

**Wirkung der Temperatur auf die Kontraktionskraft und
Arrhythmien von isolierten Vorhöfen transgener Mäuse mit
kardialer Histamin H₂-Rezeptorüberexpression**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Robert Johann Reinhard Hoffmann
geboren am
Betreuer: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Joachim Neumann
Gutachter: Prof. Dr. Detlef Neumann, Hannover
Prof. Dr. Holger Stark, Düsseldorf

Datum der Verteidigung: 24.10.2024

Referat

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob Hypothermie oder Hyperthermie die Effektivität und die Potenz von Histamin zur Steigerung der Kontraktionskraft über humane H₂-Rezeptoren beeinflussen. Um diesen kardialen Effekt erforschen zu können, wurde ein etabliertes transgenes Mausmodell, welches den humanen H₂-Histamin-Rezeptor im Herzen überexprimiert, genutzt (Gergs et al., 2019a, H₂-TG). Die Kontraktionsversuche wurden in einem Organbad an isolierten, elektrisch stimulierten (1 Hz) linken und spontan schlagenden rechten Vorhofpräparaten von H₂-TG und Wildtyp-Mäusen (WT), welche Geschwistertiere waren und als Kontrolle genutzt wurden, durchgeführt. Es konnte bei WT Mäusen keine chronotrope oder inotrope Wirkung von Histamin festgestellt werden. Die basale Schlagfrequenz der rechten Vorhofpräparate der H₂-TG sank unter Hypothermie (23°C) und stieg unter Hyperthermie (42°C) an. Weiterhin war die Effektivität von Histamin (0,01-100 µM) zur Steigerung der Kontraktionskraft (positiv inotroper Effekt) geringer in den linken H₂-TG Vorhofpräparaten bei 23°C und 42°C als bei 37°C. In ähnlicher Weise war der inotrope Effekt von Histamin in isolierten, elektrisch stimulierten (1 Hz), rechten menschlichen Vorhofpräparaten, die während einer Bypass-Operation gewonnen wurden, bei 23°C und 42°C geringer als bei 37°C. Zusätzlich wurde der Phosphorylierungszustand von Phospholamban an der Aminosäure 16 des Phospholambans sowohl in den linken Vorhofpräparaten der H₂-TG und WT Mäuse als auch in den rechten menschlichen Vorhofpräparaten untersucht. Diese wurden nach den Kontraktionsversuchen mit flüssigem Stickstoff unter der höchsten Histaminkonzentration (10-100 µM) eingefroren, homogenisiert und mittels Western Blot analysiert. In den H₂-TG Mäusen war die Serin-16-Phosphorylierung bei 23°C geringer als bei 37°C. Im Gegensatz dazu war die Serin-16-Phosphorylierung in den menschlichen Präparaten geringer bei 42°C als bei 37°C. Schließlich wurden die Häufigkeit und die Dauer von Arrhythmien in den spontan schlagenden rechten Vorhofpräparaten der H₂-TG und WT Mäuse verglichen. Unter Hyperthermie traten bei den H₂-TG Mäusen mehr und länger andauernde Arrhythmien auf als bei den WT Mäusen. Somit ist der inotrope Effekt von Histamin in den H₂-TG Mäusen und den rechten menschlichen Vorhofpräparaten sowie der chronotrope Effekt von Histamin in den H₂-TG Mäusen temperaturabhängig. Darüber hinaus scheint der H₂-Rezeptor aufgrund der unter Hyperthermie beobachteten Arrhythmien eine Rolle bei feberinduzierten supraventrikulären Arrhythmien im menschlichen Herzen zu spielen.

Hoffmann, Robert Johann Reinhard; Wirkung der Temperatur auf die Kontraktionskraft und Arrhythmien von isolierten Vorhöfen transgener Mäuse mit kardialer Histamin H₂-Rezeptorüberexpression, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss. 66 Seiten, 2024

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Hintergrund	1
1.3 Histamin-Rezeptoren	2
1.4 H ₂ -Rezeptoren.....	3
1.4.1 Signalkaskade und vermutete pathophysiologische Rollen des H ₂ -Rezeptors	5
2 Zielstellung der Arbeit	6
3 Material und Methoden	7
3.1 Versuchstiere und Tierhaltung	7
3.2 Generierung der transgenen Mäuse.....	7
3.3 Genotypisierung	8
3.3.1 Isolation der DNA	8
3.3.2 Konzentrationsbestimmung der DNA	9
3.3.3 PCR und Agarosegel-Elektrophorese	10
3.4 Kontraktionsversuche	10
3.4.1 Vorbereitung des Organbades	10
3.4.2 Vorbereitung und Kalibrierung der Messanlage	11
3.4.3. Organentnahme	13
3.4.4 Präparation des Herzens	13
3.4.5 Menschliche Vorhofpräparate	15
3.4.6 Versuchsdurchführung	16
3.5 Westernblot	17
3.6 Statistische Auswertung.....	19
4. Ergebnisse	21
4.1 Genotypisierung der H ₂ -TG Mäuse	21
4.2 Kontraktionsversuche an menschlichen Vorhofpräparaten	22
4.2.1 Kontraktionskraft	22
4.2.2 Anspannungs-, Relaxationsszeit und Kontraktionsgeschwindigkeit	24
4.3 Kontraktionsversuche am Vorhof der Maus	27
4.3.1 Kontraktionsversuche am linken Vorhof	27

4.3.2 Kontraktions- und Frequenzversuche am rechten Vorhof.....	32
4.4 Proteinphosphorylierung	39
4.5 Arrhythmien	43
5 Diskussion	46
5.1 Diskussion der Methoden	46
5.1.1 Mausmodell	46
5.1.2 Menschliche Präparate	47
5.1.3 Kontraktionsversuche an isolierten Vorhöfen	48
5.1.4 Kontraktionsversuche an menschlichen Vorhofpräparaten	49
5.2 Effekte von Histamin	50
5.2.1 Kontraktionsversuche.....	50
5.2.2 Phosphorylierung	52
5.2.3 Arrhythmien	53
5.3 Fazit.....	55
5.4 Ausblick	56
6 Zusammenfassung	57
7 Literaturverzeichnis	59
8 Thesen	66
9 Anhang.....
10 Selbständigkeitserklärung
11 Publikationen & Preise.....
12 Danksagung

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Signaltransduktion H ₂ -Rezeptor	5
Abbildung 2: Ohrlochmarkierung zur Nummerierung der Mäuse (Ayadi et al., 2011).....	9
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung für isometrische Kontraktionskraftmessungen.	12
Abbildung 4: Bild der Versuchsanordnung für isometrische Kontraktionsmessungen....	12
Abbildung 5: Detailaufnahme eines eingehängten Mausvorhofes	15
Abbildung 6: Versuchsprotokoll	17
Abbildung 7: Einzelkontraktion am Vorhof	20
Abbildung 8: Genotypisierung der H ₂ -transgenen Mäuse.	21
Abbildung 9: Mechanogramm der KWK im menschlichen Vorhof.....	23
Abbildung 10: Kontraktionskraft am menschlichen Vorhof	23
Abbildung 11: Kontraktionskraft am menschlichen Vorhof.....	24
Abbildung 12: Anspannungszeit am menschlichen Vorhof	25
Abbildung 13: Relaxationszeit am menschlichen Vorhof	26
Abbildung 14: Kontraktionsgeschwindigkeit am menschlichen Vorhof.....	26
Abbildung 15: Mechanogramme der KWK von Histamin im linken Vorhof der Maus ...	29
Abbildung 16: Kontraktionskraft am linken Vorhof der Maus	29
Abbildung 17: Anspannungszeit am linken Mausvorhof	30
Abbildung 18: Relaxationszeit am linken Mausvorhof	31
Abbildung 19: Kontraktionsgeschwindigkeit am linken Mausvorhof der H ₂ -TG Mäuse	31
Abbildung 20: Kontraktionsgeschwindigkeit am linken Mausvorhof der WT Mäuse	32
.....	35
Abbildung 21: Mechanogramme der KWK im rechten Vorhof der H ₂ -TG Maus	35
Abbildung 22: Frequenz am rechten Mausvorhof	35
Abbildung 23: Kontraktionskraft am rechten Vorhof der Maus	36
Abbildung 24: Anspannungszeit am rechten Mausvorhof.....	36
Abbildung 25: Relaxationszeit am rechten Mausvorhof.....	37
Abbildung 26: Kontraktionsgeschwindigkeit am rechten Mausvorhof der H ₂ -TG Mäuse	37
.....	37
Abbildung 27: Kontraktionsgeschwindigkeit am linken Mausvorhof der WT Mäuse	38
Abbildung 28: Western Blot von Proben der linken Mausvorhöfe	40
Abbildung 29: Phosphorylierungszustand von Serin-16 am linken Mausvorhof.....	41
Abbildung 30: Western Blot von Proben der menschlichen Vorhofpräparate	41
Abbildung 31: Phosphorylierung von Serin-16 am menschlichen Vorhof	42
Abbildung 32: Mechanogramm am rechten Mausvorhof	44

Abbildung 33: Dauer der Arrhythmien am rechten Vorhof der Maus	44
Abbildung 34: Inzidenzen der Arrhythmien am rechten Vorhof der Maus	45

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: EC50-Werte des positiv inotropen und chronotropen Effekts am Vorhof der Maus	30
Tabelle 2: Expression von HSP70 am linken Vorhof der Mauspräparate	42
Tabelle 3: Patientendaten	XII

Abkürzungsverzeichnis

5'AMP	5'-Adenosinmonophosphat
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatcyclase
Arr.	Arrhythmien
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bpm	Herzschläge pro Minute (beats per minute)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C48/80	Compound 48/80
Ca ²⁺	Ca ²⁺ -Ionen
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaMKII	Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	Zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
CSQ	Calsequestrin
DAD	Späte Nachdepolarisation (Delayed afterdepolarization)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC ₅₀	Konzentration, bei der die Hälfte der maximalen Aktivität erreicht wird
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
E _{max}	Maximaleffekt
F	Kraft (Force)
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GRK	G-Protein-Rezeptor-Kinase; Kinase, die G-Proteingekoppelte-Rezeptoren phosphoryliert
G _i	Inhibierendes GTP-bindendes Protein, Hemmung der Adenylatzyklase

G _s	Stimulierendes GTP-bindendes Protein, Aktivierung der Adenylatzyklase
GTP	Guanosintriphosphat
H ₁ -Rezeptor	Histamin-1-Rezeptor
H ₂ -Rezeptor	Histamin-2-Rezeptor
H ₃ -Rezeptor	Histamin-3-Rezeptor
H ₄ -Rezeptor	Histamin-4-Rezeptor
HCN-Kanäle	Durch Hyperpolarisierung aktivierte Zyklonukleotid-regulierte Kationenkanäle (Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel)
Hz	Hertz (Reizungen pro Minute)
IE	Internationale Einheit
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
Iso	Isoprenalin
kg	Kilogramm
Ktr	Kontrolle
KWK	Konzentrationswirkungskurve
log	Dekadischer Logarithmus
LTCC	L-Typ-Calcium-Kanal
M	Molar (Mol/Liter)
mA	Milliampère
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium ²⁺ -Ionen
MHC	Schwere Kette des Myosins
min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µM	Mikromolar
mm	Millimeter
mM	Millimolar (Millimol/Liter)
mmol	Millimol

mN	Millinewton
ms	Millisekunden
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (Messenger ribonucleic acid)
mV	Millivolt
n	Stichprobenumfang
nm	Nanometer
nM	Nanomolar (Nanomol/Liter)
OD	Optische Dichte
P	Phosphor/Phosphorylierung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PDE	Phosphodiesterase
pEC ₅₀	Negativer dekadischer Logarithmus der EC ₅₀
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PLB	Phospholamban
Primer	Oligonukleotid für die Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (Revolutions per minute)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (Reverse transcription polymerase chain reaction)
RyR	Ryanodin-Rezeptor (Ca ²⁺ -Freisetzungskanal)
s	Sekunde
s.c.	Subkutan
SDS	Natriumlaurylsulfat
SEM	Standardfehler des arithmetischen Mittels
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
SQ22536	9-(Tetrahydro-2-furanyl)-9H-purin-6-amin
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TG	Transgene Maus mit herzspezifischer Überexpression humaner H ₂ -Rezeptoren
TnC	Kalzium-bindendes Troponin

Tnl	Troponin I (Troponin-Inhibitor)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V	1. Volt 2. Volumen
vs.	Versus, im Vergleich zu
WT	Wildtyp-Maus

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

Der Pharmakologe H. Fühner benannte das Histamin im Jahre 1912 aufgrund seiner chemischen Struktur des β -Imidazolylamins (Fühner 1912). Erstmals wurde Histamin von zwei Chemikern aus Freiburg im Breisgau 1907 synthetisiert, als sie eine Reihe strukturell ähnlicher Verbindungen verwendeten (Windaus et al., 1907). Einige Jahre später wurde die Herstellung von Histamin aus Histidin durch Bakterien von Ackermann entdeckt. Damit zeigte er, dass Histamin nicht nur synthetisch im Reagenzglas hergestellt werden kann, sondern auch in der Natur vorkommt (Ackermann 1910, Ackermann et al., 1910). Frühe Studien haben bereits gezeigt, dass synthetisches Histamin eine positiv chronotrope und positiv inotrope Wirkung auf isolierte, perfundierte Herzen hat (Ackermann et al., 1910, Dale et al., 1910, Dale et al., 1911, Einis 1913). Es wurde auch schon über Histamin-induzierte Arrhythmien berichtet. Histamin führt in isolierten, mit Puffer perfundierten, spontan schlagenden Froschherzen zu einer Asystolie oder einem atrioventrikulären Block dritten Grades (Einis 1913).

Im menschlichen Herzen bewirkt Histamin sowohl einen positiv inotropen Effekt (Steigerung der Kontraktionskraft) als auch einen positiv chronotropen Effekt (Steigerung der Schlagfrequenz) und verstärkt die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit (Neumann et al., 2021a, Neumann et al., 2021b).

In einer vorherigen Studie wurden transgene Mäuse verwendet, die den menschlichen H_2 -Rezeptor im Herzen mit Hilfe des Promotors der schweren Ketten des α -Myosins überexprimieren, hergestellt und charakterisiert (Gergs et al., 2019a, Neumann et al., 2021d). Die Tiere reagierten bei Zugabe von Histamin sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mit einer erhöhten Kontraktionskraft im Vorhof in den Ventrikeln (Gergs et al., 2019a, Gergs et al., 2020, Neumann et al., 2021a). Außerdem kam es zu einer gesteigerten Schlagfrequenz der Herzen (Gergs et al., 2019a, Gergs et al., 2021b, Neumann et al., 2021c, Neumann et al., 2021d) und einem erhöhten Phosphorylierungszustand von Phospholamban (Gergs et al., 2019a). Es könnte klinisch relevant sein, dass Histamin die Phospholamban (PLB)-Phosphorylierung verstärkt und gleichzeitig die

Phosphorylierung des Troponin-Inhibitors (TnI) in elektrisch gereizten, isolierten menschlichen rechten Vorhofpräparaten erhöht. Dies lässt vermuten, dass die H₂-TG Mäuse höchstwahrscheinlich dieselbe Signaltransduktionskaskade des H₂-Rezeptors wie im menschlichen Vorhof aufweisen (Neumann et al., 2021a).

1.3 Histamin-Rezeptoren

Es sind derzeit vier verschiedene Histamin-Rezeptoren bekannt (H₁-H₄) (Hill et al., 1997, Jutel et al., 2009, Panula et al., 2015). Diese unterscheiden sich sowohl in ihrer Aminosäuresequenz als auch in der nachgeschalteten Signaltransduktion. Durch Spleißvarianten bilden H₃-Rezeptoren eine besonders große Vielfalt an Rezeptoren. Alle Subtypen der Histamin-Rezeptoren haben jeweils sieben Transmembrandomänen (heptahelikale Membranproteine) und weisen den Aufbau eines typischen G-Protein-gekoppelten Rezeptors auf. Die Histamin-Rezeptoren sind an intrazelluläre G-Proteine gebunden, um eine Signaltransduktion und die spezifische Wirkung des Histamins in den unterschiedlichen Organen auszulösen. Dabei unterscheiden sich die G-Proteine je nach Art des Histamin-Rezeptors. Histamin agiert hierbei zum einen als Gewebshormon und zum anderen als Neurotransmitter. Die H₁-Rezeptoren aktivieren über G_q-Proteine die Phospholipase C (Kuhn et al., 1996, Leurs et al., 1994). Die Aktivierung des H₂-Rezeptors regt hauptsächlich über G_s-Proteine die Adenylatcyclase und die Phospholipase C an (Kuhn et al., 1996). Im Gegensatz dazu führen die H₃- und H₄-Rezeptoren über G_i-Proteine zu einer Hemmung der Adenylatcyclase (Chan et al., 2012). Alle vier Rezeptoren treten im Herzen auf (Hattori et al., 2017, Panula et al., 2015). Bisher ist jedoch nur bekannt, dass lediglich die H₁- und H₂-Rezeptoren mit der Kontraktionskraft und der Schlagfrequenz des Herzens in Verbindung stehen. Diese Rezeptoren befinden sich auf den Kardiomyozyten des Herzens (Hattori et al., 2017). Die H₃- und H₄-Rezeptoren sind auf den neuronalen Zellstrukturen des Herzens zu finden und können beispielsweise die Freisetzung von Noradrenalin aus Speicherzellen im menschlichen Herzen hemmen (Hattori et al., 2017).

1.4 H₂-Rezeptoren

Der H₂-Rezeptor wurde erstmals 1972 von James W. Black beschrieben. Dieser beschrieb die Funktion von H₂-Rezeptor-Antagonisten, indem er unter anderem die Magensäuresekretion untersuchte, die nicht H₁-Rezeptor vermittelt ist. Anschließend testete er den H₂-Rezeptor-Antagonisten Burimamid an isolierten Vorhöfen von Meerschweinchen, um zwischen der H₁- und H₂-vermittelten Herzfunktion zu unterscheiden (Black et al., 1972). Der menschliche H₂-Rezeptor befindet sich auf dem Chromosom 5 (Dy et al., 2004, Hill et al., 1997, Jutel et al., 2009) und besteht aus 359 Aminosäuren (Gantz et al., 1991a, Gantz et al., 1991b, Panula et al., 2015).

Die H₂-Rezeptoren sind in den verschiedensten Bereichen des Körpers zu finden. Sie kommen in Nervenzellen des zentralen und peripheren Nervensystems, in Hepatozyten, in Zellen des Gastrointestinaltraktes sowie in glatten Muskelzellen der Atemwege und Gefäße sowie in Endothel und Epithelzellen vor (Akdis et al., 2006). Die Aktivierung der H₂-Rezeptoren fördert im Gastrointestinaltrakt die Magensäuresekretion und beeinflusst die Gefäßpermeabilität, da die Rezeptoren in der glatten Muskulatur sitzen und die Stimulation zur Relaxation führt. Durch Agonisten kommt es in den Atemwegen zu einer Bronchodilatation und zu einer Erhöhung der Schleimproduktion. Außerdem sind die H₂-Rezeptoren auch in Blutzellen wie T- und B-Zellen, Neutrophilen, Eosinophilen, Monozyten und dendritischen Zellen vorhanden (Akdis et al., 2006). In der Klinik sind die H₂-Rezeptor-Antagonisten unter anderem für die therapeutische Senkung der Magensäuresekretion relevant (Goodman et al., 2014, Tolbert 2021).

Die Verteilung und die Dichte der H₁- und H₂-Rezeptoren im Herzen hängen von der Spezies und der Region ab. Außerdem spielt ebenfalls das Alter der Spezies eine wichtige Rolle. So sind beispielsweise bei Ratten in den Vorhöfen und Ventrikeln deutlich weniger H₂-Rezeptoren vertreten und es herrscht eine höhere Dichte an H₁-Rezeptoren vor (Matsuda et al., 2004, Neumann et al., 2021b). In Versuchen konnte jedoch keine relevante Wirkung von Histamin an den Herzen der Ratten festgestellt werden (Matsuda et al., 2004). Im menschlichen Herzen weist der H₂-Rezeptor sowohl im atrialen als auch im

ventrikulären Myokard eine sehr hohe Expression auf (Matsuda et al., 2004). Dies könnte für die Arrhythmogenität von Histamin am menschlichen Herzen in verschiedenen Krankheitszuständen sprechen. Der altersbedingte Unterschied in der Expression von H₂-Rezeptoren wurde auch in den linken Vorhöfen von Meerschweinchen untersucht. Es wurde festgestellt, dass sowohl H₁- als auch H₂-Rezeptoren vorhanden sind. Allerdings konnte nur Ranitidin, ein H₂-Rezeptor-Antagonist, die positiv inotrope Wirkung in den Vorhöfen der neugeborenen Meerschweinchen hemmen. Chlorpheniramin und Thiperamid, ein H₁- und H₃-Rezeptor-Antagonist, zeigten keinen Effekt. Bei den erwachsenen Tieren wurde der positiv inotrope Effekt durch H₁-Rezeptoren vermittelt (Agata et al., 2010).

1.4.1 Signalkaskade und vermutete pathophysiologische Rollen des H₂-Rezeptors

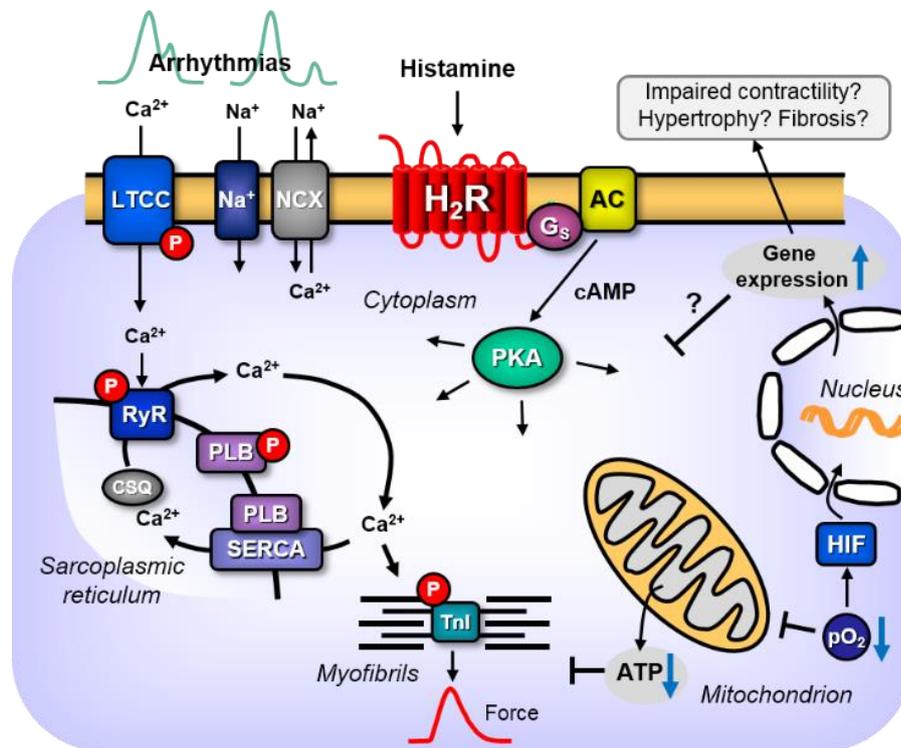


Abbildung 1: Signaltransduktion H₂-Rezeptor (Neumann et al., 2021b).

