-Puffer	NuPAGE MES SDS Running Buffer; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Laemmli-Lösung	Tris Base 1,5 % (g / V), SDS 4 % (g / V), Glycerin 20 % (V / V), Bromphenolblau 0,002 % (g / V), DTT 0,6 % (g / V); pH 6,8
SDS-Homogenisationspuffer	NaHCO ₃ 0,084 % (g / V), SDS 4 % (g / V)
Stammlösung I	NaCl 17,5 % (g / V), KCl 1,05 % (g / V), MgCl ₂ x 6 H ₂ O 0,56 % (g / V)
Stammlösung II	NaHCO ₃ 5 % (g / V)
Stammlösung III	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 0,29 % (g / V)
Stammlösung IV	CaCl ₂ x 2 H ₂ O 33,2 % (g / V)
TAE-Puffer	Tris Base 40 mM, Eisessig 50 mM, EDTA 1 mM; pH 8,0
TBST	Tris Base 0,12 % (g / V), NaCl 0,9 % (g / V), Tween-20 0,1 % (V / V); pH 7,4
Transfer-Puffer	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 0,75 % (g / V), NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 0,11 % (g / V); pH 8,1
Tyrode-Lösung	NaCl 119,9 mM, KCl 5,4 mM, MgCl ₂ x 6 H ₂ O 1,1 mM, NaHCO ₃ 22,6 mM, NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 0,42 mM, CaCl ₂ x 2 H ₂ O 1,8 mM, Glucose 5,05 mM, Ascorbinsäure 0,28 mM, EDTA 0,05 mM; pH 7,4

9.3 Geräteverzeichnis

Agarosegel-Elektrophorese-Einheit	PerfectBlue Gelsystem, Midi S; VWR International LLC, Radnor, USA
Analysenwaage	Excellence XS205DU; Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Aufzeichnungseinheit	PowerLab 4/30 mit Quad Bridge Amp; ADInstruments Ltd, Oxford, Großbritannien
Bad-Umwälzthermostat	Compactthermostat C 20 CS; Lauda Dr. R. Wosber GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Computer	Optiplex 7020, Dell; Dell Technologies Inc., Round Rock, USA

Doppelwandgefäß von	Doppelwandgefäß mit innerem Volumen 10 ml (Sonderanfertigung); Willers Laborbedarf e. K., Münster-Geist
Gel-Elektrophorese-Einheit	XCell4 SureLock Midi-Cell Electrophoresis System; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
ImageQuant	Image Quant TL Version 7.0; GE Healthcare GmbH, Solingen
Inkubator	Thermomixer 5436; Eppendorf AG, Hamburg
Kraftaufnehmer	Type GM2 force transducer; Hans-Albert Färber GmbH, Hamburg
LabChart 8	LabChart Pro Version 8.1.8; ADInstruments Ltd, Oxford, Großbritannien
Microsoft Excel	Excel 2016 für Windows; Microsoft Corporation, Redmond, USA
Mikrodismembrator	Mikrodismembrator S; Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
PCR-Gerät	Mastercycler gradient; Eppendorf AG, Hamburg
Prism 5 Reizgerät	Prism 5.03; Graphpad, San Diego, USA EXP-ST-04 mit MCU controlling unit; MDE GmbH, Walldorf
Transfer-Einheit	Trans-Blot Cell; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Typhoon-Scanner	TYPHOON 9410 Variable Mark Imager; Amersham Biosciences, Freiburg
Ultraschall-Homogenisator	Sonopuls HD 2070; Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Ultratiefkühlschrank	MDF-DU700VH-PE VIP ECO ULT Freezer; PHC Holdings Corporation, Tokio, Japan
Waage	Mettler PM480; Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Wärmethermostat	Alpha A6; Lauda Dr. R. Wosber GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Windows 7	Windows 7 Professional; Microsoft Corporation, Redmond, USA
Zentrifuge	Centrifuge 5424 R; Eppendorf AG, Hamburg

9.4 PCR-Programm

Denaturierung	94 °C	2 min	1 Zyklus
Denaturierung	94 °C	45 s	40 Zyklen
Annealing	56,6 °C	15 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Elongation	72 °C	10 min	1 Zyklus

9.5 Patientendaten

ID	h1	h2	h3
Alter	70 Jahre	53 Jahre	61 Jahre
Geschlecht	m	m	m
Anzahl Präparate	2	3	2
Diagnosen	Koronare Dreifäßerkrankung, arterielle Hypertonie, paroxysmales Vorhofflimmern, Diabetes mellitus Typ II, Adipositas	Koronare Dreifäßerkrankung, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus Typ II, Dyslipidämie	Koronare Dreifäßerkrankung, Zustand nach Lungenembolie, arterielle Hypertonie, Dyslipidämie
Medikamente	Apixaban, Atorvastatin, Clopidogrel, Empagliflozin, Metformin, Metoprolol, Pantoprazol, Ramipril, Torasemid	Acetylsalicylsäure, Amlodipin, Atorvastatin, Bisoprolol, Clopidogrel, Insulin, Pantoprazol, Ramipril, Torasemid	Amlodipin, Apixaban, Atorvastatin, Bisoprolol, Clopidogrel, Losartan, Pantoprazol, Torasemid

Erklärungen

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Bergheinfeld, den 04.05.2023

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. Joachim Neumann, der mir nicht nur dieses spannende Thema überlassen hat, sondern mich auch stets professionell und ausdauernd betreute. Insbesondere seine ständige Ansprechbarkeit und Erreichbarkeit in Kombination mit seiner herausragenden fachlichen Kompetenz auf diesem Forschungsgebiet empfand ich als bemerkenswert.

Weiterhin möchte ich mich besonders bei Herrn PD Dr. Ulrich Gergs bedanken. Erst durch ihn kam der Kontakt zum Institut zustande und ohne ihn wäre es mir an manchen Stellen nicht möglich gewesen, alle auftretenden Probleme und Fragen zu lösen. Zudem danke ich ihm für die Unterstützung beim Erstellen des Posters und Abstracts sowie dem Vorstellen dessen auf dem Kongress in Leipzig.

Zudem danke ich auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie für die tolle Integration sowie die geradezu familiäre Atmosphäre im Team. Gesondert möchte ich dabei Frau Sonja Reber nennen, die mich im Umgang und der Präparation der Versuchstiere sowie dem Ablauf der Kontraktionsversuche schulte und auch Frau Pia Willmy, die mich stets zuverlässig mit allen benötigten Versuchstieren und Substanzen versorgte und mir auch die Western-blotting Versuche durch ihre intensive Unterstützung dabei ermöglichte. Auch Frau Stephanie Simmrodt gilt mein Dank für die professionelle Organisation aller Feierlichkeiten, Meetings und bürokratischen Prozesse.

Ein weiterer besonderer Dank gilt natürlich meinen Eltern und meiner Frau. Ohne eure ständige Rückendeckung und motivationale Unterstützung wäre das Experimentieren und Schreiben dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Es hat viel Mühe, Zeit und Nerven gekostet, aber am Ende hat mich dieser gemeinsame Weg mit euch und Ihnen allen sehr bereichert.