H₂-Rezeptoren können durch stimulierende GTP-bindende Proteine (G_s) Adenylatzyklasen (AC) aktivieren, die den 3', 5'-zyklisches Adenosinphosphat (cAMP) - Spiegel in Kardiomyozyten erhöhen. Dies aktiviert die cAMP-abhängigen Proteinkinasen (PKA), was den Phosphorylierungsstand und damit die Aktivität verschiedener regulatorischer Proteine in der Zelle erhöht. Außerdem erhöht die gestiegene Phosphorylierung den Strom durch den L-Typ-Ca²⁺-Kanal (LTCC) und die Freisetzung von Ca²⁺ aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) über den kardialen Ryanodinrezeptor (RyR). Störungen in der Calcium-Homöostase können zu Arrhythmien führen. In der Diastole wird Ca²⁺ über die SR-Ca²⁺-ATPase (SERCA) aus dem Zytosol in den SR gepumpt. Die Aktivität der SERCA wird durch die Phosphorylierung von Phospholamban (PLB) erhöht. PKA kann weiterhin auch die Gentranskription im Zellkern verstärken. Hypoxie und Ischämie beeinträchtigen die Atmung im Mitochondrium oder können direkt hypoxieinduzierbare Transkriptionsfaktoren (HIF) aktivieren. Eine erhöhte Expression oder geänderte Funktion des Natriumkationenkanals (Na⁺) oder des Natrium-Calcium-Austauschers (NCX) sowie eine erhöhte Expression des H₂-Rezeptors kann durch eine veränderte Ca²⁺-Homöostase zu supraventrikulären oder ventrikulären Arrhythmien führen (Neumann et al., 2021b).

2 Zielstellung der Arbeit

Ziel der Studie war es, den Einfluss verschiedener Temperaturen auf die Funktion des Histamin-H₂-Rezeptors zu erforschen. Dazu wurde eine etablierte Mauslinie verwendet, bei der der humane H₂-Rezeptor im Herzen überexprimiert wurde. Dadurch konnte die Maus auf Histamin mit kardialen Veränderungen, wie z.B. der Kontraktionskraft, reagieren. Die kardialen Einflüsse von Histamin können so isoliert auf den humanen H₂-Rezeptor dargestellt werden. Um einen Vergleich anzustellen, wurden Wildtyp-Mäuse verwendet, die keinen funktionellen H₂-Rezeptor exprimieren und daher nicht auf Histamin reagieren sollten.

Für die verschiedenen Temperaturen wurden neben der Normothermie von 37°C sowohl die Hypothermie bei 23°C als auch die Hyperthermie bei 42°C gewählt, wie sie bereits in einer vorherigen Studie der Arbeitsgruppe an 5-HT₄-Mäusen mit Serotonin untersucht wurden (Gergs et al., 2021a). Unter diesen Temperaturen sollte der Einfluss sowohl auf die Kontraktionskraft, Frequenz und weitere Parameter als auch auf die Phosphorylierung von Phospholamban untersucht werden. Dazu wurde der H₂-Agonist Histamin kumulativ unter Normo-, Hypo- und Hyperthermie verabreicht.

Ein weiteres Ziel der Untersuchung war es, die Wirkung von Histamin unter Hypo- und Hyperthermie auf die rechtsatrialen Arrhythmien der H₂-transgenen Mäuse zu untersuchen und inwieweit ein Unterschied zu den Wildtyp-Mäusen besteht. Diese Fragestellung ergab sich aus der Tatsache, dass beim Menschen Histamin-induzierte Arrhythmien gefunden wurden und in einer vorherigen Studie zu Serotonin an 5-HT₄-Mäusen eine erhöhte Anzahl von Arrhythmien unter Hypothermie beobachtet wurde (Gergs et al., 2021a). Die Hypothese lautete, dass bei H₂-transgenen Mäusen ebenfalls vermehrt Arrhythmien unter Hypothermie auftreten würden. Es sollte untersucht werden, ob es hierbei Unterschiede zum 5-HT₄-Rezeptor gibt.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Die Versuchstiere, die für die Experimente verwendet wurden, stammten aus der Auszuchtlinie CD1. Das Durchschnittsalter der transgenen Tiere betrug am Versuchstag $253 \pm 12,1$ Tage und das durchschnittliche Gewicht lag bei $38,8 \pm 1,45$ g (n=17). Die Wildtyp-Geschwistertiere waren im Durchschnitt $237 \pm 10,9$ Tage alt und wogen $38,4 \pm 1,06$ g (n=17). Es wurden annähernd gleich viele männliche und weibliche Tiere verwendet (TG: 8 männliche Mäuse, 9 weibliche Mäuse; WT: 7 männliche Mäuse, 10 weibliche Mäuse).

Die Mäuse wurden geschlechtsspezifisch getrennt gehalten und mit handelsüblichem Labortierfutter (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, 32791 Lage) und Wasser ad libitum versorgt. Zur Verpaarung wurden sie zusammengeführt. Die Haltung und Zucht der Mäuse erfolgte durch die Core-Facility Tierhaltung des Zentrums für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Es lagen sämtliche Genehmigungen dazu im ZMG vor. Es handelt sich um einen anzeigepflichtigen Tierversuch, der unter der internen Versuchsnummer I8M9 geführt wird.

3.2 Generierung der transgenen Mäuse

Die transgene Mauslinie, die in den Versuchen verwendet wurde, überexprimiert ausschließlich den humanen H₂-Histamin-Rezeptor im Herzen (Gergs et al., 2019a, Neumann et al., 2021b). Die kodierende Sequenz des menschlichen H₂-Histamin-Rezeptors wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Seifert (Institut für Pharmakologie, Medizinische Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt (Gergs et al., 2019a). Die cDNA wurde in eine Expressionskassette inkloniert, die den Promotor der schweren Kette des Myosins der α -Isoform (α -MHC) der Maus enthielt. Durch diesen Promotor wurde eine herzmuskelzell-spezifische Expression des Rezeptorgens ermöglicht. Die Transkription wurde durch eine Simian-Virus-40 (SV40)-Poly-A-Signalsequenz terminiert, welche in der Expressionskassette enthalten war (Gergs et al., 2010, Gergs et al., 2019a).

Anschließend wurde die Expressionskassette in befruchtete Eizellen von FVB/N-Mäusen mikroinjiziert. Die dabei entstandenen transgenen Tiere zeigten eine herzspezifische Überexpression des H₂-Histamin-Rezeptors und wurden in einen CD1-Hintergrund eingekreuzt (Gergs et al., 2019a).

Die kodierende Sequenz des menschlichen H₂-Histamin-Rezeptors wurde außerdem mit einem C-terminalen His-Tag (=6x Histidin) kombiniert.

3.3 Genotypisierung

3.3.1 Isolation der DNA

Um die Mäuse zu genotypisieren und eindeutig zu identifizieren, wurde ihnen im Alter von vier Wochen eine individuelle Ohrlochmarkierung gesetzt. Diese Markierung wird so vorgenommen, dass das rechte Ohr für die Einer und das linke Ohr für die Zehner steht, wie in Abbildung 2 dargestellt. Dadurch ist eine zweifelsfreie Bestimmung der Zahl von 1 bis 99 möglich. Das dabei abfallende Gewebe wurde für die Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) genutzt. Die Stanzbiopsien wurden über Nacht bei 55°C in 250 µl Lysispuffer inkubiert und dabei geschüttelt. Anschließend wurde das Lysat mittels 250 µl Neutralisierungspuffer neutralisiert. Die Zusammensetzung der Puffer ist im Anhang aufgeführt. Das Lysat konnte direkt für PCR verwendet werden.

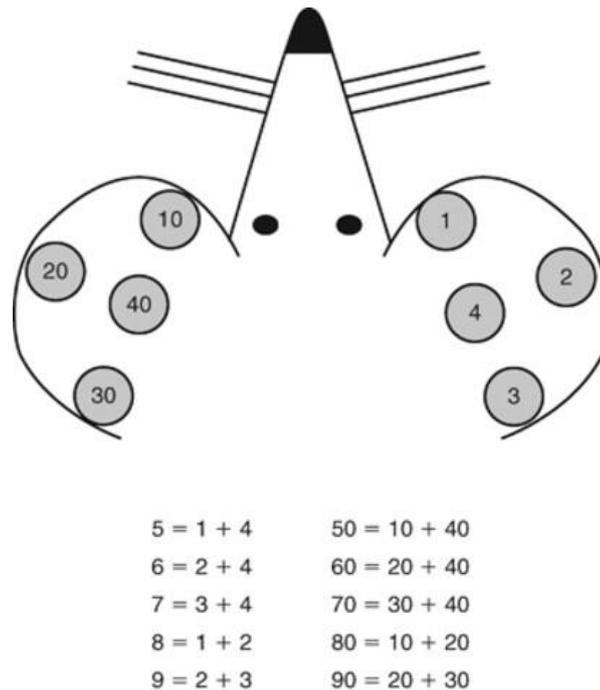


Abbildung 2: Ohrlochmarkierung zur Nummerierung der Mäuse (Ayadi et al., 2011)

Ohrlochmarkierung der Mäuse zur eindeutigen Identifizierung. Am rechten Ohr für die Einer, am linken Ohr für die Zehner. Mehrfachmarkierungen pro Seite sind möglich zur Darstellung von weiteren Zahlen.

3.3.2 Konzentrationsbestimmung der DNA

Die optische Dichte (OD) der DNA und damit die Konzentration dieser wurde mittels eines Photometers (Biophotometer, Eppendorf) bestimmt, indem die Extinktion bei 260nm (E_{260}) gemessen wurde. Zur Bestimmung des Kontrollwerts erfolgte eine Leerwertmessung ohne DNA. Bei einem OD_{260} -Messwert von 1,0 und der üblichen Schichtdicke der Messküvette von 1 cm enthält die Lösung 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngige DNA. Der DNA-Gehalt kann wie folgt berechnet werden: $E_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor} = X \mu\text{g/ml}$. Die Qualität der Probe kann anhand des Verhältnisses zweier Messwerte bei OD_{260} und OD_{280} abgeschätzt und beurteilt werden. Wenn der Quotient dabei zwischen 1,8 und 2,0 liegt, ist die DNA-Probe annähernd frei von Proteinen und Verunreinigungen.

3.3.3 PCR und Agarosegel-Elektrophorese

Das gesuchte DNA-Fragment konnte nun mittels einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Amplifikation vervielfältigt werden. Für die PCR wurde 1 μ l der DNA-Probe mit 10 μ l eines entsprechenden zweifach konzentrierten Reaktionsansatzes (siehe Anhang) versetzt. Der Reaktionsansatz enthielt den PCR-Puffer mit $MgCl_2$, den dNTP-Mix und die thermostabile Taq-DNA-Polymerase (siehe Anhang), sowie die passenden forward- und reverse-Primer (Endkonzentration je 0,1 μ M). Anschließend wurde die Probe mit DEPC-Wasser (siehe Anhang) aufgefüllt, um eine Gesamtmenge von 20 μ l zu erreichen. Die PCR wurde in einem Eppendorf Thermocycler durchgeführt. Das erwartete PCR-Produkt hatte eine Länge von 508 Basenpaare.

3.4 Kontraktionsversuche

Die Kontraktionsversuche wurden gemäß den etablierten und vielfach publizierten Methoden des Instituts durchgeführt (Abella et al., 2022, Gergs et al., 2021a, Neumann et al., 2021a).

3.4.1 Vorbereitung des Organbades

Vor Beginn jedes Versuchs wurde die verwendete physiologische Salzlösung (Tyrode-Lösung) frisch hergestellt. Die Tyrode-Lösung enthält Glukose und Elektrolyte (siehe Anhang) in Wasser gelöst, um ein physiologisches Milieu im Organbad herzustellen. Sie wird aus drei zuvor vorbereiteten Stammlösungen hergestellt. Die genaue Zusammensetzung ist im Anhang zu finden. Anschließend wurde die Lösung 30 Minuten lang mit Carbogen (95 % O_2 und 5 % CO_2) begast, um den pH-Wert zu stabilisieren und zu oxygenieren. Danach wurden 0,8 ml Kalziumchlorid-Lösung (33,2 g $CaCl_2/100$ ml H_2O ; f.c. 1,8 mM), 1 g Glukose, 49,3 mg Ascorbinsäure und 19 mg Na_2 -EDTA (siehe Anhang) zugegeben. Während der Vorbereitungen und des gesamten Versuchs wurde die Tyrode-Lösung bei einer Temperatur von 37°C gelagert und zur pH-Wert-Stabilisierung kontinuierlich mit Carbogen begast.

3.4.2 Vorbereitung und Kalibrierung der Messanlage

Die Messanlage für isometrische Kontraktionen bestand aus doppelwandigen Organbädern mit einem Volumen von je 10 ml (Abbildung 3 und 4). Das Innengefäß wurde mit Tyrode-Lösung befüllt und bot Platz für jeweils ein Vorhofpräparat. Am unteren Teil des Organbades war eine Carbogenzufuhr angebracht. Der äußere Teil des doppelwandigen Gefäßes diente der indirekten Temperaturregulierung des Organbades mittels Umwälzthermostat, indem ein Zu- und Abfluss für einen Wasserkreislauf aus diesem angeschlossen war. Die Präparate wurden behutsam mit zwei kleinen Metallhäkchen befestigt und in das vorbereitete Organbad eingehängt. Die Kontraktionskraft des Präparats wurde über einen Kraftmesser, der am oberen Haken befestigt war, mit Hilfe eines Brückenverstärkers an einen Digitalisierer (PowerLab-System) und Computer weitergeleitet.

Für die elektrische Stimulation der linken Vorhofpräparate wurden in jedem Organbad zwei Reizelektroden verwendet, die sich neben den Vorhöfen befanden, ohne diese direkt zu berühren (Feldstimulation). Die Elektroden stimulierten die Vorhofpräparate mit einer Frequenz von 1 Hz und Rechteckimpulsen mit einer Dauer von 5 ms. Die angelegte Spannung lag dabei ca. 10-20% über der minimalen Reizschwelle. Die linken Vorhöfe wurden zur Messung der Kontraktionskraft genutzt. Die rechten Vorhofpräparate kontrahierten spontan bei intaktem Sinusknoten und unbeschädigtem Reizleitungssystem und mussten nicht elektrisch gereizt werden. Die Messung der spontanen Schlagfrequenz wurde an diesen Vorhofpräparaten durchgeführt.

Zur Kalibrierung des Systems musste zunächst ein Nullpunkt festgelegt werden. Mittels eines Gewichts von 500 mg wurde eine Kraft von 5 mN erzeugt und der entsprechende Spannungswert in der LabChart-Software eingetragen (2-Punkt-Kalibration). Dadurch wurde es möglich, die Übertragung und Korrelation der Zugkraft der Vorhofpräparate auf eine definierte Kraft zu erreichen.

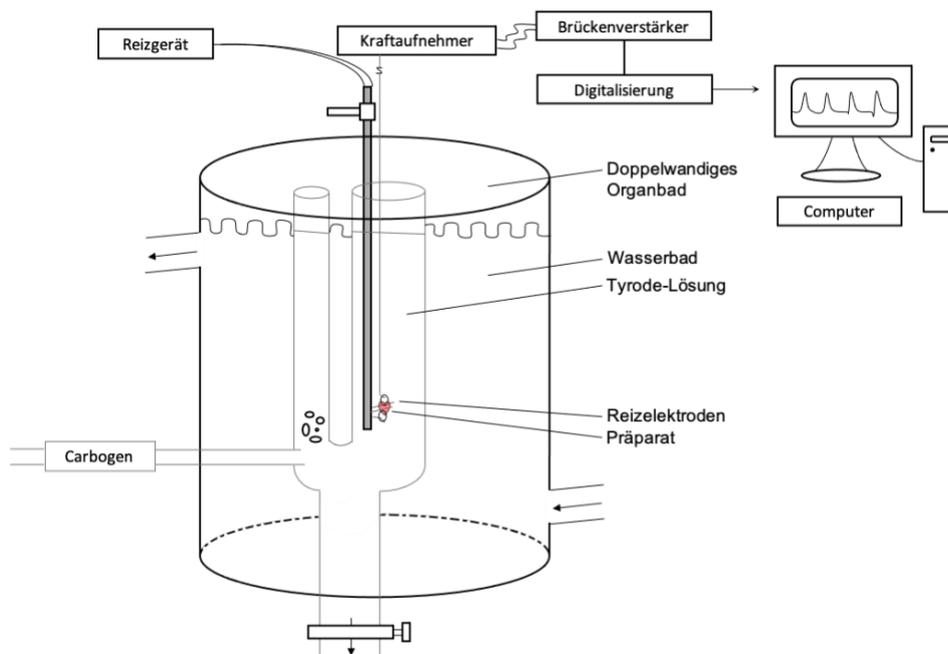


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung für isometrische Kontraktionskraftmessungen.

In der Abbildung ist das doppelwandige Organbad mit einem aufgehängten Präparat dargestellt, welches sich zwischen den beiden Reizelektroden befindet. Außerdem sind das Reizgerät, der Kraftaufnehmer, der Brückenverstärker und der Computer, der die Kontraktionen und Schlagfrequenzen des Muskels als Mechanogramm erfasst, abgebildet. Mittels des in der Doppelwand des Organbades befindlichen Wassermantels wird die Tyrode-Lösung auf der entsprechenden Temperatur gehalten und zudem mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begast.

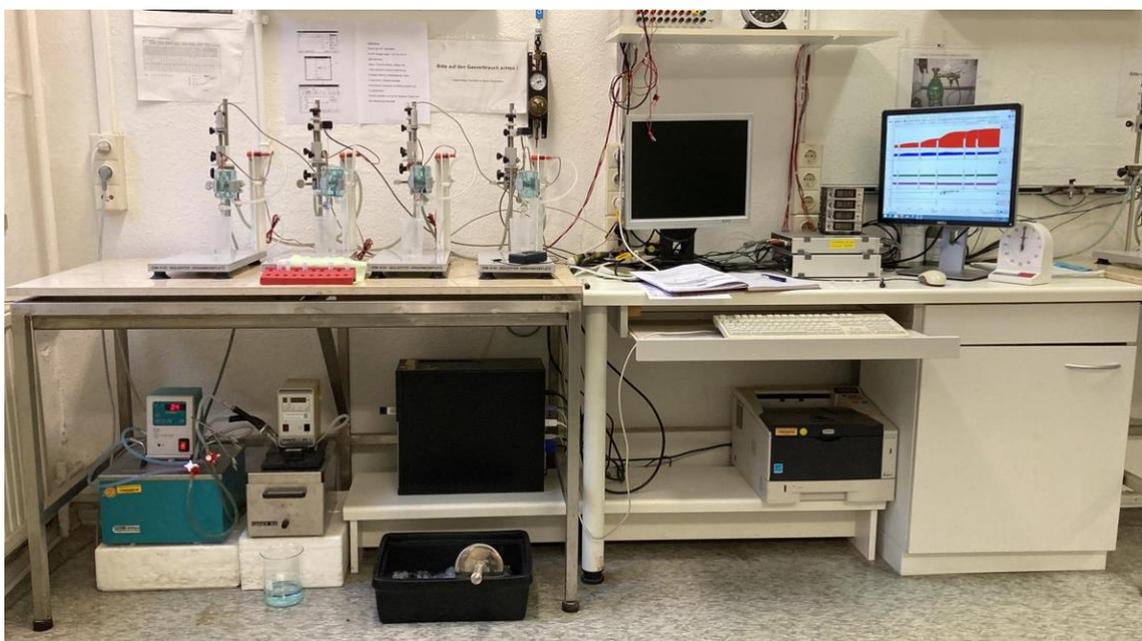


Abbildung 4: Bild der Versuchsanordnung für isometrische Kontraktionsmessungen

3.4.3. Organentnahme

Die Mäuse hatten bis unmittelbar vor der Präparation Zugang zu Futter und Wasser und mussten für die Versuche nicht nüchtern bleiben. Zunächst wurde das Gewicht der Maus ermittelt, um die Dosis des Narkotikums zu errechnen und zu dokumentieren. Um eine Thrombusbildung im Herzen der Maus zu vermeiden, wurde den Mäusen zusammen mit der Narkotisierung 500 I.E. Heparin (siehe Anhang) intraperitoneal injiziert.

Den Mäusen wurde vor der Präparation eine Überdosis Pentobarbital (50-75 mg/kg Körpergewicht) (siehe Anhang) intraperitoneal injiziert, um eine tiefe Bewusstlosigkeit herbeizuführen. Dadurch konnte eine schmerzbedingte Katecholamin-Ausschüttung vermieden und die Oxygenierung des Herzmuskels gewährleistet werden, da es nicht zum unmittelbaren Atemstillstand kam.

Sobald die Bewusstlosigkeit eingetreten war, wurden die Extremitäten der Mäuse in einer Präparationsschale fixiert. Durch einen vertikalen Schnitt im Abdominalbereich mit einer Schere wurde das Fell und die Haut bis zum Beginn des Sternums entfernt. Anschließend wurden Pleura und Peritoneum durch zwei weitere Schnitte entlang der Rippenbögen eröffnet. Um eine freie Sicht auf das Präparationsgebiet des Herzens zu erhalten, wurde Sternum, welches mit den abgetrennten Rippen an einer Klemme fixiert war, nach kranial geklappt. Nach der Darstellung der Vena cava und des Aortenbogens wurden diese durchtrennt und das Herz konnte aus dem Thorax entnommen werden. Der Herzmuskel wurde unmittelbar danach in ein bereitgestelltes Gefäß mit raumtemperierter Tyrode-Lösung gelegt, um eine Zeitüberbrückung zwischen Entnahme und weiterer Präparation zu erreichen. Im Herzen verbliebene Blutreste wurden durch vorsichtige Kompressionen aus dem noch schlagenden Herzen gepumpt.

3.4.4 Präparation des Herzens

Nach der Entnahme wurden die isolierten Mäuseherzen in eine mit Tyrode-Lösung gefüllten und mit Carbogen begasten Präparationsschale gelegt. Anschließend wurden sie mit einer Nadel an der Herzspitze fixiert und das überschüssige Lungengewebe sowie die Reste der angrenzenden großen

Blutgefäße entfernt. Der linke Vorhof wurde dargestellt, abgetrennt und am unteren und oberen Pol des Präparates jeweils ein Metallhaken durch das Muskelgewebe, längs zur Muskelfiederung, gestochen. Die Muskelpräparate wurden mithilfe der Metallhaken in die Versuchsanordnung eingehängt und unmittelbar danach in das mit Tyrode-Lösung gefüllte Organbad getaucht. Nun wurde das Reizgerät für das einzelne Organbad eingeschaltet, um den linken Vorhof elektrisch zu stimulieren und die Kontraktionskraft aufzuzeichnen, wie in 3.5.2 beschrieben.

Der rechte Vorhof wurde direkt im Anschluss präpariert. Zunächst wurde dieser dargestellt und gegebenenfalls noch übriggebliebenes Gewebe entfernt. Anschließend wurde der rechte Vorhof unter Schonung des Sinusknotens von den Ventrikeln abgetrennt. Der Sinusknoten befindet sich im Bereich der Mündung der Vena cava superior und durfte nicht beschädigt werden. Das Vorhofpräparat wurde mithilfe von zwei Metallhaken in die Versuchsanordnung eingehängt. Beide Vorhofpräparate wurden bis zur maximalen Kraftentwicklung vorgespannt, sodass kein weiterer Kraftanstieg möglich war.

In den ersten 30 Minuten nach dem Einhängen der Präparate wurde die Tyrode-Lösung dreimal gewechselt. Diese Phase wird als Äquilibrierphase bezeichnet und diente dazu, Blutreste und Signalmoleküle zu entfernen, um ein Gleichgewicht in der Kontraktionskraft der Vorhofpräparate herzustellen. Währenddessen konnten die Muskelpräparate noch auf ihre muskelspezifische Maximalkraft nachgespannt werden.

Bei korrekter Präparation enthielten die rechten Vorhofpräparate den intakten Sinusknoten. Somit konnte hier die Schlagfrequenz der spontan schlagenden Vorhöfe gemessen werden.

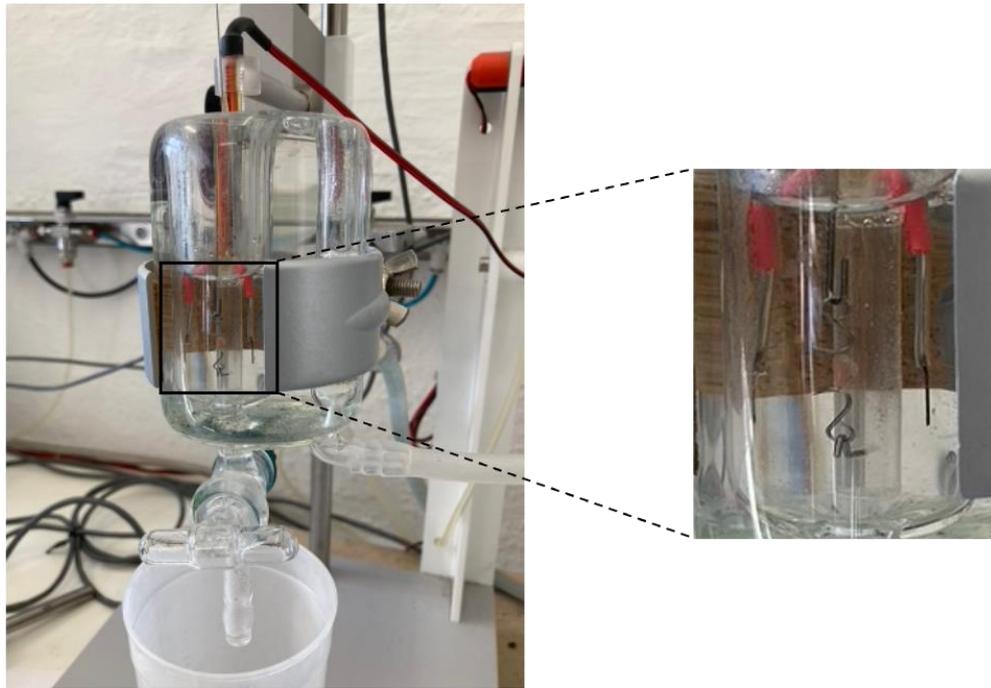


Abbildung 5: Detailaufnahme eines eingehängten Mausvorhofes

3.4.5 Menschliche Vorhofpräparate

Durch eine bestehende Kooperation mit der Herz-Chirurgie des Universitätsklinikums Halle (Saale) (Az. hm-bü 04.08.2005) war es möglich, einige Versuche ($n=10$, $N=3$) ebenfalls an Präparaten des menschlichen rechten Vorhofes durchzuführen. „ n “ steht hier für die Zahl der Versuche, „ N “ für die Zahl der Patienten. Ein kleines Gewebestück von circa 1 cm^2 Fläche wurde zum Anschluss der Herz-Lungen-Maschine bei Bypass-Operationen vom menschlichen rechten Herzohr entfernt. Das Präparat wurde danach in das Institut für Pharmakologie transportiert. Die wichtigsten Patientendaten sind im Anhang in Form einer tabellarischen Darstellung (Tabelle 3) zu finden.

Einzelne Trabekel von circa 5 mm Länge wurden von dem Präparat, das sich in einer Präparierschale mit Tyrode-Lösung befand, abgetrennt. Zwei Metallhaken wurden in das Muskelgewebe eingeführt und die Trabekel in das Organbad eingehängt. Die Vorbereitungsschritte erfolgten wie zuvor bei den Mauspräparaten beschrieben. Im Organbad wurden alle Präparate mit einer Frequenz von 1 Hz und Rechteckimpulsen von 5 ms Dauer gereizt, da sie weder einen intakten Sinusknoten noch andere Schrittmacherzellen enthielten.

3.4.6 Versuchsdurchführung

Versuchsdurchführung Maus

Sowohl die Präparation als auch der Versuchsbeginn waren für alle Präparate identisch. Innerhalb der ersten 30 Minuten nach dem Einhängen und Nachspannen der Präparate erfolgte im Abstand von zehn Minuten ein dreimaliger Badwechsel mit frischer Tyrode-Lösung. Während dieser Phase wurde eine stabile Ausgangslage für die Schlagkraft und Schlagfrequenz geschaffen. Anschließend begann der Versuchsablauf (vgl. Abbildung 6). Es wurde zuerst die Kontraktionskraft und Schlagfrequenz bei den unterschiedlichen Temperaturen von 37°C, 23°C und 42°C kontrolliert. Danach erfolgte die erste Gabe von 10^{-8} Histamin (siehe Anhang). Nach Zugabe einer Substanz wurde immer mindestens fünf Minuten oder bis zum Erreichen eines Plateaus abgewartet, da die volle Entwicklung der inotropen und chronotropen Effekte Zeit in Anspruch nimmt. Als nächstes wurde die Histamin-Konzentrationswirkungskurve (Histamin-KWK) bis zur Endkonzentration von 10^{-5} in Dreierschritten (10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , usw.) durchgeführt. Nach jeder Histamin-KWK wurde immer ein dreimaliger Badwechsel bei 37°C durchgeführt, um sowohl die Schlagfrequenz als auch die Kontraktionskraft durch das Ausspülen des applizierten Histamins wieder auf die Ausgangslage zu normalisieren. Nach der Durchführung der Histamin-KWKs bei den unterschiedlichen Temperaturen von 37°C, 23°C und 42°C wurden drei unterschiedliche Wege eingeschlagen. Einige Präparate wurden erneut auf 42°C erhitzt und anschließend mit der höchsten Konzentration von 10^{-5} M Histamin versetzt. Nach Erreichen des Plateaus wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren, um sie für die Western Blots zu nutzen. Bei einem weiteren Teil wurde die Temperatur von 37°C beibehalten und der gleiche Ablauf wie bei 42°C durchgeführt. Die übrigen Proben durchliefen denselben Ablauf bei 23°C. Der Versuchsablauf ist zur Veranschaulichung in Abbildung 6 dargestellt.

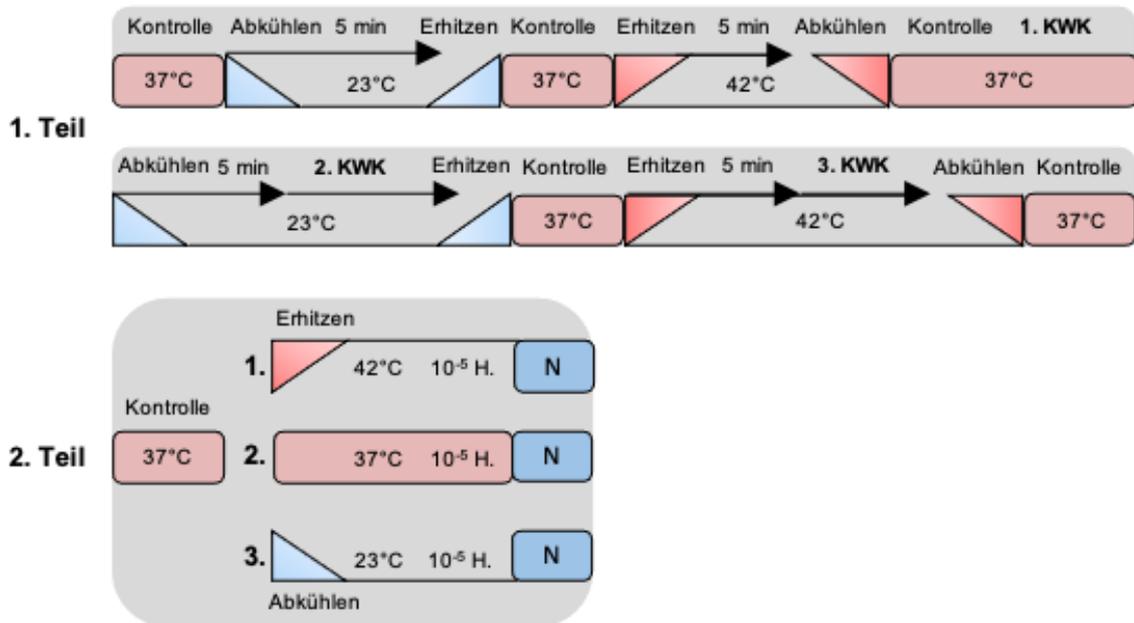


Abbildung 6: Versuchsprotokoll

Die Versuche waren in zwei Teile aufgeteilt. Kontrolle steht in diesem Zusammenhang für den wie oben beschriebenen dreifachen Badwechsel. Während der 1. Teil mit allen Präparaten durchgeführt werden konnte, wurden die Präparate im 2. Teil in drei Gruppen aufgeteilt und am jeweiligen Versuchsende mit flüssigem Stickstoff (N) schockgefroren, um Proben für die biochemische Analyse zu gewinnen. H. steht für Histamin und KWK für die Konzentrationswirkungskurve.

Versuchsdurchführung Mensch

Die menschlichen Trabekel wurden genauso wie die Mauspräparate eingehängt, vorgespannt und für eine stabile Ausgangslage vor dem Versuchsbeginn ein dreimaliger Badwechsel vorgenommen. Die Versuche wurden nach demselben Schema wie die Mausversuche durchgeführt. Nach jeder Substanzgabe wurde ebenfalls mindestens fünf Minuten gewartet, um die volle inotrope Wirkung zu erzielen. Der einzige Unterschied bestand in einer höheren Endkonzentration von 10^{-4} M Histamin, da bei 10^{-5} M Histamin noch kein Plateau erreicht werden konnte.

3.5 Westernblot

Zur Detektion verschiedener Proteine wurde die Westernblot-Analyse an Maus- und Menschherzgewebeproben durchgeführt. Dabei wurden insbesondere Phospholamban und HSP70 untersucht, aber auch Phospholemman. Die

Analyse wurde gemäß Gergs et al. (2010) durchgeführt. Die Herzgewebeproben wurden unter Zugabe von 100 µl SDS-Homogenisierungspuffer (siehe Anhang) mit einem Mikrodismembrator (2100 rpm) unter flüssigem Stickstoff pulverisiert. Nach Auftauen der Probe wurde die Homogenisierung mit einem Ultraschall-Homogenisator (30 sek. auf Eis) fortgesetzt. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (30 Minuten, 14000 rpm) entfernt. Die Bestimmung der Proteinmenge in den Homogenaten erfolgte entsprechend der Methode von Lowry (Lowry et al., 1951) in einem Photometer (Biophotometer, Eppendorf) bei einer Wellenlänge von 595 nm. Eine Standardkurve wurde mit Rinderserumalbumin erstellt (0 µg/ml bis 100 µg/ml), um so die Proteinkonzentration der jeweiligen Proben zu bestimmen. Für alle Messpunkte wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Für die Auftrennung nach Proteingröße wurde eine Elektrophorese in SDS-Polyacrylamidgelen durchgeführt. Hierbei wurden Novex™ 4–12% “Tris–Glycine Plus Midi Protein Gele” (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) verwendet und in einer XCell4 SureLock™ Midi-Gelelektrophoreseapparatur (Life Technologies by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) eingesetzt. Als Beladungskontrolle diente der Nachweis von Calsequestrin (CSQ, 55kDa). Zur Identifikation der Phospholamban-Bande wurde eine gekochte Probe aufgetragen. In ungekochten Herzproben läuft Phospholamban als Pentamer bei ca. 27 kDa. Nach Erhitzen der Probe zerfällt es zum Monomer, was bei ca. 12 kDa nachweisbar ist (Abella et al., 2022). Als nächstes wurden die Proteine mithilfe eines Elektrotransfers (Towbin et al. 1979) auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham Protran, 0,45 µm Porengröße, GE Healthcare, Chicago, IL, USA) übertragen und immobilisiert. Die freien Bindungsstellen wurden mit Milchpulver oder Bovinem Serumalbumin (BSA) in Tri-buffered saline with Tween20 (TBST-Puffer) blockiert. Durch Auftragen verschiedener Antikörper, darunter anti serine 16-phosphorylated phospholamban (1:5000; Katalognummer: A010-12AP; PLB Ser16; Badrilla, Leeds, UK), anti HSP70 (1:5000; Katalognummer: I0995-I-AP; proteintech) und anti calsequestrin (1:20000; Katalognummer: ab3516, abcam, Cambridge, UK), wurden die Zielproteine detektiert. Mittels eines Sekundärantikörpers, Antirabbit IgG-Horse-Radish-Peroxidase (1:10000; Katalognummer: A0545-1ML; Sigma-

Aldrich), wurden die Banden mittels Chemolumineszenz detektierbar gemacht (Chemiluminescent HRP Substrate; Katalognummer: WBKLS0500; EMD Millipore Corporation). Die Signalerfassung und Datenerhebung erfolgte mit einem ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare, München, Deutschland) und der ImageQuant-Software (GE Healthcare, München, Deutschland).

3.6 Statistische Auswertung

Für die Auswertung wurden die Computerprogramme Microsoft Excel und GraphPad Prism 5.0 für Windows (Prism 5, GraphPad Software, La Jolia, CA, USA) verwendet. Es wurden arithmetische Mittelwerte sowie der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) berechnet. Der Student T-Test bzw. eine Varianzanalyse (ANOVA) wurden zur statistischen Analyse für verbundene und unverbundene Stichproben durchgeführt. Zusätzlich wurde noch der χ^2 -Test genutzt, um einen Teil der Arrhythmien zu analysieren. Es wurden p-Werte kleiner als 0,05 als signifikant gewertet. Des Weiteren wurden die EC_{50} -Werte der Kraft-Wirkungskurven ermittelt, wobei pEC_{50} der negative dekadische Logarithmus des EC_{50} -Wertes war. Die Anzahl der Einzelversuche wird im Folgenden als „n“ bezeichnet. Zur Verdeutlichung der Auswertung der Kontraktionsversuche ist in Abbildung 7 eine Einzelkontraktion und deren Auswertung schematisch dargestellt. Im oberen Bereich ist eine Einzelkontraktion dargestellt. Die entwickelte Kraft wird in Abhängigkeit von der Zeit angegeben. Die Anspannungszeit (t_1) ist die Zeit, in der der Muskel während der Systole kontrahiert. Sie entspricht der Zeit von der Grundlinie bis zum Peak-Maximum während einer einzelnen Kontraktion. In der Relaxationszeit (t_2) erschlafft der Herzmuskel während der Diastole. Dies ist die Zeit vom Peak-Maximum bis zur Grundlinie während einer einzelnen Kontraktion. Wenn man die Kraft nach der Zeit (dF/dt) ableitet, erhält man die untere Grafik. Diese zeigt die maximale (dF/dt_{max}) und minimale (dF/dt_{min}) Kontraktionsgeschwindigkeit, welche in der unteren Kurve als Maximum bzw. Minimum sichtbar sind.

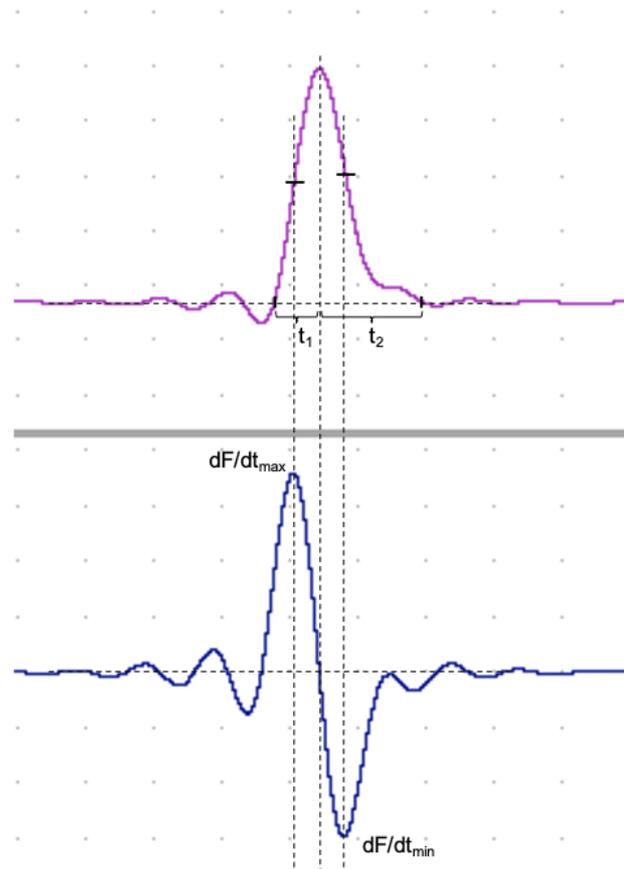


Abbildung 7: Einzelkontraktion am Vorhof

Schematisch dargestellt ist im oberen Bereich eine Einzelkontraktion und im unteren Bereich die erste Ableitung dieser Einzelkontraktion (dF/dt) aus einem repräsentativen Mechanogramm. Oben ist die Anspannungszeit (t_1) und die Relaxationszeit (t_2) markiert. Unten können die maximale (dF/dt_{\max}) und die minimale (dF/dt_{\min}) Kontraktionsgeschwindigkeit der Einzelkontraktion aus der Grafik abgeleitet werden. Die gestrichelte horizontale Linie stellt die jeweilige Nulllinie dar.

4. Ergebnisse

4.1 Genotypisierung der H₂-TG Mäuse

Die Größe der PCR-Produkte wurde mithilfe der Agarosegel-Elektrophorese bestimmt. Dabei wandern kleine Moleküle schneller im elektrischen Feld als große Moleküle. Hierfür wurden interkalierende DNA-Farbstoffe und UV-Licht genutzt. Ein zusätzlicher Größenstandard sowie eine Positiv- und Negativkontrolle wurden zur Bestimmung der Fragment-Größe verwendet. Die Proben wurden zuvor mit 8 µl Ladepuffer versehen und in 1%-igen Agarosegelen aufgetrennt. Das Agarosegel wurde als nächstes für etwa 45 Minuten einer Spannung von 80 mV ausgesetzt. Das Ergebnis der Genotypisierung wurde mittels iNtRON RedSafe™-Färbung unter UV-Licht sichtbar gemacht und in Form von sichtbaren DNA-Banden dargestellt (Abbildung 8).

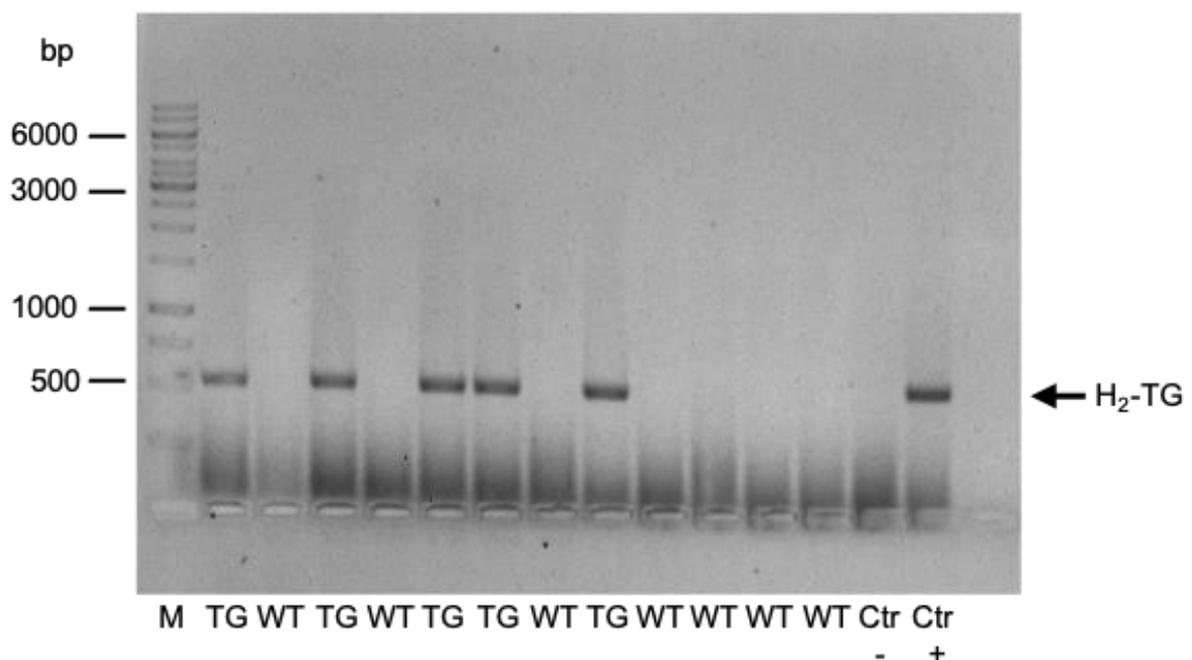


Abbildung 8: Genotypisierung der H₂-transgenen Mäuse.

Dargestellt ist das Ergebnis einer PCR zur Bestimmung der H₂-transgenen Mäuse. Es wurde der Marker (M) GeneRuler™ 1kb DNA Leiter, Thermo Scientific™ benutzt. Auf der linken Seite ist die Beschriftung des Markers in Basenpaaren (bp) angegeben. Des Weiteren sind unten die H₂-transgenen Mäuse (TG) und die Wildtyp Mäuse (WT) sowie eine positive und negative Kontrolle (Ctr) gezeigt.

4.2 Kontraktionsversuche an menschlichen Vorhofpräparaten

4.2.1 Kontraktionskraft

In den menschlichen Vorhofpräparaten war der positiv inotrope Effekt von Histamin zeit- und konzentrationsabhängig. Abbildung 9 zeigt ein original Mechanogramm der Versuchsreihen bei 37 °C, 23 °C und 42 °C.

Vor Beginn der Versuche lag die basale Kraft der Vorhofpräparate (n=10) bei $0,87 \pm 0,25$ mN (37°C), $0,36 \pm 0,13$ mN (23°C) und $0,72 \pm 0,20$ mN (42°C) bei einer Vorspannung von 5 mN und einer elektrischen Reizung von 1 Hz. Die Präparate reagierten im Laufe der Konzentrations-Wirkungs-Kurve (KWK) von Histamin (10 nM – 100 µM) mit einer steigenden Kontraktionskraft.

Histamin war bei 37°C potenter und effektiver in Bezug auf den Anstieg der Kontraktionskraft im Vergleich zu 23°C oder 42°C (Abbildung 10). Ab einer Konzentration von 3 µM Histamin war ein signifikanter Anstieg der Kontraktionskraft ($p < 0,05$) zu erkennen, der eine Kraft von $1,21 \pm 0,39$ mN gegenüber der Ausgangslage erreichte. Eine Hypothermie von 42°C reduzierte die Wirkung von Histamin auf die Kontraktionskraft am stärksten. Hier wurde ein signifikanter Anstieg erst bei 30 µM Histamin bei einer Kraft von $1,49 \pm 0,49$ mN erreicht. Bei Hypothermie wurde ein signifikanter Anstieg ab einer Konzentration 10 µM Histamin bei einer Kraft von $0,33 \pm 0,09$ mN im Vergleich zur Ausgangslage erreicht (Abbildung 10).

Die maximale Kontraktionskraft war bei einer Temperatur von 37°C am höchsten ($4,76 \pm 0,87$ mN) im Vergleich zu 23°C ($1,10 \pm 0,24$ mN) und 42°C ($2,66 \pm 0,60$ mN).

Wenn man die Kontraktionskraft nun in Bezug auf die Ausgangslage norminiert und die maximale Kraft als 100% setzt, kann man eine Rechtsverschiebung der Kurven von 23°C und 42°C erkennen. Das bedeutet, dass Histamin bei 37°C den potentesten positiv inotropen Effekt aufweist (Abbildung 11).

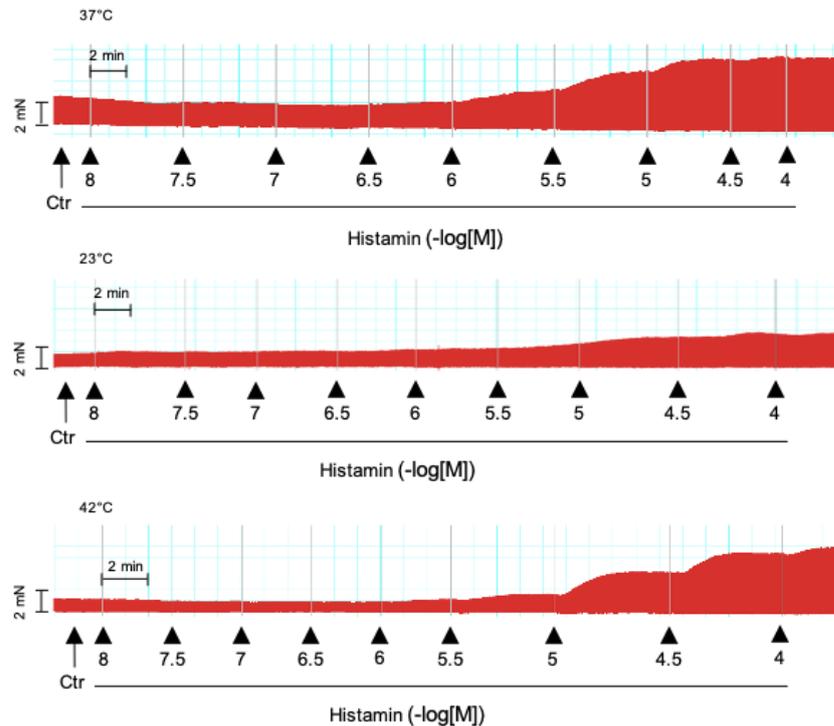


Abbildung 9: Mechanogramm der KWK im Menschlichen Vorhof

Die Abbildung zeigt drei Mechanogramme der Kontraktionskraft in Abhängigkeit von der Konzentration von Histamin und der Zeit. Das obere Mechanogramm zeigt den Verlauf bei 37°C, das mittlere bei 23°C und das untere bei 42°C.

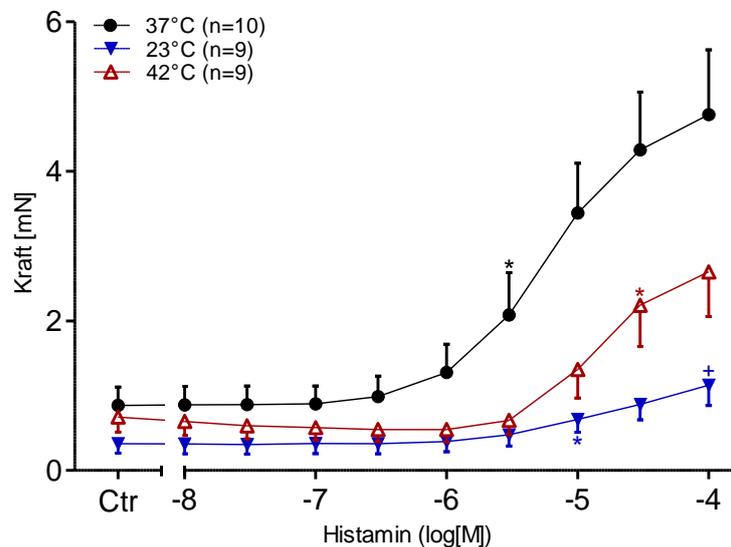


Abbildung 10: Kontraktionskraft am menschlichen Vorhof

In der Abbildung wird die Histamin-KWK an elektrisch gereizten menschlichen Vorhofpräparaten dargestellt. Die Kontraktionskraft ist in mN angegeben. „n“ steht für die Anzahl der Experimente. *: p < 0.05 vs. Ctr., +: p < 0.05 vs. 37°C ANOVA Dunnett

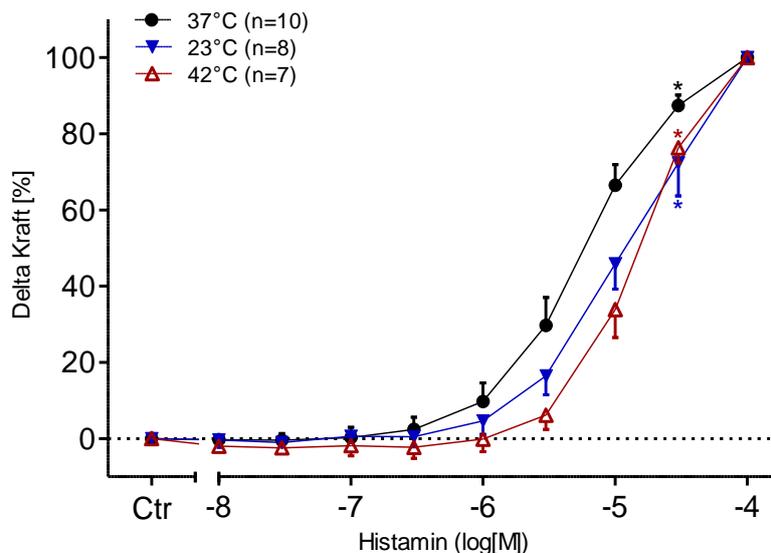


Abbildung 11: Kontraktionskraft am menschlichen Vorhof

In der Abbildung wird die KWK von Histamin an elektrisch gereizten menschlichen Vorhofpräparaten bei 37°C, 23°C und 42°C dargestellt. Die Kontraktionskraft ist zunächst auf die Kontrolle (Ctr) normiert worden und wurde dann in % des Maximums dargestellt. „n“ steht für die Anzahl der Experimente. *: $p < 0.05$ vs. Ctr

4.2.2 Anspannungs-, Relaxationsszeit und Kontraktionsgeschwindigkeit

Die Anspannungszeit der menschlichen Vorhofpräparate variierte lediglich mit einer Veränderung der Temperatur. Die Basalzeit unter Hypothermie war signifikant länger ($127 \pm 19,8$ ms, $n = 9$) als bei Normothermie ($66,2 \pm 11,5$ ms) und bei Hyperthermie ($47,1 \pm 5,36$ ms). Es ist keine Verkürzung der Anspannungszeit mit aufsteigender Histamin-Konzentration zu erkennen (Abbildung 12).

Die Relaxationszeit ist ebenfalls bei 23°C deutlich verlängert ($311 \pm 26,9$ ms) als bei 37°C ($145 \pm 14,5$ ms) und bei 42°C ($125 \pm 10,5$ ms). Während der KWK mit Histamin verkürzt sich die Relaxationszeit auf $252 \pm 32,0$ ms bei 23°C, $89,3 \pm 5,49$ ms bei 37°C und $86,7 \pm 10,6$ ms bei 42°C. Lediglich bei 37°C und 42°C trat eine Signifikanz ($p < 0,05$) ab einer Konzentration von $0,3 \mu\text{M}$ Histamin auf. Ein signifikanter Unterschied zwischen 23°C und 37°C sowie zwischen 42°C und 23°C konnte mit einem ANOVA Test nach Dunnet festgestellt werden (Abbildung 13).

Betrachtet man die maximale (max) und minimale (min) Kontraktionsgeschwindigkeit, ist unter Normthermie eine Steigerung dieser unter Einfluss von Histamin im Vergleich zur Ausgangslage zu erkennen (Abbildung 14). Vor der Zugabe von Histamin betrug die maximale Geschwindigkeit $15,5 \pm 4,6$ mN/s und die minimale $-9,05 \pm 2,73$ mN/s. Nach der kumulativen Gabe von Histamin stieg die maximale Geschwindigkeit auf $88,6 \pm 5,49$ mN/s und die minimale auf $-59,5 \pm 10,78$ mN/s. Unter Hyper- (max: $15,0 \pm 3,92$ mN/s und $55,0 \pm 11,6$ mN/s; min: $-8,34 \pm 2,21$ mN/s und $-42,0 \pm 9,99$ mN/s) und Hypothermie (max: $3,18 \pm 0,93$ mN/s und $10,2 \pm 2,39$ mN/s; min: $-2,17 \pm 0,54$ mN/s und $-6,88 \pm 1,56$ mN/s) war die Steigerung der maximalen und minimalen Kontraktionsgeschwindigkeit geringer.

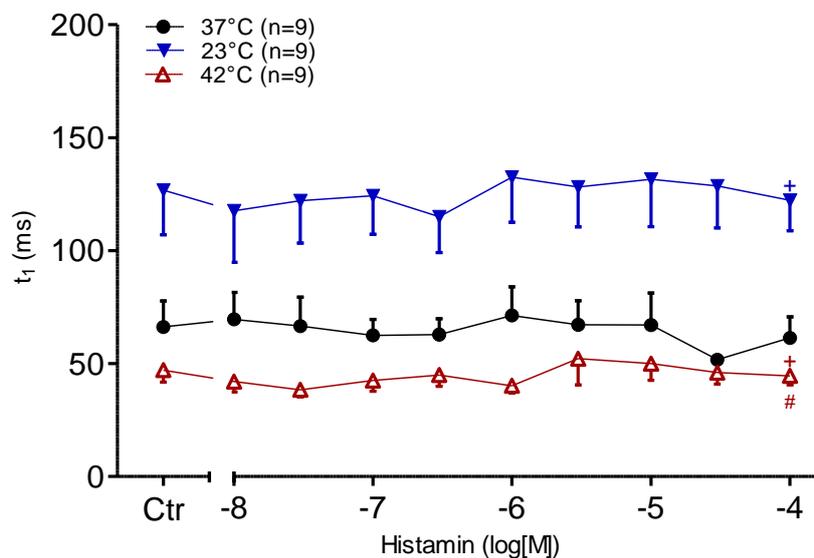


Abbildung 12: Anspannungszeit am menschlichen Vorhof

In der Abbildung wird die KWK von Histamin an elektrisch gereizten menschlichen Vorhofpräparaten dargestellt. Die Anspannungszeit der Temperaturen 23°C, 37°C und 42°C ist in ms dargestellt. „n“ steht für die Anzahl der Experimente. +: $p < 0.05$ vs 37°C ANOVA Dunnet, #: $p < 0.05$ vs 23°C ANOVA Dunnet

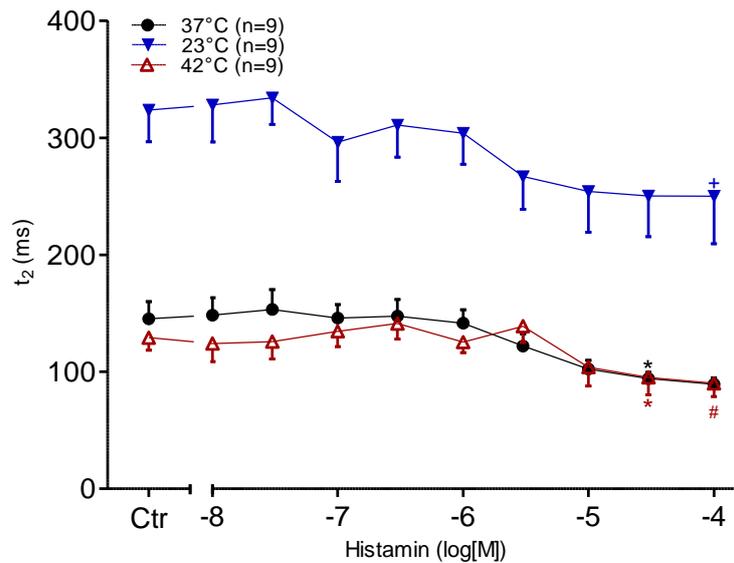


Abbildung 13: Relaxationszeit am menschlichen Vorhof

In der Abbildung wird die KWK von Histamin an elektrisch gereizten menschlichen Vorhofpräparaten dargestellt. Die maximale und minimale Erschlaffungsgeschwindigkeit der Temperaturen 23°C, 37°C und 42°C ist in ms dargestellt. „n“ steht für die Anzahl der Experimente. *: $p < 0.05$ vs. Ctr., +: $p < 0.05$ vs 37°C ANOVA Dunnet, #: $p < 0.05$ vs 23°C ANOVA Dunnet

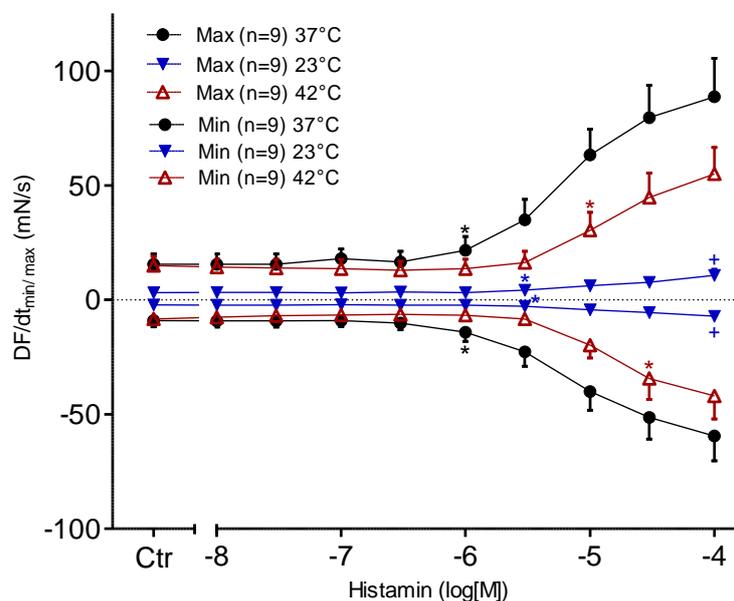


Abbildung 14: Kontraktionsgeschwindigkeit am menschlichen Vorhof

In der Abbildung werden die Maxima bzw. Minima der ersten Ableitung der Kraft nach der Zeit (dF/dt max und min) für die KWK von Histamin an elektrisch gereizten menschlichen Vorhofpräparaten dargestellt. Die maximalen Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten der Temperaturen 23°C, 37°C und 42°C sind in mN/s dargestellt. *: $p < 0.05$ vs. Ctr., +: $p < 0.05$ vs 37°C ANOVA Dunnet

4.3 Kontraktionsversuche am Vorhof der Maus

4.3.1 Kontraktionsversuche am linken Vorhof

Die Versuche am linken Vorhof einer transgenen Maus mit kardialer Expression des menschlichen H₂-Rezeptors, wie in Abbildung 8 dargestellt, wurden als Modell für den Effekt von Histamin am menschlichen Vorhof durchgeführt. Im Original-Mechanogramm ist bei den transgenen Mäusen (H₂-TG) wie beim Menschen ein zeit- und konzentrationsabhängiger positiv inotroper Effekt von Histamin zu erkennen (Abbildung 15). Die Wildtyp Mäuse (WT) zeigten keine Reaktion auf Histamin. Bereits anhand der Mechanogramme in Abbildung 15 ist erkennbar, dass der inotrope Effekt von Histamin bei den Vorhöfen der H₂-TG Maus früher einsetzt als beim Menschen, also bei niedrigeren Konzentrationen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Dichte des H₂-Rezeptors im Vorhof der H₂-TG Maus deutlich höher ist als beim menschlichen Vorhof (Neumann et al. 2021). Bisher konnte die genaue Dichte der Rezeptoren nicht eindeutig bestimmt werden, da alle bisher getesteten kommerziellen Antikörper sich als unspezifisch erwiesen haben.

Die basale Kontraktionskraft der H₂-TG Mäuse war unter Normothermie höher ($2,18 \pm 0,30$ mN) als bei Hypothermie ($0,94 \pm 0,28$ mN) oder Hyperthermie ($1,31 \pm 0,21$ mN). Dieser Unterschied zeigte sich nicht bei WT Mäusen. Die Ausgangskraft von WT Mäusen war bei 37°C ($2,74 \pm 0,35$ mN) ähnlich hoch wie bei 23°C ($2,58 \pm 0,44$ mN) oder 42°C ($2,25 \pm 0,31$ mN). Der erste signifikante Anstieg der Kontraktionskraft der H₂-TG Mäuse trat bei 37°C und 23°C bei einer Histaminkonzentration von 0,01 µM auf und bei 42°C bei 0,03 µM. Bei einer Endkonzentration von 10 µM Histamin wurde eine maximale Kraft von $9,28 \pm 0,58$ mN unter Normothermie erreicht. Diese war signifikant höher als bei Hyperthermie ($4,49 \pm 0,42$ mN) und Hypothermie ($8,05 \pm 0,54$ mN) (Abbildung 16). Um die Potenz von Histamin bei den unterschiedlichen Temperaturen vergleichen zu können, wurden die EC₅₀-Werte berechnet. Diese sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Wie bei den menschlichen Proben, zeigte sich auch bei den H₂-TG Mäusen sowie bei den WT Mäusen eine signifikant längere basale Anspannungszeit

unter Hypothermie (H_2 -TG: $38,4 \pm 0,82$ ms; WT: $39,4 \pm 0,70$ ms) als bei Normo- (H_2 -TG: $20,4 \pm 0,22$ ms; WT: $20,7 \pm 0,23$ ms) und Hyperthermie (H_2 -TG: $18,5 \pm 0,16$ ms; WT: $19,0 \pm 0,13$ ms). Die erste signifikante Verkürzung der Anspannungszeit unter Einfluss von Histamin trat ab einer Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ auf. Jedoch war dies nur unter Hypothermie der Fall, sowohl bei den H_2 -TG Mäusen als auch bei den WT Mäusen. Hier wurde eine Zeit von $32,4 \pm 0,32$ ms bei TG und $37,3 \pm 0,64$ ms bei WT Mäusen erreicht. Bei Normothermie und Hyperthermie konnte sowohl bei H_2 -TG Mäusen als auch bei WT Mäusen während der Histamin-KWK keine Verkürzung gemessen werden (Abbildung 17).

Wie auch bei den menschlichen Vorhofproben zeigte sich eine deutliche Verlängerung der Relaxationszeit bei 23°C (H_2 -TG: $63,0 \pm 3,04$ ms; WT: $85,5 \pm 4,39$ ms) im Vergleich zu 37°C (H_2 -TG: $23,1 \pm 0,78$ ms; WT: $24,1 \pm 0,63$ ms) und 42°C (H_2 -TG: $19,7 \pm 0,80$ ms; WT: $20,2 \pm 0,33$ ms). Hier kam es nur bei den WT Mäusen unter Hypothermie zu einer signifikanten Verkürzung der Erschlaffungszeit ab einer Konzentration von $0,01 \mu\text{M}$ Histamin auf (WT: $67,2 \pm 2,94$ ms) (Abbildung 18).

Auch bei der maximalen und minimalen Kontraktionsgeschwindigkeit zeigt sich, dass Histamin bei WT-Mäusen keinen Einfluss hat (Abbildung 20), während bei H_2 -TG-Mäusen eine deutliche Steigerung der maximalen und minimalen Geschwindigkeit beobachtet werden konnte (Abbildung 19). Bei 37°C fiel der Effekt von Histamin wie bei den menschlichen Vorhöfen am Größten aus (max: 574 ± 192 mN/s; min: $-354 \pm 19,6$ mN/s). Bei 23°C (max: $227 \pm 13,8$ mN/s; min: $-128 \pm 7,59$ mN/s) und 42°C (max: $202 \pm 19,6$ mN/s; min: $-198 \pm 18,7$ mN/s) hingegen konnte ein geringerer Anstieg der Kontraktionsgeschwindigkeit gemessen werden.

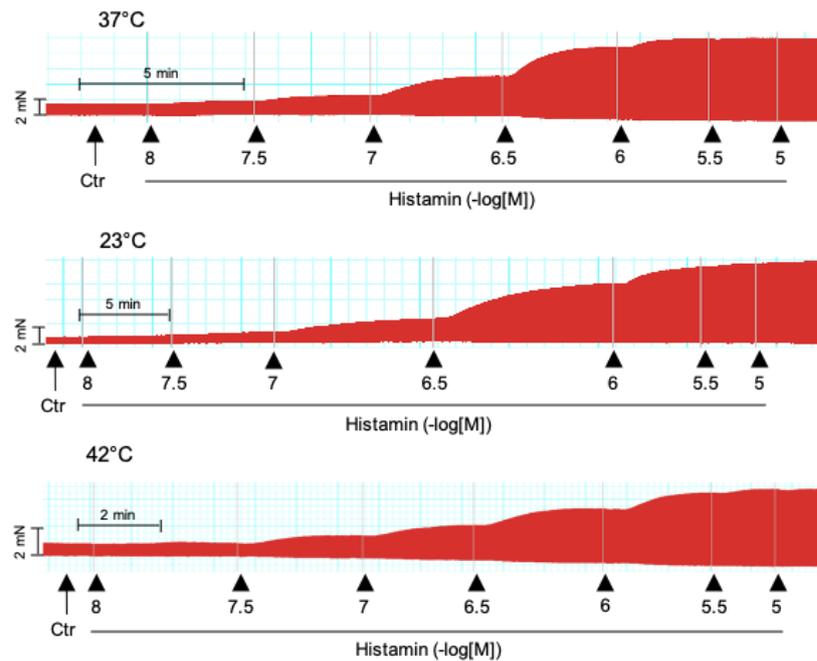


Abbildung 15: Mechanogramme der KWK von Histamin im linken Vorhof der Maus

Die Abbildung zeigt drei Mechanogramme der Kontraktionskraft in Abhängigkeit von der Konzentration von Histamin und der Zeit. Das obere Mechanogramm zeigt den Verlauf bei 37°C, das mittlere bei 23°C und das untere bei 42°C.

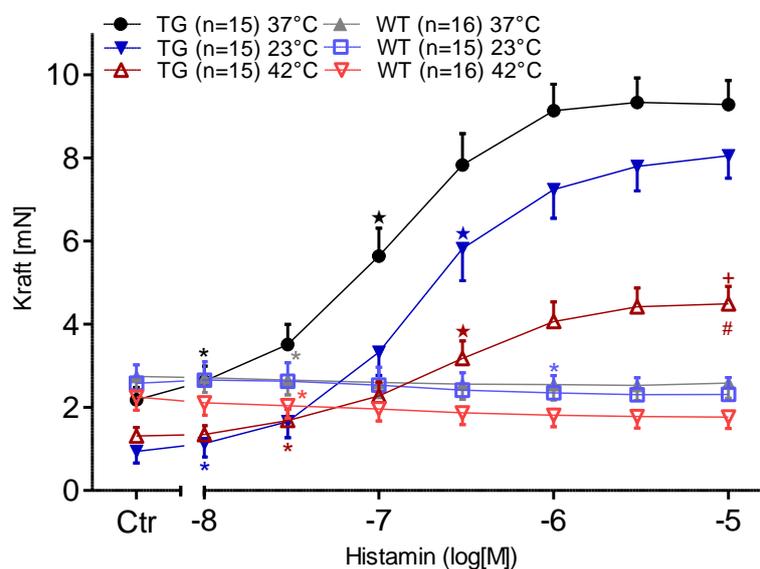


Abbildung 16: Kontraktionskraft am linken Vorhof der Maus

In der Abbildung wird die KWK von Histamin an elektrisch gereizten linken Vorhofpräparaten von H₂-TG und WT dargestellt. Die Kontraktionskraft ist in mN angegeben. „n“ steht für die Anzahl der Experimente. *: p<0.05 vs. Ctr., ★: p<0.05 vs. 37°C ANOVA Dunnet, #: p<0.05 vs. 23°C ANOVA Dunnet

Tabelle 1: EC50-Werte des positiv inotropen und chronotropen Effekts am Vorhof der Maus

Vergleich des halbmaximalen positiv inotropen und chronotropen Effekts von Histamin in isolierten rechten und linken Vorhöfen der H₂-transgenen Mäuse. Die EC₅₀-Werte sind als dekadischer Logarithmus dargestellt.

Temperatur	Linker Vorhof Kraft	Rechter Vorhof Schlagfrequenz	Rechter Vorhof Kraft
37 °C	- 7.0 ± 0.1	- 7.1 ± 0.1	- 7.2 ± 0.3
23 °C	- 6.7 ± 0.1 *	- 7.2 ± 0.1	- 7.4 ± 0.1
42 °C	- 6.6 ± 0.1 *	- 7.1 ± 0.2	- 6.9 ± 0.3

*: p<0.05 vs. 37°C

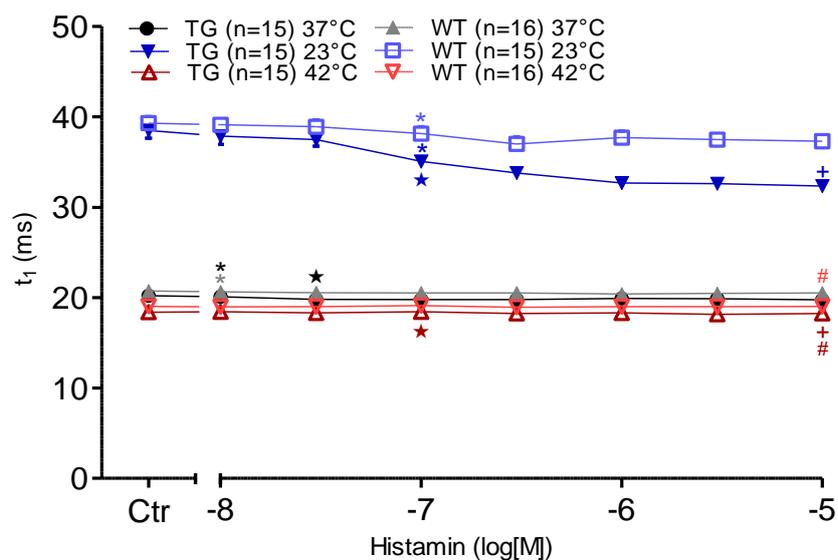


Abbildung 17: Anspannungszeit am linken Mausvorhof

In der Abbildung wird die KWK von Histamin an elektrisch gereizten linken Vorhofpräparaten der Maus dargestellt. Die Anspannungszeit der Temperaturen 23°C, 37°C und 42°C ist in ms dargestellt. „n“ steht für die Anzahl der Experimente. *: p<0.05 vs. Ctr., ★: vs. WT, +: p<0.05 vs. 37°C ANOVA Dunnet, #: p<0.05 vs. 23°C ANOVA Dunnet

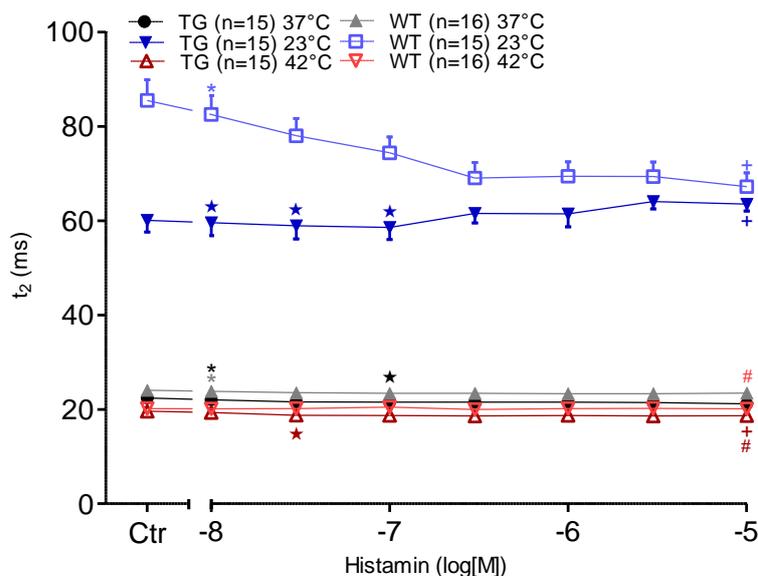


Abbildung 18: Relaxationszeit am linken Mausvorhof

In der Abbildung wird die KWK von Histamin an elektrisch gereizten linken Vorhofpräparaten der Maus dargestellt. Die Erschlaffungszeit der Temperaturen 23°C, 37°C und 42°C ist in ms dargestellt. „n“ steht für die Anzahl der Experimente. *: $p < 0.05$ vs. Ctr., ★: vs. WT, +: $p < 0.05$ vs. 37°C ANOVA Dunnet, #: $p < 0.05$ vs. 23°C ANOVA Dunnet

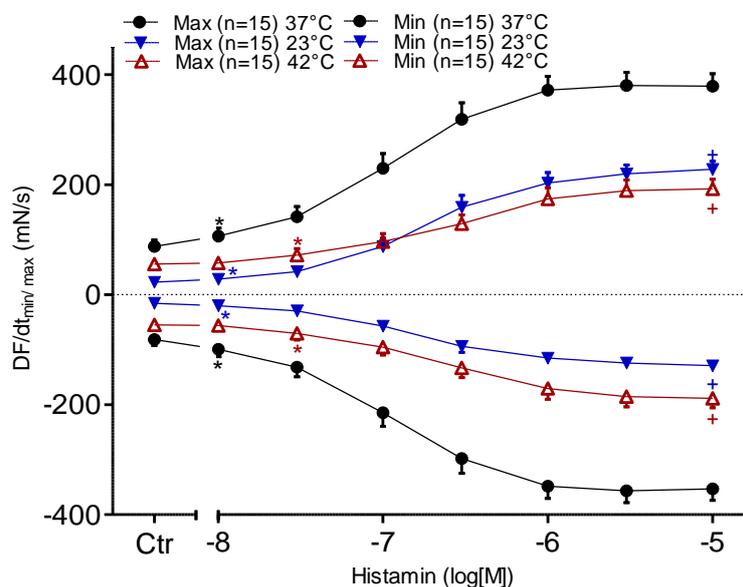


Abbildung 19: Kontraktionsgeschwindigkeit am linken Mausvorhof der H₂-TG Mäuse

In der Abbildung wird die KWK von Histamin an elektrisch gereizten linken H₂-TG Vorhofpräparaten dargestellt. Die maximalen Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten der Temperaturen 23°C, 37°C und 42°C sind in mN/s dargestellt. „n“ steht für die Anzahl der Experimente. *: $p < 0.05$ vs. Ctr, +: $p < 0.05$ vs. 37°C ANOVA Dunnet

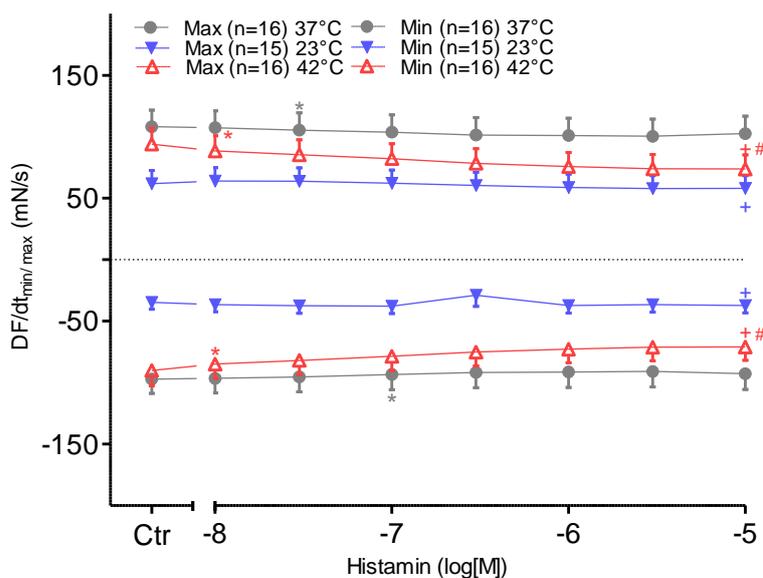


Abbildung 20: Kontraktionsgeschwindigkeit am linken Mausvorhof der WT Mäuse

In der Abbildung wird die KWK von Histamin an elektrisch gereizten linken WT Vorhofpräparaten dargestellt. Die maximalen Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten der Temperaturen 23°C, 37°C und 42°C sind in mN/s dargestellt. „n“ steht für die Anzahl der Experimente. *: $p < 0.05$ vs. Ctr, #: $p < 0.05$ vs. 37°C ANOVA Dunnet, #: $p < 0.05$ vs. 23°C ANOVA Dunnet

4.3.2 Kontraktions- und Frequenzversuche am rechten Vorhof

Im rechten Vorhof der Maus wurde nicht nur die Frequenz der spontan schlagenden Vorhofpräparate untersucht, sondern auch Daten zur Kontraktionskraft, Anspannungs- und Relaxationszeit sowie zur maximalen und minimalen Relaxationsgeschwindigkeit erhoben, um einen Vergleich zum linken Vorhof herzustellen.

Abbildung 21 zeigt die originalen Mechanogramme der Frequenz der H₂-TG Mäuse. Die Frequenz der rechten Vorhofpräparate war unter basalen Bedingungen bei Hyperthermie (H₂-TG: $534 \pm 32,1$ bpm; WT: $419 \pm 23,7$ bpm) deutlich höher als bei Normothermie (H₂-TG: $454 \pm 22,2$ bpm; WT: $359 \pm 19,3$ bpm) (Abbildung 22). Unter Hypothermie (H₂-TG: $120 \pm 10,4$ bpm; WT: $57 \pm 7,4$ bpm) sank die basale Frequenz nochmals stark ab. Im Verlauf der Histamin-KWK zeigte sich eine signifikante Steigerung der Frequenz bei allen Temperaturen der H₂-TG Mäuse ab einer Konzentration von 0,03 μ M Histamin

(37°C) sowie 0,1 µM Histamin (23°C, 42°C). Am Ende der KWK wurde eine Frequenz von $614 \pm 25,7$ bpm bei 37°C, $226 \pm 2,95$ bpm bei 23°C und $662 \pm 28,8$ bpm bei 42°C erreicht. Die EC₅₀-Werte zeigten keine Unterschiede in der Potenz von Histamin zur Steigerung der Schlagfrequenz bei den unterschiedlichen Temperaturen (Tabelle 1). Die WT Mäuse zeigten bis zum Erreichen höherer Konzentrationen keinerlei Reaktion auf das Histamin. Eine signifikante Steigerung der Schlagfrequenz zeigte sich erst bei einer Konzentration von 1 µM Histamin (37°C), 0,1 µM Histamin (23°C) sowie 3 µM Histamin (42°C).

Die Kontraktionskraft im rechten Vorhof der H₂-TG Mäuse stieg lediglich unter Hypothermie im Verlauf der Histamin-KWK (Abbildung 23). Bei H₂-TG war die basale Kontraktionskraft unter Normothermie höher ($0,96 \pm 0,13$ mN) als bei Hypothermie ($0,67 \pm 0,11$ mN) und Hyperthermie ($0,67 \pm 0,08$ mN). Jedoch zeigte sich nur ein schwacher Anstieg der Kraft bei 37°C und 42°C. Bei 23°C stieg die Kontraktionskraft auf $3,19 \pm 0,23$ mN in der Endkonzentration und der erste signifikante Anstieg war bereits ab 0,01 µM Histamin zu erkennen. Bei den WT Mäusen zeigte sich wie im linken Vorhof keine Reaktion auf Histamin im Verlauf der KWK. In Tabelle 1 sind die EC₅₀-Werte für die Potenz von Histamin bei den unterschiedlichen Temperaturen dargestellt. Es wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt.

Ähnlich wie beim linken Vorhof war ebenfalls die basale Anspannungszeit beim rechten Vorhof unter Hypothermie (H₂-TG: $38,4 \pm 0,82$ ms; WT: $39,1 \pm 1,35$ ms) deutlich länger als unter Normo- (H₂-TG: $20,4 \pm 0,40$ ms; WT: $19,5 \pm 0,59$ ms) oder Hyperthermie (H₂-TG: $21,1 \pm 0,72$ ms; WT: $19,2 \pm 0,57$ ms) (Abbildung 24). Im Verlauf der Histamin-KWK zeigte sich bei 23°C eine Verkürzung der Anspannungszeit auf $30,5 \pm 0,30$ ms (H₂-TG) bzw. $36,2 \pm 0,82$ ms (WT). Bei den H₂-TG Mäusen trat die erste signifikante Verkürzung bei 0,01 µM Histamin auf, während bei den WT Mäusen dies bei 3 µM der Fall war. Weder bei 37°C noch bei 42°C konnte eine signifikante Veränderung der Anspannungszeit bei den H₂-TG Mäusen und bei den WT Mäusen gemessen werden.

Die basale Relaxationszeit im rechten Vorhof der H₂-TG Mäuse und der WT Mäuse war ebenfalls unter Hypothermie (H₂-TG: $80,6 \pm 3,57$ ms; WT: $98,3 \pm$

3,99 ms) deutlich verlängert im Gegensatz zur Normo- (H_2 -TG: $23,1 \pm 0,54$ ms; WT: $23,3 \pm 0,33$ ms) und Hyperthermie (H_2 -TG: $22,0 \pm 0,80$ ms; WT: $21,4 \pm 0,43$ ms) – wie im linken Vorhof der Maus (Abbildung 25). Die erste signifikante Verkürzung der Erschlaffungszeit unter Hypothermie war bei H_2 -TG Mäusen ab $0,01 \mu\text{M}$ Histamin und bei WT Mäusen ab $3 \mu\text{M}$ Histamin zu erkennen. Bei der Endkonzentration betrug die Relaxationszeit $60,5 \pm 2,03$ ms (H_2 -TG) bzw. $77,2 \pm 4,41$ ms (WT).

Des Weiteren erhöhte Histamin im rechten Vorhof die maximale Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit bei den H_2 -TG Mäusen, jedoch hauptsächlich bei 23°C . Hier stieg die basale Geschwindigkeit (max: $17,0 \pm 3,13$ mN/s; min: $-10,3 \pm 1,9$ mN/s) signifikant an auf $94,8 \pm 7,06$ mN/s (max) bzw. $-56,9 \pm 4,23$ mN/s (min) bei einer Endkonzentration von $10 \mu\text{M}$ Histamin. Die erste signifikante Steigerung wurde bei $0,01 \mu\text{M}$ Histamin gemessen. Unter Normo- und Hyperthermie stieg die Kontraktionsgeschwindigkeit zunächst an und fiel anschließend wieder ab (Abbildung 26). Bei den rechten Vorhöfen der WT Mäuse zeigte sich wie schon zuvor kein Effekt durch Histamin auf die Kontraktionsgeschwindigkeit (Abbildung 27).

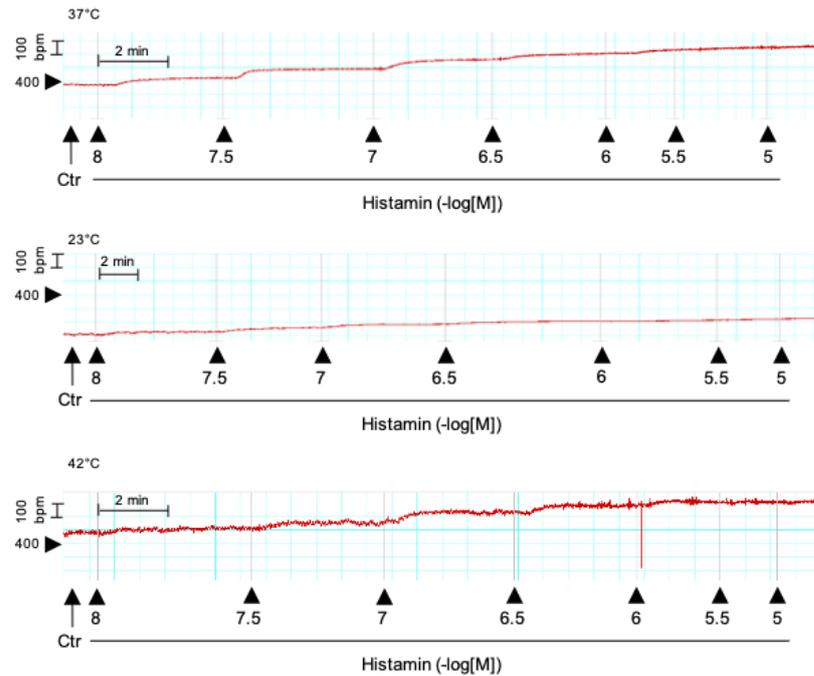


Abbildung 21: Mechanogramme der KWK im rechten Vorhof der H₂-TG Maus

Die Abbildung zeigt drei repräsentative Mechanogramme der Frequenz in Schlägen pro Minute (bpm) in Abhängigkeit von der Konzentration von Histamin und der Zeit. Das obere Mechanogramm zeigt den Verlauf bei 37°C, das mittlere bei 23°C und das untere bei 42°C.

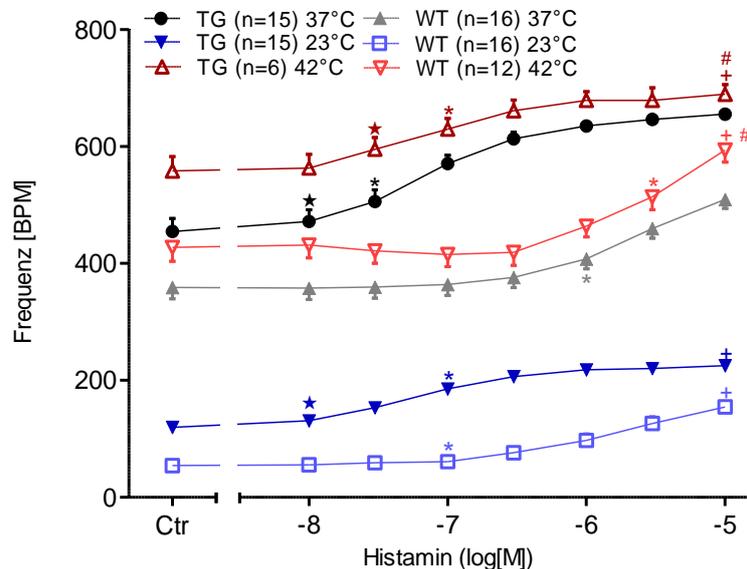


Abbildung 22: Frequenz am rechten Mausvorhof

In der Abbildung wird die KWK mit Histamin an spontan schlagenden rechten Vorhofpräparaten der Maus dargestellt. Die Frequenz der Temperaturen 23°C, 37°C und 42°C ist in bpm dargestellt. „n“ steht für die Anzahl der Experimente. *: p<0.05 vs. Ctr., ★: vs. WT, +: p<0.05 vs. 37°C ANOVA Dunnet, #: p<0.05 vs. 23°C ANOVA Dunnet

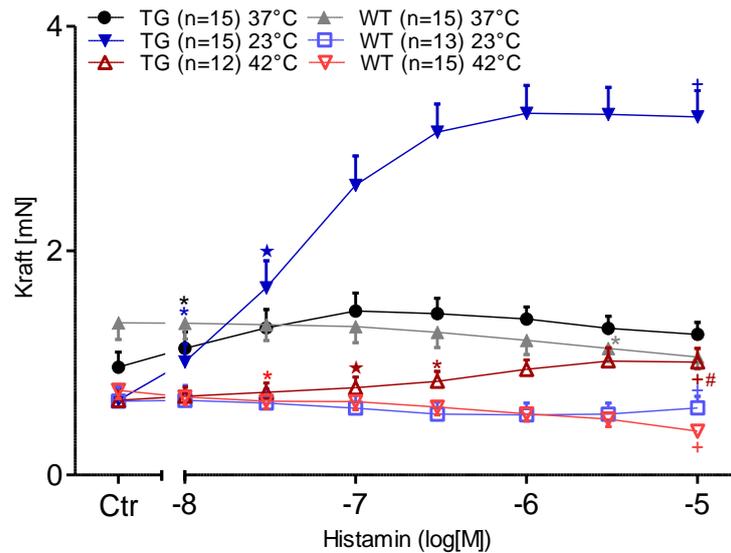


Abbildung 23: Kontraktionskraft am rechten Vorhof der Maus

In der Abbildung wird die KWK mit Histamin an spontan schlagenden rechten Vorhofpräparaten von H₂-TG und WT dargestellt. Die Kontraktionskraft ist in mN angegeben. „n“ steht für die Anzahl der Experimente. *: p<0.05 vs. Ctr., ★ : vs. WT, +: p<0.05 vs. 37°C ANOVA Dunnet, #: p<0.05 vs. 23°C ANOVA Dunnet

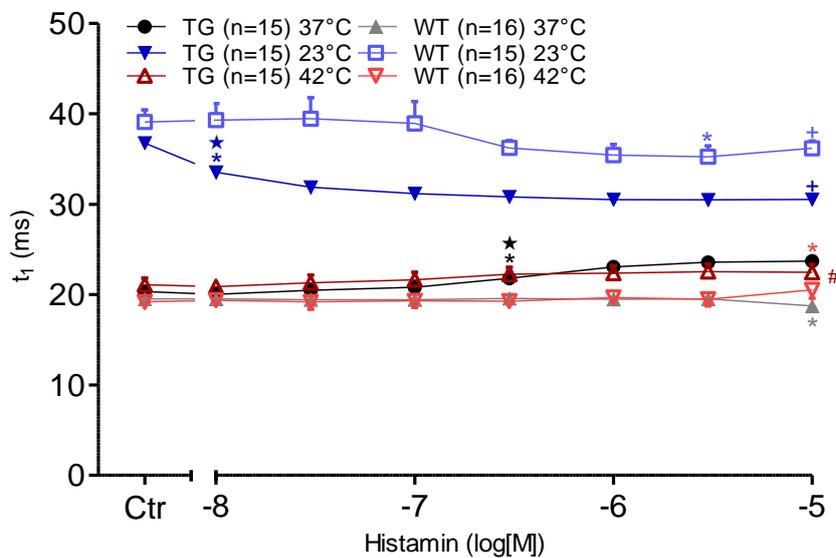


Abbildung 24: Anspannungszeit am rechten Mausvorhof

In der Abbildung wird die KWK mit Histamin an spontan schlagenden rechten Vorhofpräparaten von H₂-TG und WT dargestellt. Die Anspannungszeit der Temperaturen 23°C, 37°C und 42°C ist in ms dargestellt. „n“ steht für die Anzahl der Experimente. *: p<0.05 vs. Ctr., ★ : vs. WT, +: p<0.05 vs. 37°C ANOVA Dunnet, #: p<0.05 vs. 23°C ANOVA Dunnet

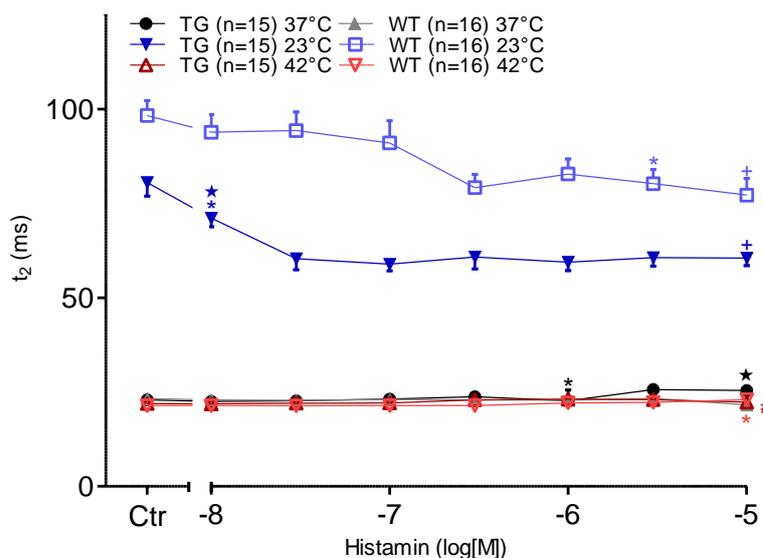


Abbildung 25: Relaxationszeit am rechten Mausvorhof

In der Abbildung wird die KWK mit Histamin an spontan schlagenden rechten Vorhofpräparaten von H₂-TG und WT dargestellt. Die Relaxationszeit der Temperaturen 23°C, 37°C und 42°C ist in ms dargestellt. „n“ steht für die Anzahl der Experimente. *: p<0.05 vs. Ctr., ★ : vs. WT, +: p<0.05 vs. 37°C ANOVA Dunnet, #: p<0.05 vs. 23°C ANOVA Dunnet

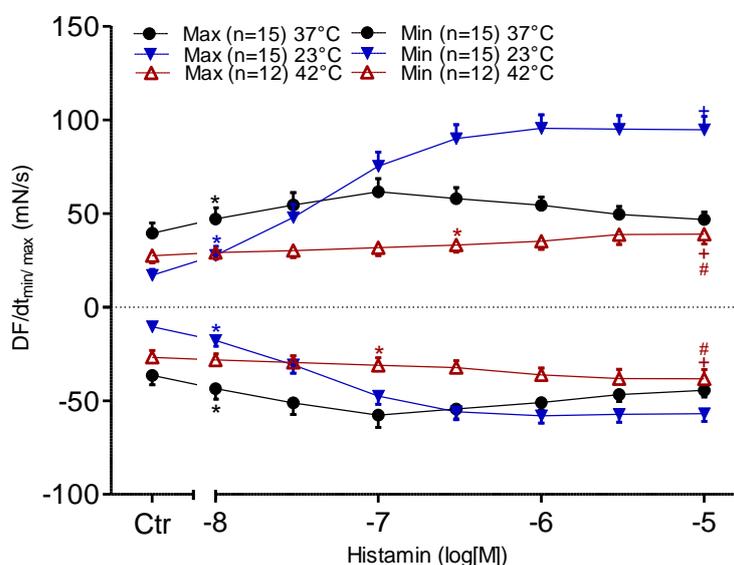


Abbildung 26: Kontraktionsgeschwindigkeit am rechten Mausvorhof der H₂-TG Mäuse

In der Abbildung wird die KWK mit Histamin an spontan schlagenden rechten H₂-TG Vorhofpräparaten dargestellt. Die maximalen Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten der Temperaturen 23°C, 37°C und 42°C sind in mN/s dargestellt. „n“ steht für die Anzahl der Experimente. *: p<0.05 vs. Ctr, +: p<0.05 vs. 37°C ANOVA Dunnet

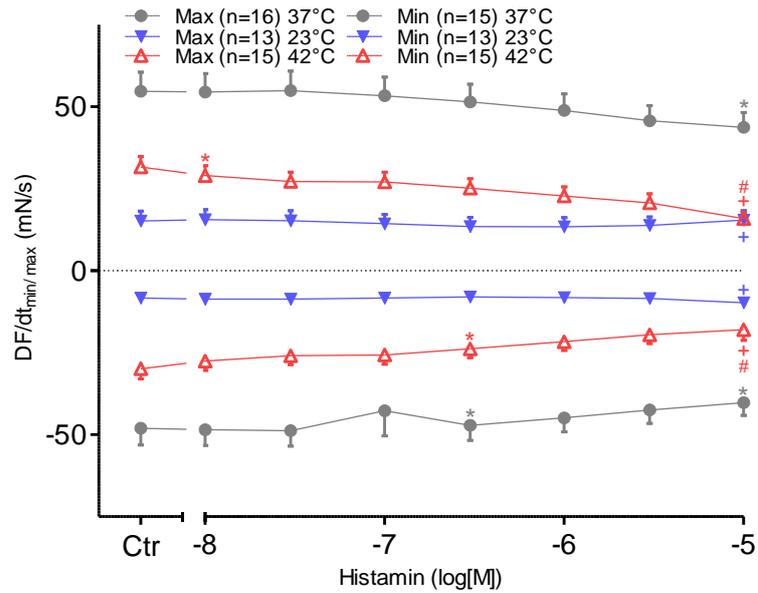


Abbildung 27: Kontraktionsgeschwindigkeit am linken Mausvorhof der WT Mäuse

In der Abbildung wird die KWK mit Histamin spontan schlagenden rechten WT Vorhofpräparaten dargestellt. Die maximalen Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten der Temperaturen 23°C, 37°C und 42°C sind in mN/s dargestellt. „n“ steht für die Anzahl der Experimente. *: $p < 0.05$ vs. Ctr, +: $p < 0.05$ vs. 37°C ANOVA Dunnet, #: $p < 0.05$ vs. 23°C ANOVA Dunnet

4.4 Proteinphosphorylierung

Es wurde untersucht, ob sich die Phosphorylierung von Phospholamban unter den Bedingungen einer Histamin-Gabe bei unterschiedlichen Temperaturen verändert. Die Quantifizierung der PLB-Phosphorylierung bei H₂-TG Mäusen und WT Mäusen ist in Abbildung 29 dargestellt. Histamin erhöhte die Phosphorylierung von Phospholamban an Serin 16 bei einer Konzentration von 10 µM Histamin in H₂-TG Mäusen. Es lässt sich vermuten, dass die durch Histamin bedingte Beschleunigung der Relaxation unter Hypothermie weniger potent ist als unter Normo- und Hyperthermie (vgl. Abbildung 19). Dieser Unterschied spiegelt sich in der geringeren Phosphorylierung von Phospholamban unter Hypothermie ($1,86 \pm 0,33$) im Vergleich zu Normo- ($2,7 \pm 0,18$) und Hyperthermie ($2,48 \pm 0,24$) wider ($p < 0,05$; $n=4-5$). Dies bestätigt die Beziehung zwischen der Phospholamban Phosphorylierung und der Beschleunigung der Relaxation (positiv lusitroper Effekt). In WT Mäusen wurde keine Erhöhung der Phosphorylierung von Phospholamban an Serin 16 festgestellt. Dies geht mit der Tatsache einher, dass Histamin weder einen inotropen noch einen lusitropen Effekt in WT-Mäusen zeigte.

In Abbildung 28 ist ein original Western Blot von H₂-TG- und WT-Proben gezeigt. Im oberen Bereich wurde die Calsequestrin-Expression (CSQ) (s. 3.6) bestimmt und zur Normierung der P-Serin16-PLB-Expression verwendet. Darunter sind die Banden von P-Serin16-Phospholamban zu sehen. Im Western Blot ist bereits zu erkennen, dass die Expression von P-Serin16-PLB bei den H₂-TG Mäusen deutlich stärker ausfällt als bei den WT Mäusen. Der Nachweis, dass die Banden tatsächlich PLB repräsentieren, ist in Abbildung 30 dargestellt: In den ersten beiden Spalten werden die Positivkontrollen gezeigt. Hier wurden Proben mit der maximal effektiven Dosis von Isoprenalin (1 µM) aufgetragen und die Probe aus der zweiten Spalte wurde vor dem Beladen des Gels bei 90°C gekocht. Dadurch sind sowohl die monomere als auch die pentamere Form von PLB erkennbar, wodurch man diese Banden dem Phospholamban zuordnen kann. Zusätzlich sind in dieser Abbildung die Proben der menschlichen rechten Vorhöfe dargestellt, welche ebenfalls die Expression von an Serin-16

phosphoryliertem Phospholamban unter den verschiedenen Temperaturen repräsentieren.

Anschließend wurde die Phosphorylierung von Phospholamban an Serin 16 in den menschlichen Vorhofpräparaten untersucht. Bei einer Histaminkonzentration von 100 μM stieg die Phosphorylierung von Phospholamban unter Hyperthermie ($0,03 \pm 0,01$) signifikant weniger an als unter Normo- ($0,31 \pm 0,03$) und Hypothermie ($0,31 \pm 0,06$) (Abbildung 31).

Des Weiteren wurde die Expression von HSP70 bei der Maus untersucht. Hierfür wurden die Proben der linken Vorhofpräparate untersucht. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Temperaturen und den WT Mäusen und H₂-TG Mäusen festgestellt werden. Die Westernblot-Banden wurden quantifiziert und die Expression von HSP70 auf die Expression von Calsequestrin normiert. Die Daten sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

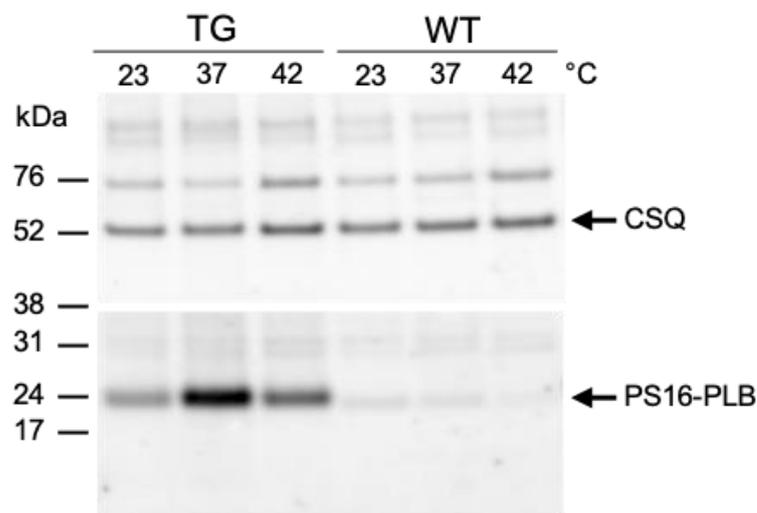


Abbildung 28: Western Blot von Proben der linken Mausvorhöfe

Der Molekulargewichtsstandard der Proben ist dargestellt in kDa auf der linken Seite. Auf der rechten Seite sind Calsequestrin (als Ladungskontrolle) und Phospho-Serin-16-Phospholamban (PS16-PLB) mittels Pfeilen gekennzeichnet. Zu sehen sind die Expressionen der H₂-TG und WT Proben bei 23°C, 37°C und 42°C.

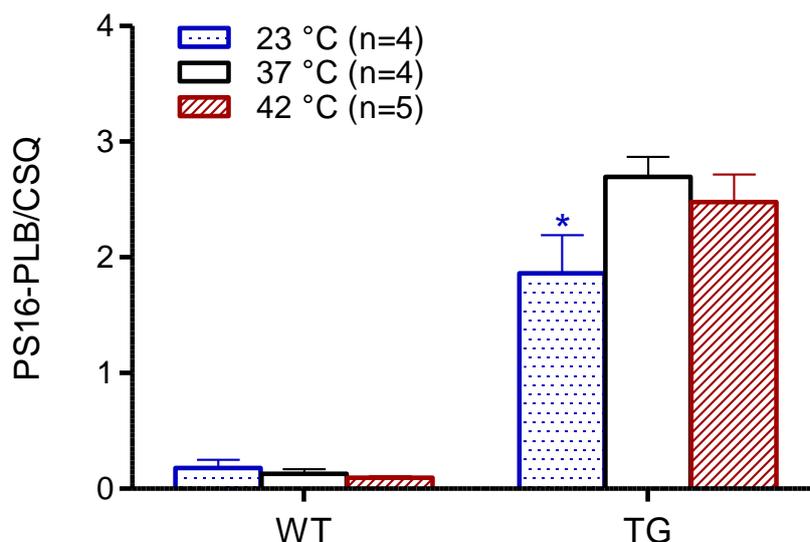


Abbildung 29: Phosphorylierungszustand von Serin-16 am linken Mausvorhof

Quantifizierung von Serin-16 im Verhältnis zur Calsequestrinexpression. Sowohl die Ergebnisse der WT Mäuse als auch die H₂-TG Mäuse sind abgebildet. Die Temperaturen des Organbades sind dargestellt als weiße Balken (37°C), gepunktete Balken (23°C) und gestrichelte Balken (42°C). „n“ steht für die Anzahl der Experimente. * p<0.05 vs. 37°C

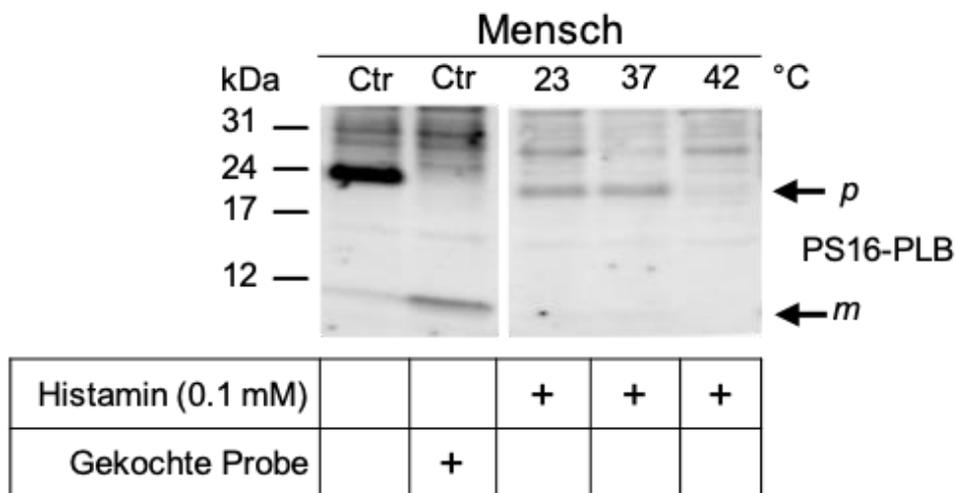


Abbildung 30: Western Blot von Proben der menschlichen Vorhofpräparate

Der Molekulargewichtsstandard ist dargestellt in kDa auf der linken Seite. Auf der rechten Seite ist die pentamere und monomere Form von P-Serin-16-PLB mittels Pfeilen gekennzeichnet. Zu sehen ist die Expression von P-Serin-16-PLB bei 23°C, 37°C und 42°C. Außerdem sind zwei Kontrollproben mit Isoprenalin behandelt dargestellt. Die erste Probe ist ungekocht, die zweite wurde bei 90°C gekocht, bevor sie auf das Gel appliziert wurde.

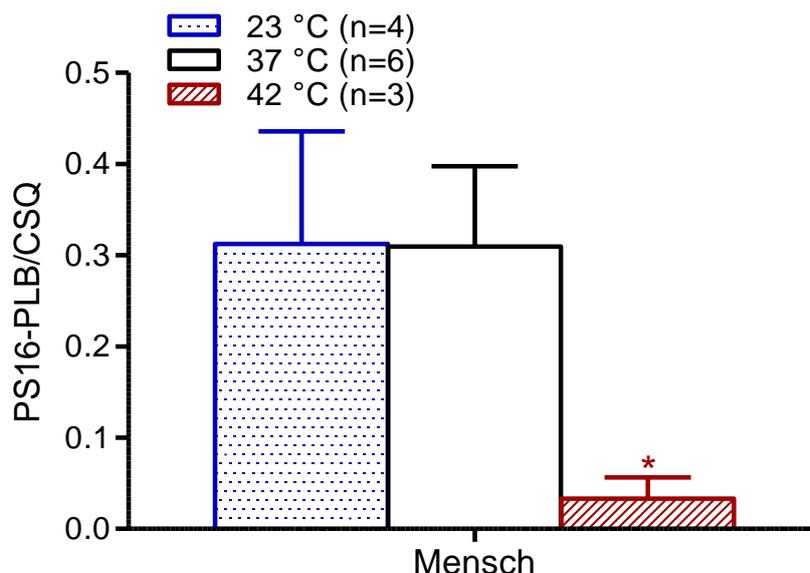


Abbildung 31: Phosphorylierung von Serin-16 am menschlichen Vorhof

Quantifizierung von P-Serin-16-PLB im Verhältnis zur Calsequestrinexpression. Die Temperaturen des Organbades sind dargestellt als weißer Balken (37°C), gepunkteter Balken (23°C) und gestrichelter Balken (42°C). „n“ steht für die Anzahl der Experimente. * $p < 0.05$ vs. 37°C

Tabelle 2: Expression von HSP70 am linken Vorhof der Mauspräparate

Quantifizierung von HSP70 im Verhältnis zur Calsequestrinexpression. Sowohl die WT als auch die H₂-TG Ergebnisse sind bei den unterschiedlichen Temperaturen dargestellt. SEM steht für die Standardabweichung.

	WT Vorhof 23°C	WT Vorhof 37°C	WT Vorhof 42°C	TG Vorhof 23°C	TG Vorhof 37°C	TG Vorhof 42°C
Mittelwert	0,70	0,78	0,93	0,53	0,61	0,77
SEM	± 0,19	± 0,12	± 0,09	± 0,17	± 0,03	± 0,10

4.5 Arrhythmien

Abschließend wurde der Frage nachgegangen, ob Histamin-bedingte Arrhythmien in den rechten Vorhöfen der WT Mäuse und H₂-TG Mäuse temperaturabhängig sind. Dabei wurden sowohl die Anzahl als auch die Dauer der Arrhythmien analysiert. Zur Veranschaulichung der entstandenen Arrhythmien ist in Abbildung 32 ein Ausschnitt eines Original-Mechanogramms einer Histamin-KWK im rechten Mäusevorhof bei 42°C dargestellt. Die Vergrößerungen unterhalb des roten Mechanogramms zeigen die Einzelkontraktionen in hoher zeitlicher Auflösung, um das Erkennen der Arrhythmien zu erleichtern. Die Herzrhythmusstörungen traten typischerweise kurz nach der Zugabe von Histamin auf und waren nach dem Abkühlen des Organbades auf 37°C reversibel. Die Arrhythmien wurden als solche gewertet, wenn sie unter basalen Bedingungen nicht vorhanden waren und erst nach der Zugabe von Histamin entstanden. Für die Analyse der Dauer der Arrhythmien wurde festgelegt, dass nur der Zeitraum ab der Histamingabe bis zum Auswaschen bzw. Umstellen der Temperatur gewertet wird. Die Analyse der Arrhythmien ergab, dass unter Hyperthermie die Dauer bei H₂-TG Mäusen (918 ± 198 min) signifikant höher als bei WT-Mäusen (186 ± 91,6 min) war (Abbildung 33). Bei Normo- und Hypothermie konnte kein signifikanter Unterschied zwischen H₂-TG Mäusen und WT Mäusen festgestellt werden. Die Dauer der Arrhythmien war unter Hypothermie (H₂-TG: 730 ± 199 min; WT: 710 ± 222 min) länger als bei Normothermie (H₂-TG: 239 ± 92,3 min; WT: 149 ± 81,1 min).

Weiterhin wurde die Anzahl der Arrhythmien in den Experimenten untersucht. Hierbei wurde lediglich nach dem Ja-Nein-Prinzip vorgegangen und die Daten mit einem χ^2 -Test analysiert. Unter Hyperthermie traten die Herzrhythmusstörungen bei H₂-TG-Mäusen signifikant öfter auf (ja: 15; nein: 1) als bei WT Mäusen (ja: 6; nein: 9). Die Daten sind in Abbildung 34 als Balkendiagramm dargestellt.

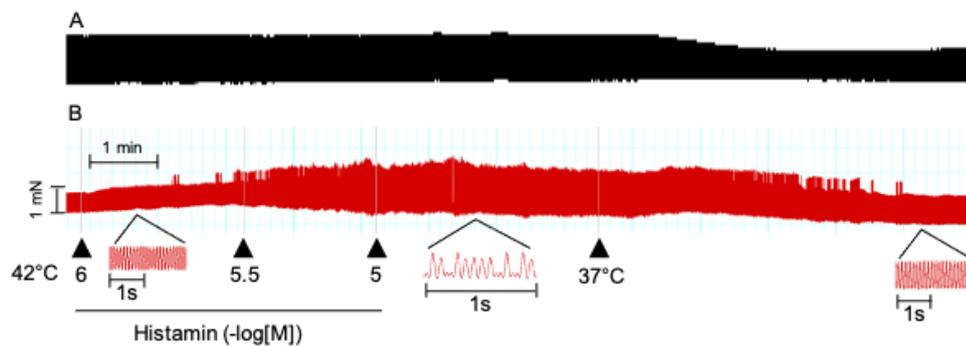


Abbildung 32: Mechanogramm am rechten Mausvorhof

Ausschnitt eines repräsentativen Mechanogramms des rechten Vorhofs einer WT Maus (schwarz) und einer H₂-TG Maus (rot) zur Verdeutlichung der Arrhythmien bei 42°C. Dargestellt ist das Ende einer Histamin-KWK, in der typischerweise die Arrhythmien auftraten. Unterhalb des roten Mechanogramms sind die Einzelkontraktionen in zeitlicher Vergrößerung gezeigt, um die Arrhythmien einfacher zu erkennen. Der Pfeil mit der Beschriftung 37°C stellt die Umstellung des Organbades auf diese Temperatur dar, ab der die Arrhythmien i.d.R. reversibel waren.

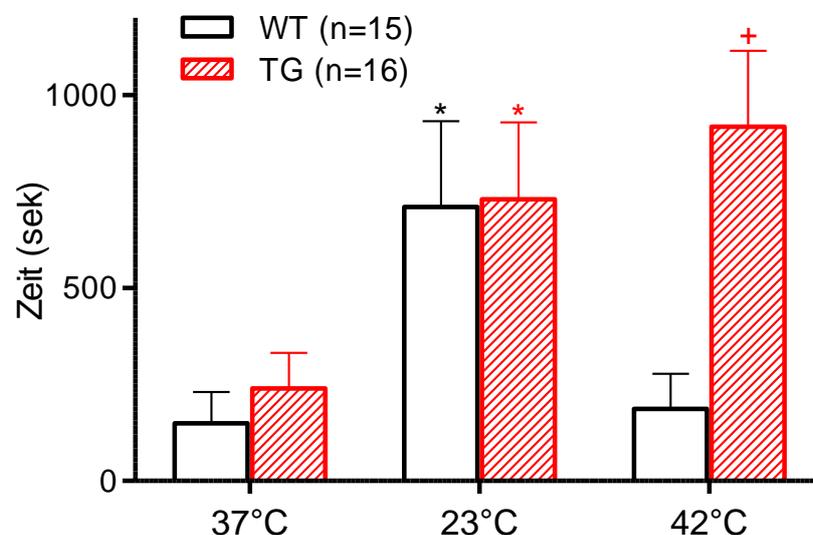


Abbildung 33: Dauer der Arrhythmien am rechten Vorhof der Maus

Mittels eines Balkendiagramms dargestellte Dauer der Arrhythmien in Sekunden bei WT Mäusen und H₂-TG Mäusen abhängig von den verschiedenen Temperaturen während der Histamingabe. Die gestrichelten Balken repräsentieren die H₂-TG Mäuse und die weißen die WT Mäuse. „n“ steht für die Zahl der Experimente. *p < 0.05 vs. 37°C. +p < 0.05 vs. WT

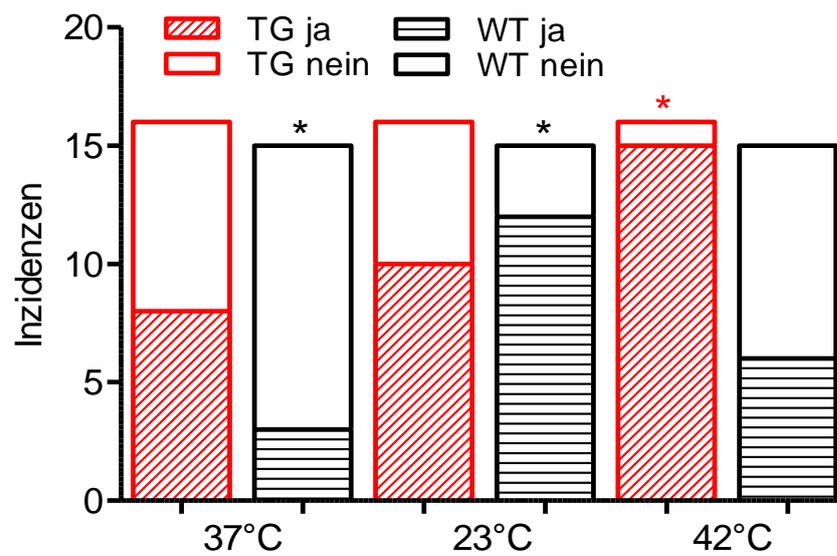


Abbildung 34: Inzidenzen der Arrhythmien am rechten Vorhof der Maus

Mittels eines Balkendiagramms werden die Inzidenzen der Arrhythmien temperaturabhängig bei WT Mäusen und H₂-TG Mäusen unter Histaminzugabe gezeigt. Die horizontalgestrichelten Linien repräsentieren die WT Mäuse und die diagonalgestrichelten die H₂-TG Mäuse. Untersucht wurde nach dem Ja-Nein-Prinzip. Die Zahl der Experimente lag bei n=16. *p < 0.05 (χ^2 -Test).

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

5.1.1 Mausmodell

Im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg wurde ein transgenes Mausmodell generiert, welches den humanen Histamin H₂-Rezeptor im Herzen überexprimiert (Gergs et al., 2019a, Neumann et al., 2021a). Vorher konnte der H₂-Rezeptor in Mausversuchen bezüglich der Kontraktionskraft nicht untersucht werden, da bei Wildtyp-Mäusen kein funktioneller H₂-Rezeptor exprimiert zu sein scheint. Stattdessen wurde nur das Arbeitsmyokard von menschlichen Vorhofpräparaten verwendet, die während einer Bypass-Operation gewonnen wurden. Die Vor- und Nachteile dieser Methode werden in Abschnitt 5.1.2 genauer erläutert. Durch das transgene Mausmodell war es nun möglich, den H₂-Rezeptor-vermittelten Effekt von Histamin am Herzen in vitro unter standardisierten Bedingungen zu untersuchen und die inotrope Wirkung am linken Vorhof getrennt von der chronotropen Wirkung am rechten Vorhof der transgenen Mäuse zu beobachten. Als Kontrolle für die transgenen Mäuse wurden Wildtyp-Geschwistertiere genutzt, die den H₂-Rezeptor nicht überexprimieren und somit nicht auf Histamin reagieren (Gergs et al., 2019a). Ein Vorteil gegenüber den menschlichen Präparaten bestand darin, dass der Sinusknoten im rechten Vorhof der Mäuse erhalten blieb und somit die Auswirkungen von Histamin auf die Frequenz und die Entstehung von Arrhythmien gemessen werden konnten. Des Weiteren können die Daten der transgenen Mäuse objektiver verglichen werden, da keine Vorerkrankungen oder eine Medikation vorlagen, im Gegensatz zu den menschlichen Präparaten. Zudem lassen sich die Mäuse im Vergleich zu größeren Säugetieren deutlich einfacher züchten, halten und handhaben. Ein Nachteil besteht jedoch darin, dass neben generellen Speziesunterschieden im Western Blot und PCR nicht die genaue Anzahl an H₂-Rezeptoren gemessen werden konnte (Gergs et al., 2019a). Dies hat zur Folge, dass das Mausmodell nicht ohne Weiteres auf den Menschen oder eine andere Spezies übertragen werden kann. Die Schlussfolgerungen aus den Mausdaten stellen lediglich eine Annäherung an das menschliche Herz dar. Unter

Basalbedingungen war die Herzfrequenz der transgenen Tiere höher als die der Wildtyp-Mäuse. Dies könnte möglicherweise durch eine gewisse Grundaktivität des H₂-Rezeptors erklärt werden, die dafür sorgt, dass die Signalkaskade auch schon ohne Agonisten aktiviert wird (Gergs et al., 2019a). In diesem Mausmodell wurde nur der H₂-Rezeptor exprimiert und die anderen Subtypen nicht. Dies ist für diese Arbeit von Vorteil, da sich die Fragestellung ausschließlich mit dem H₂-Rezeptor und nicht mit dem H₁-, H₃- oder H₄-Rezeptor beschäftigt. Die Übertragbarkeit auf den Menschen wird dadurch jedoch eingeschränkt, da menschliche Herzmuskelzellen sowohl den H₁- als auch den H₂-Rezeptor exprimieren. Zukünftige Experimente könnten beispielsweise mit Doppelttransgenen Mäusen durchgeführt werden, welche beide Histaminrezeptoren, H₁ und H₂, überexprimieren. Solche Versuche sind zu erwarten, da im Institut für Pharmakologie und Toxikologie Halle (Saale) auch ein neues Mausmodell mit H₁-Rezeptor-Überexpression vorhanden ist und derzeit basal charakterisiert wird.

5.1.2 Menschliche Präparate

Die menschlichen Vorhofpräparate für diese Versuchsreihe wurden während einer Bypass-Operation in der Herzchirurgie des Universitätsklinikums Halle (Saale) entnommen. Normalerweise werden diese Gewebestücke verworfen. Wenn jedoch die Patienten einer Verwendung zu Forschungszwecken zugestimmt hatten, wurden die Vorhofgewebestücke dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie zur Verfügung gestellt. Diese Präparate sind ein wichtiger Bestandteil der Arbeit, da sie einen guten Vergleich zwischen in vitro und in vivo ermöglichen. Allerdings können auf diese Weise prinzipiell nur Präparate von Menschen untersucht werden, die an Vorerkrankungen leiden und eine Medikation aufweisen und somit nicht den physiologisch gesunden Bedingungen entsprechen. Zudem können hier keine Arrhythmien beurteilt werden, da der Sinusknoten fehlt und die Präparate elektrisch gereizt werden müssen und somit nicht spontan schlagen. Es kann also lediglich eine Wirkung auf die Kontraktionskraft und nicht auf die Frequenz gemessen werden. Die Versuche an den menschlichen Präparaten bieten somit lediglich einen Ausblick und Effekte beim Menschen müssten zu einem späteren Zeitpunkt noch

eingehender untersucht werden. Die elektrisch gereizten menschlichen Präparate zeigten keine Arrhythmien, wie auch bei den elektrisch gereizten linken Vorhofpräparaten der H₂-TG und WT Mäuse keine Arrhythmien auftraten. Um auch diese bei menschlichen Präparaten besser untersuchen zu können, könnte ein Modell sinnvoll sein, bei dem zum Beispiel aus pluripotenten Stammzellen spontan schlagende humane Zellen gewonnen werden würden. Pluripotente Zellen wurden in früheren Forschungen eingehend untersucht (Liu et al., 2020). Jüngste Forschungen beschäftigen sich mit pluripotenten Zellen des Herzens. Diese brachten jedoch auch Nachteile beim Einsatz dieser Zellen bei der Erforschung von Herztransplantationen und der Behandlung von Myokardinfarkten zum Vorschein (Cheng et al., 2023, Kishino et al., 2023, Yu et al., 2023). Die Stammzellen neigen beispielsweise von Natur aus zu Arrhythmien, was für die hier behandelte Fragestellung nicht von Vorteil wäre (Cheng et al., 2023). Dementsprechend müssen die pluripotenten Stammzellen erst noch weiter erforscht werden, um sie für diese Fragestellung nutzen zu können.

5.1.3 Kontraktionsversuche an isolierten Vorhöfen

Für die Kontraktionsversuche wurden die isolierten linken und rechten Vorhöfe der H₂-transgenen und Wildtyp Mäuse genutzt. Die Kontraktionskraft wurde am linken Vorhof gemessen und die Frequenz am rechten Vorhof. Dies hat den Vorteil, dass diese Parameter unabhängig voneinander betrachtet werden konnten, im Gegensatz zu einem Versuch, der in vivo stattgefunden hätte. Jedoch konnten durch diese Methode komplexe Vorgänge im Organismus wie beispielsweise die Wechselwirkung mit dem Blutdruck oder neuronale Wechselwirkungen nicht beurteilt werden.

Ein weiterer relevanter Nachteil ist, dass die Vorhöfe der Mäuse lediglich wenige Millimeter groß sind. Dadurch kann das Muskelgewebe bei der Präparation der Vorhöfe unbeabsichtigt geschädigt werden, sowie das Anbringen der Häkchen an den Vorhöfen zu mechanischen Irritationen wie einer Überdehnung des Muskels führen. Dies kann dazu führen, dass es sowohl in den spontan schlagenden rechten als auch in den elektrisch gereizten linken Vorhöfen zu einer Bradykardie, Tachykardie oder Arrhythmie kommen kann, die bereits

während der Äquilibrierphase auftritt. Versuche, bei denen dies zu Beginn auftrat, wurden nicht gewertet, da das Risiko bestand, dass es sich um ein Präparationsartefakt handelt.

5.1.4 Kontraktionsversuche an menschlichen Vorhofpräparaten

Für die Kontraktionsversuche wurden auch menschliche Vorhofpräparate genutzt. Diese wurden zuvor fachgerecht präpariert und anschließend eingehängt werden. Es besteht dieselbe Problematik wie bei den Mausvorhöfen, da es auch hier zu mechanischen Irritationen kommen kann, die sich anschließend im Mechanogramm niederschlagen können. Außerdem können die Präparate nach der Präparation unterschiedliche Durchmesser aufweisen, was in der Analyse nicht berücksichtigt wurde. Hierfür müsste ein Verfahren etabliert werden, um den Durchmesser der Präparate messen zu können und in einer Normierung zu berücksichtigen. Dies könnte die Streuung der gemessenen Daten deutlich verringern.

5.2 Effekte von Histamin

5.2.1 Kontraktionsversuche

Da H_2 -Rezeptoren und β -Adrenorezeptoren über G_s -Proteine die Adenylylcyclase stimulieren und zu einem Anstieg von cAMP führen, können die hier gemessenen Histamin-Daten mit Studien mit Isoprenalin verglichen werden. Isoprenalin stimuliert direkt den β -Adrenorezeptor und sollte sowohl im menschlichen als auch im Mausherzen die Kontraktionskraft und die Frequenz nahezu maximal erhöhen. Solche Vergleiche wurden beispielsweise für Isoprenalin und Serotonin durchgeführt (Gergs et al., 2013, Gergs et al., 2009). In linken Vorhofpräparaten von WT Mäusen konnte gezeigt werden, dass Isoprenalin unter Hypothermie weniger potent war, die Kontraktionskraft zu steigern als unter Normothermie (Gergs et al., 2021a). Der Effekt von Histamin auf die Kontraktionskraft bei 23°C wies eine Rechtsverschiebung im Vergleich zu 37°C bei H_2 -TG Mäusen auf. Dies bedeutet, dass auch hier die Wirkung weniger potent war (Abbildung 16). Daraus kann folglich geschlossen werden, dass ein ähnlicher Mechanismus zum Tragen kommt, der den Effekt von Histamin und Isoprenalin bei niedrigen Temperaturen erklären kann. Weitere Untersuchungen stützen diese These: In einer Studie an Meerschweinchen wurde der inotrope Effekt von Isoprenalin an elektrisch stimulierten linken Vorhöfen der Tiere untersucht. Auch hier zeigte sich eine Rechtsverschiebung des positiv inotropen Effekts bei 25°C im Vergleich zu 37°C (Reinhardt et al., 1978, Tenner et al., 1978). Ähnliche Ergebnisse zeigte eine weitere Studie, in der der positiv inotrope Effekt von Histamin auf die Papillarmuskeln von Meerschweinchen untersucht wurde. Auch hier wurde ein geringerer Effekt bei Hypothermie (25°C) im Vergleich zu Normothermie bei 37,5°C festgestellt (Longhurst et al., 1983). Im rechten Vorhof wurde der chronotrope Effekt von Histamin gemessen. Hier ergaben die Daten, dass die Frequenz der spontan schlagenden rechten Vorhöfe der H_2 -TG Mäuse bei Hypothermie niedriger war als bei Normothermie, jedoch die Potenz von Histamin zur Steigerung der Frequenz bei beiden Temperaturen ähnlich war (Abbildung 22). Dieser Effekt wurde ebenfalls für Isoprenalin beobachtet. In den rechten Vorhofpräparaten der

WT Mäuse war die Basalfrequenz bei 23°C im Vergleich zu 37°C erniedrigt, aber der positiv chronotrope Effekt war ähnlich (Gergs et al., 2021a).

Hyperthermie führte zu einer Abnahme der maximalen Kontraktionskraft in den linken Vorhöfen und zu einer Zunahme der Basalfrequenz in den spontan schlagenden rechten Vorhöfen der H₂-TG Mäuse. Der positiv inotrope Effekt war bei 42°C in H₂-TG Mäusen geringer als bei 37°C. Dies konnte sowohl in den Mausvorhöfen (Abbildung 16, 22) als auch in den menschlichen Vorhofpräparaten (Abbildung 10) beobachtet werden. Auch der positiv inotrope Effekt von Isoprenalin in isolierten linken Vorhofpräparaten von Meerschweinchen zeigte unter Hyperthermie eine deutliche Abschwächung gegenüber der Normothermie (Reinhardt et al., 1978). Erhöhte Temperaturen führten zu einem geringeren Anstieg der Kontraktionskraft in den linken Vorhofpräparaten und gleichzeitig zu einer Erhöhung der Herzfrequenz in rechten Vorhöfen von H₂-TG Mäusen.

Bei den menschlichen rechten Vorhofpräparaten konnte bei keiner Temperatur ein Plateau bei der Konzentrationswirkungskurve erreicht werden. Die maximale Konzentration wurde auf 100 µM Histamin festgelegt, da in früheren Experimenten bei 37°C ein Plateau erreicht wurde und ein pEC₅₀-Wert von $-5,11 \pm 0,32$ (n=9) berechnet werden konnte (Neumann et al., 2021a, Neumann et al., 2021b, Neumann et al., 2021c, Neumann et al., 2021d). Eine andere Studie zeigte ähnliche pEC₅₀-Werte von -5,54 in humanen rechten Vorhofpräparaten (Zerkowski et al., 1993). Die maximale Histaminkonzentration wurde nicht weiter erhöht, da Histamin ab einer Konzentration von mehr als 100 µM sehr schlecht ausgewaschen werden kann und somit der Versuchsablauf nicht hätte eingehalten werden können.

Der Anstieg der Frequenz in den rechten Vorhöfen der WT Mäuse bei sehr hohen Histaminkonzentrationen könnte durch die Freisetzung von Katecholaminen verursacht und nicht über H₂-Rezeptoren vermittelt sein. In einer Studie an Ratten wurde die Wirkung von Histamin auf die Steigerung der Katecholaminfreisetzung untersucht (Laher et al., 1980b). Um diese Hypothese auszuschließen, wurden Versuche mit Propranolol (siehe Anhang) durchgeführt. Propranolol führte zu einer Abnahme der Frequenz nach der Histamingabe

(Laher et al., 1980b). Ähnliche Ergebnisse wurden auch an Herzen von Katzen (Laher et al., 1980a), Hunden (Flacke et al., 1967) und an Pythons (Norgaard et al., 2021) gefunden. In der letztgenannten Studie wurde sowohl die Wirkung von Histamin mittels des H₂-Rezeptors als auch durch die Freisetzung von Katecholaminen untersucht. Auch hier wurde Propranolol verabreicht und die Frequenz konnte durch den β -Adrenorezeptorenblocker gesenkt werden (Norgaard et al., 2021). Diese Studien legen nahe, dass auch hier die Freisetzung von Katecholaminen eine Rolle spielen könnte. Dies müsste jedoch in einer weiteren Studie untersucht werden.

5.2.2 Phosphorylierung

Histamin erhöhte die Phospholamban-Phosphorylierung unter Normothermie in isolierten Vorhofpräparaten von H₂-TG Mäusen, wie bereits in vorherigen Studien gezeigt wurde (Gergs et al., 2019a). Unter Hypothermie führte dieselbe Konzentration von Histamin zu einem geringeren Anstieg der Phospholamban-Phosphorylierung als unter Normothermie (Abbildung 29). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die cAMP-Produktion bei niedrigen Temperaturen geringer ist als bei Normothermie, da der H₂-Rezeptor in den H₂-TG Mäusen und/oder andere beteiligte Enzyme bei niedrigeren Temperaturen eine geringere Aktivität aufweisen. In den menschlichen Vorhofproben jedoch steigerte Histamin die Phospholamban-Phosphorylierung bei 37°C. Gleichzeitig wurde bei 42°C nahezu kein Effekt auf die Phospholamban-Phosphorylierung festgestellt (Abbildung 31). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass der H₂-Rezeptor im menschlichen Herzen unter Hyperthermie weniger aktiv ist als unter Normothermie. Außerdem stand für die Untersuchung der menschlichen Proben nur eine geringe Zahl von Proben zur Verfügung. Bei Hyperthermie waren es nur 3 auswertbare Proben. Daher könnte der Effekt von Histamin bei 42°C bei einer größeren Anzahl von Proben anders ausfallen. Auch dies müsste in weiteren Untersuchungen übergeprüft werden.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass das monomere Phospholamban die SERCA-Aktivität effektiver hemmt als die pentamere Form (Kadambi et al., 1997). Außerdem führt die β -adrenerge Stimulation des Herzens zur Phosphorylierung von Phospholamban an Threonin 17 (Kadambi et al., 1997).

In einer früheren Studie wurde der Effekt von Histamin auf die Phosphorylierung von Threonin 17 im Herzen über den H₂-Rezeptor gezeigt. Hier kam es zu einer verstärkten Phosphorylierung durch Histamin (Gergs et al., 2019a, Gergs et al., 2019b). Somit muss eine weitere Wirkungsweise von Histamin in Betracht gezogen werden. Ob unter den getesteten Bedingungen auch die Phosphorylierung von Phospholamban an Threonin 17 temperaturabhängig ist, müsste in einer weiteren Studie geklärt werden. Die Kopplung an andere Proteine könnte jedoch speziesabhängig sein, was die unterschiedlichen Beobachtungen zwischen Maus und Mensch bei der Phosphorylierung von Serin-16 erklären könnte.

Theoretisch könnten cAMP-abhängige Proteinkinasen (Kovalevsky et al., 2012) und Proteinphosphatasen (Yorimitsu et al., 2009) eine speziesabhängige Temperaturempfindlichkeit besitzen.

5.2.3 Arrhythmien

Ein relevantes Ergebnis dieser Arbeit war, dass Hyperthermie in rechten Vorhofpräparaten, die den humanen H₂-Rezeptor exprimieren, zu einer signifikant höheren Inzidenz und Dauer von Arrhythmien führte als in WT Mäusen (Abbildung 33, 34). Diese Arrhythmien waren reversibel, sobald die Temperatur wieder auf Normothermie (37°C) gesenkt wurde. Dies lässt den Schluss zu, dass dieser Effekt spezifisch für Hyperthermie ist. Des Weiteren wurde festgestellt, dass die Potenz und die Effektivität von Histamin, die Kontraktionskraft und die Frequenz zu erhöhen, in H₂-TG Mäusen unter Hyperthermie vermindert war. Aufgrund dieser Daten kann gefolgert werden, dass Hyperthermie den Signaltransduktionsweg des H₂-Rezeptors verändert und dass der H₂-Rezeptor möglicherweise eine Rolle bei Fieberarrhythmien beim Menschen spielt.

Inwieweit Hyperthermie in H₂-TG Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen *in vivo* zu mehr Arrhythmien führt und welcher Mechanismus dem zugrunde liegt, kann derzeit nur spekuliert werden. Interessanterweise war die Histamin-induzierte Phosphorylierung von Phospholamban an Serin-16 im linken Vorhof der H₂-TG Mäuse bei Temperaturen unter 37°C (Hypothermie) geringer. In einer anderen

Arbeit wurde gezeigt, dass eine erhöhte basale Inzidenz von Arrhythmien bei H₂-TG Mäusen unter Normothermie ohne Histaminzugabe auftrat. Dies könnte auf eine erhöhte cAMP-Produktion zurückzuführen sein, die wiederum zu einer Steigerung der Phosphorylierung von Phospholamban führt. (Gergs et al., 2021c). Außerdem können potentiell Arrhythmien unter Hyperthermie auftreten, wenn sich der Kaliumstrom oder der L-Typ Kalziumstrom verändert, die Funktion des Natriumkanals gehemmt wird und/oder sich der Kalziumgehalt im sarkoplasmatischen Retikulum verändert (Abdelsayed et al., 2015, El-Battrawy et al., 2016, Gregory et al., 2021, Keller et al., 2006, Morita et al., 2007, Zhao et al., 2016).

5.3 Fazit

In dieser Arbeit konnte am H₂-TG Mausmodell und an humanen Präparaten gezeigt werden, dass Histamin über H₂-Rezeptoren in den linken und rechten Vorhofpräparaten der H₂-TG Mäuse und den menschlichen rechten Vorhofpräparaten einen positiv inotropen und positiv chronotropen Effekt auslöst. Bei den WT Mäusen konnte kein Effekt durch Histamin erzeugt werden. Hypo- und Hyperthermie führten zu einem geringeren positiv inotropen Effekt von Histamin, zeigten jedoch keinen unterschiedlichen positiv chronotropen Effekt im Vergleich zu 37°C.

Die Phosphorylierung von Phospholamban an Serin-16 zeigte eine geringere Ausprägung bei 23°C als bei 37°C und 42°C bei H₂-TG Mäusen. Histamin hatte keinen Effekt in Bezug auf die PLB-Phosphorylierung bei WT Mäusen. Im Gegensatz zu den H₂-TG Mäusen war die PLB-Phosphorylierung in den menschlichen Vorhofpräparaten bei 42°C signifikant geringer als bei 37°C und 23°C.

Unter dem Einfluss von Histamin traten während der KWK Arrhythmien auf, die nach dem Auswaschen des Histamins reversibel waren. Unter Hyperthermie waren die Dauer und die Inzidenz der Arrhythmien bei den H₂-TG Mäusen signifikant höher als bei den WT Mäusen. Bei Hypo- und Normothermie zeigte sich kein Unterschied in der Dauer der Arrhythmien zwischen den H₂-TG und den WT Mäusen. Bei den menschlichen Präparaten konnten keine Arrhythmien gezeigt werden.

5.4 Ausblick

Histamin und die Histamin-Rezeptoren spielen im Bereich der Herz-Kreislauf-Erkrankungen eine wichtige Rolle. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Histamin über den H₂-Rezeptor einen Einfluss auf die Kontraktionskraft und die Frequenz hat.

Außerdem scheint der H₂-Rezeptor eine zentrale Rolle beim Auftreten von Histamin-induzierten Arrhythmien zu spielen. Diese Studie hat gezeigt, dass es gerade bei Hyperthermie zu vermehrten Arrhythmien kam. Hyperthermie kann im menschlichen Organismus mit Fieber gleichgesetzt werden. Es ist bekannt, dass gerade Fieber beim menschlichen Herzen auch zu Arrhythmien führen kann. Diese Arbeit zeigt, dass H₂-Rezeptoren unter anderem bei Fieberarrhythmien eine Rolle spielen können. Aufbauend auf diesen Daten kann nun in zukünftigen Arbeiten untersucht werden, ob die Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind. Es wurde gezeigt, dass eine Senkung der Temperatur zu einer reversiblen Beseitigung der Arrhythmien führt. Zusätzlich sollte in der Zukunft erforscht werden, ob z.B. H₂-Rezeptor Blocker ebenfalls zu diesem Ergebnis führen und somit möglicherweise als Therapieoption für Fieberarrhythmien in Frage kommen.

Aus dieser Arbeit ergeben sich noch folgende Fragen:

- Sind die Signalwege im Vorhof und im Ventrikel identisch?
- Sind die im Mausmodell beobachteten Arrhythmien auf den Menschen übertragbar?
- Führt Histamin in vivo beim Menschen zu ventrikulären Arrhythmien?
- Spielt Histamin bei Fieberarrhythmien eine Rolle und können H₂-Rezeptorantagonisten als Therapieoption eingesetzt werden?
- Spielt Histamin bei Fieberarrhythmien an heißen Sommertagen eine Rolle?
- Ist der Frequenzanstieg in den WT Mäusen katecholaminvermittelt?

6 Zusammenfassung

Histamin kann am menschlichen Herzen via H₂-Rezeptor sowohl positiv inotrop als auch chronotrop wirken. Unter Normothermie (37°C) kann es jedoch auch arrhythmogen sein (Gergs et al., 2021c, Neumann et al., 2021a, Neumann et al., 2021b). Die Wirkung von Histamin unter Fieber (Hyperthermie) oder bei Unterkühlung (Hypothermie) ist allerdings noch nicht vollständig geklärt. Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der Temperatur auf die Kontraktionskraft, die Frequenz und Histamin-bedingte Arrhythmien bei H₂-transgenen Mäusen zu untersuchen. Hierfür wurde in einem schon etablierten Mausmodell der menschliche H₂-Rezeptor in Herzmuskelzellen von transgenen Mäusen überexprimiert und Versuche mit den H₂-transgenen Mäusen durchgeführt. Wildtyp-Mäuse, welches die Geschwistertiere waren, wurden als Kontrolle herangezogen. Um einen Ausblick auf einen möglichen Einfluss am menschlichen Herzen zu ermöglichen, wurden zusätzlich Präparate von menschlichen rechten Vorhöfen verwendet.

Histamin führte in den Vorhöfen von H₂-TG Mäusen und in den menschlichen Präparaten zu einem positiv inotropen Effekt. Außerdem kam es zu einem positiv chronotropen Effekt von Histamin bei den H₂-TG Mäusen. Hypo- und Hyperthermie reduzierten die Kontraktionskraft unter Histamin. Unter diesen Temperaturen wirkte Histamin weniger potent als bei Normothermie. Die basale Frequenz der H₂-TG und der WT Mäuse war unter Hypothermie erniedrigt und bei Hyperthermie erhöht. Es konnte jedoch kein Unterschied in der Potenz von Histamin, die Frequenz zu erhöhen, zwischen den Temperaturen festgestellt werden.

In Bezug auf die Phosphorylierung von Phospholamban an Serin-16 hatte Histamin keinen Effekt auf die WT Mäuse. Bei den H₂-TG Mäusen war die PLB-Phosphorylierung durch Histamin unter Hypothermie niedriger als unter Normo- und Hyperthermie. Im Gegensatz dazu war es bei den menschlichen Proben genau umgekehrt: Hier führte Histamin zu einer höheren PLB-Phosphorylierung bei 37°C und 23°C, während bei 42°C der Effekt deutlich niedriger ausfiel.

Bei Hyperthermie führte Histamin bei H₂-TG Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen zu einer signifikant längeren Dauer von Arrhythmien in den Vorhöfen. Die Inzidenz der Arrhythmien war ebenfalls erhöht gegenüber den WT Mäusen. Unter Hypo- und Normothermie waren die Arrhythmien sowohl bei den H₂-TG Mäusen als auch bei den WT Mäusen im Vergleich zur Hyperthermie deutlich reduziert.

Zusammenfassend konnte der menschliche H₂-Rezeptor vor allem in Bezug auf den Einfluss der Temperatur auf Histamin-induzierte Arrhythmien untersucht werden. Es bleiben jedoch Fragen zur Übertragbarkeit auf den Menschen und zur Wirkung von Antiarrhythmika offen, weshalb weitere Experimente in dieser Richtung durchgeführt werden müssen.

7 Literaturverzeichnis

Abdelsayed, M., C. H. Peters and P. C. Ruben (2015). "Differential thermosensitivity in mixed syndrome cardiac sodium channel mutants." J Physiol **593**(18): 4201-4223.

Abella, L. M. R., R. Hoffmann, J. Neumann, B. Hofmann and U. Gergs (2022). "Levosimendan increases the phosphorylation state of phospholamban in the isolated human atrium." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.

Ackermann, D. (1910). "Über den bakteriellen Abbau des Histidins." **65**(5-6): 504-510.

Ackermann, D. and F. Kutscher (1910). "Untersuchungen über die physiologische Wirkung einer Secalebase und des Imidazolyläthylamins." Z Biol **54**: 387-394.

Agata, N., Y. Kato, I. Namekata, A. Takahara, H. Tanaka, D. Chino, K. Koike and Y. Tanaka (2010). "H₂receptor-mediated positive inotropic effect of histamine in neonatal guinea-pig left atria." Biol Pharm Bull **33**(12): 2033-2035.

Akdis, C. A. and F. E. Simons (2006). "Histamine receptors are hot in immunopharmacology." Eur J Pharmacol **533**(1-3): 69-76.

Ayadi, A., G. Ferrand, I. G. Cruz and X. Warot (2011). "Mouse Breeding and Colony Management." Curr Protoc Mouse Biol **1**(1): 239-264.

Black, J. W., W. A. Duncan, C. J. Durant, C. R. Ganellin and E. M. Parsons (1972). "Definition and antagonism of histamine H₂-receptors." Nature **236**(5347): 385-390.

Chan, N. Y., P. A. Robador and R. Levi (2012). "Natriuretic peptide-induced catecholamine release from cardiac sympathetic neurons: inhibition by histamine H₃ and H₄ receptor activation." J Pharmacol Exp Ther **343**(3): 568-577.

Cheng, Y. Y., Y. F. Hu and P. C. Hsieh (2023). "The Role of Large Animal Models in Cardiac Regeneration Research Using Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes." Curr Cardiol Rep.

Dale, H. H. and P. P. Laidlaw (1910). "The physiological action of beta-aminazolyethylamine." J Physiol **41**(5): 318-344.

Dale, H. H. and P. P. Laidlaw (1911). "Further observations on the action of β -aminazolyethylamine." The Journal of Physiology **43**(2): 182-195.

Dy, M. and E. Schneider (2004). "Histamine-cytokine connection in immunity and hematopoiesis." Cytokine Growth Factor Rev **15**(5): 393-410.

Einis, W. (1913). "Über die Wirkung des Pituitrins und β -Imidazoläthylamins (Histamins) auf die Herzaktion." Biochem. Zeitschr **52**, 96–117.

El-Battrawy, I., S. Lang, Z. Zhao, I. Akin, G. Yucel, S. Meister, B. Patocskai, M. Behnes, B. Rudic, E. Tulumen, V. Liebe, M. Tiburcy, J. Dworacek, W. H. Zimmermann, J. Utikal, T. Wieland, M. Borggrefe and X. B. Zhou (2016). "Hyperthermia Influences the Effects of Sodium Channel Blocking Drugs in Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes." PLoS One **11**(11): e0166143.

Flacke, W., D. Atanackovic, R. A. Gillis and M. H. Alper (1967). "The actions of histamine on the mammalian heart." J Pharmacol Exp Ther **155**(2): 271-278.

Fühner, H. (1912). Das Pituitrin und seine wirksamen Bestandteile. Münchener Medizinische Wochenschrift **16**, 852–853.

Gantz, I., G. Munzert, T. Tashiro, M. Schaffer, L. Wang, J. DelValle and T. Yamada (1991a). "Molecular cloning of the human histamine H2 receptor." Biochem Biophys Res Commun **178**(3): 1386-1392.

Gantz, I., M. Schaffer, J. DelValle, C. Logsdon, V. Campbell, M. Uhler and T. Yamada (1991b). "Molecular cloning of a gene encoding the histamine H2 receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(2): 429-433.

Gergs, U., M. Baumann, A. Bockler, I. B. Buchwalow, H. Ebelt, L. Fabritz, S. Hauptmann, N. Keller, P. Kirchhof, U. Klockner, K. Ponicke, U. Rueckschloss,

W. Schmitz, F. Werner and J. Neumann (2010). "Cardiac overexpression of the human 5-HT₄ receptor in mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol **299**(3): H788-798.

Gergs, U., G. Bernhardt, I. B. Buchwalow, H. Edler, J. Froba, M. Keller, U. Kirchhefer, F. Kohler, N. Misslinger, H. Wache and J. Neumann (2019a). "Initial Characterization of Transgenic Mice Overexpressing Human Histamine H₂ Receptors." J Pharmacol Exp Ther **369**(1): 129-141.

Gergs, U., A. Bockler, H. Ebelt, S. Hauptmann, N. Keller, V. Otto, K. Ponicke, W. Schmitz and J. Neumann (2013). "Human 5-HT₄receptor stimulation in atria of transgenic mice." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **386**(5): 357-367.

Gergs, U., T. Bruckner, B. Hofmann and J. Neumann (2021a). "The proarrhythmic effects of hypothermia in atria isolated from 5-HT₄-receptor-overexpressing mice." Eur J Pharmacol **906**: 174206.

Gergs, U., M. L. Buxel, M. Bresinsky, U. Kirchhefer, C. Fehse, C. Horing, B. Hofmann, M. Marusakova, A. Cinakova, R. Schwarz, S. Pockes and J. Neumann (2021b). "Cardiac Effects of Novel Histamine H₂ Receptor Agonists." J Pharmacol Exp Ther **379**(3): 223-234.

Gergs, U., U. Kirchhefer, F. Bergmann, B. Kunstler, N. Misslinger, B. Au, M. Mahnkopf, H. Wache and J. Neumann (2020). "Characterization of Stressed Transgenic Mice Overexpressing H₂-Histamine Receptors in the Heart." J Pharmacol Exp Ther **374**(3): 479-488.

Gergs, U., J. Neumann, A. Simm, R. E. Silber, F. O. Remmers and S. Laer (2009). "Phosphorylation of phospholamban and troponin I through 5-HT₄ receptors in the isolated human atrium." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **379**(4): 349-359.

Gergs, U., T. Trapp, H. Bushnaq, A. Simm, R. E. Silber and J. Neumann (2019b). "Age-Dependent Protein Expression of Serine/Threonine Phosphatases and Their Inhibitors in the Human Cardiac Atrium." Adv Med **2019**: 2675972.

Gergs, U., J. Weisgut, K. Griethe, N. Misslinger, U. Kirchhefer and J. Neumann (2021c). "Human histamine H₂ receptors can initiate cardiac arrhythmias in a

transgenic mouse." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **394**(9): 1963-1973.

Goodman & Gilman's - The Pharmacological Basis of Therapeutics. 2014, 12th Edition, Chapter 32, page 912-919. Histamine, Bradykinin, and Their Antagonists; Chapter 45, page 1310-1315. Pharmacotherapy of Gastric Acidity, Peptic Ulcers, and Gastroesophageal Reflux Disease

Gregory, H. and K. A. Weant (2021). "Pathophysiology and Treatment of Malignant Hyperthermia." Adv Emerg Nurs J **43**(2): 102-110.

Hattori, Y., K. Hattori and N. Matsuda (2017). "Regulation of the Cardiovascular System by Histamine." Handb Exp Pharmacol **241**: 239-258.

Hill, S. J., C. R. Ganellin, H. Timmerman, J. C. Schwartz, N. P. Shankley, J. M. Young, W. Schunack, R. Levi and H. L. Haas (1997). "International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors." Pharmacol Rev **49**(3): 253-278.

Jutel, M., M. Akdis and C. A. Akdis (2009). "Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology." Clin Exp Allergy **39**(12): 1786-1800.

Kadambi, V. J. and E. G. Kranias (1997). "Phospholamban: a protein coming of age." Biochem Biophys Res Commun **239**(1): 1-5.

Keller, D. I., H. Huang, J. Zhao, R. Frank, V. Suarez, E. Delacretaz, M. Brink, S. Osswald, N. Schwick and M. Chahine (2006). "A novel SCN5A mutation, F1344S, identified in a patient with Brugada syndrome and fever-induced ventricular fibrillation." Cardiovasc Res **70**(3): 521-529.

Kishino, Y., S. Tohyama, Y. Morita, Y. Soma, H. Tani, M. Okada, H. Kanazawa and K. Fukuda (2023). "Cardiac Regenerative Therapy Using Human Pluripotent Stem Cells for Heart Failure: A State-of-the-Art Review." J Card Fail **29**(4): 503-513.

Kovalevsky, A. Y., H. Johnson, B. L. Hanson, M. J. Waltman, S. Z. Fisher, S. Taylor and P. Langan (2012). "Low- and room-temperature X-ray structures of

protein kinase A ternary complexes shed new light on its activity." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **68**(Pt 7): 854-860.

Kuhn, B., A. Schmid, C. Harteneck, T. Gudermann and G. Schultz (1996). "G proteins of the Gq family couple the H2 histamine receptor to phospholipase C." Mol Endocrinol **10**(12): 1697-1707.

Laher, I. and J. H. McNeill (1980a). "Effects of histamine in the isolated kitten heart." Can J Physiol Pharmacol **58**(11): 1256-1261.

Laher, I. and J. H. McNeill (1980b). "Effects of histamine on rat isolated atria." Can J Physiol Pharmacol **58**(9): 1114-1116.

Leurs, R., E. Traiffort, J. M. Arrang, J. Tardivel-Lacombe, M. Ruat and J. C. Schwartz (1994). "Guinea pig histamine H1 receptor. II. Stable expression in Chinese hamster ovary cells reveals the interaction with three major signal transduction pathways." J Neurochem **62**(2): 519-527.

Liu, G., B. T. David, M. Trawczynski and R. G. Fessler (2020). "Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications." Stem Cell Rev Rep **16**(1): 3-32.

Longhurst, P. A. and J. H. McNeill (1983). "Guinea-pig and rabbit papillary muscles differ in their response to histamine." Gen Pharmacol **14**(2): 239-245.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-275.

Matsuda, N., S. Jesmin, Y. Takahashi, E. Hatta, M. Kobayashi, K. Matsuyama, N. Kawakami, I. Sakuma, S. Gando, H. Fukui, Y. Hattori and R. Levi (2004). "Histamine H1 and H2 receptor gene and protein levels are differentially expressed in the hearts of rodents and humans." J Pharmacol Exp Ther **309**(2): 786-795.

Morita, H., D. P. Zipes, S. T. Morita and J. Wu (2007). "Temperature modulation of ventricular arrhythmogenicity in a canine tissue model of Brugada syndrome." Heart Rhythm **4**(2): 188-197.

Neumann, J., J. M. Grobe, J. Weisgut, H. G. Schwelberger, W. A. Fogel, M. Marusakova, H. Wache, H. Bahre, I. B. Buchwalow, S. Dhein, B. Hofmann, U. Kirchhefer and U. Gergs (2021a). "Histamine can be Formed and Degraded in the Human and Mouse Heart." Front Pharmacol **12**: 582916.

Neumann, J., U. Kirchhefer, S. Dhein, B. Hofmann and U. Gergs (2021b). "The Roles of Cardiovascular H(2)-Histamine Receptors Under Normal and Pathophysiological Conditions." Front Pharmacol **12**: 732842.

Neumann, J., D. Schwarzer, C. Fehse, R. Schwarz, M. Marusakova, U. Kirchhefer, B. Hofmann and U. Gergs (2021c). "Functional interaction of H(2)-receptors and 5HT(4)-receptors in atrial tissues isolated from double transgenic mice and from human patients." Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol **394**(12): 2401-2418.

Neumann, J., R. Voss, U. Laufs, C. Werner and U. Gergs (2021d). "Phosphodiesterases 2, 3 and 4 can decrease cardiac effects of H(2)-histamine-receptor activation in isolated atria of transgenic mice." Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol **394**(6): 1215-1229.

Norgaard, S., W. Joyce, M. F. Jensen, S. Enok, N. Skovgaard and T. Wang (2021). "Histamine exerts both direct H(2)-mediated and indirect catecholaminergic effects on heart rate in pythons." J Comp Physiol B **191**(2): 347-355.

Panula, P., P. L. Chazot, M. Cowart, R. Gutzmer, R. Leurs, W. L. Liu, H. Stark, R. L. Thurmond and H. L. Haas (2015). "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVIII. Histamine Receptors." Pharmacol Rev **67**(3): 601-655.

Reinhardt, D., R. Butzheim, O. E. Brodde and H. J. Schumann (1978). "The role of cyclic AMP in temperature-dependent changes of contractile force and sensitivity of isoprenaline and papaverine in guinea-pig atria." Eur J Pharmacol **48**(1): 107-116.

Tenner, T. E., Jr. and J. H. McNeill (1978). "Characterization of the inotropic response induced by stimulation of beta-adrenergic and H1 histaminergic receptors in guinea pig left atria." Can J Physiol Pharmacol **56**(6): 926-933.

Tolbert, M. K. (2021). "Gastroprotective Therapy." Vet Clin North Am Small Anim Pract **51**(1): 33-41.

Windaus, A. and W. Vogt (1907). "Synthese des Imidazolyl-äthylamins." Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **40**(3): 3691-3695.

Yorimitsu, T., C. He, K. Wang and D. J. Klionsky (2009). "Tap42-associated protein phosphatase type 2A negatively regulates induction of autophagy." Autophagy **5**(5): 616-624.

Yu, Y., S. K. Tham, F. F. Roslan, B. Shaharuddin, Y. K. Yong, Z. Guo and J. J. Tan (2023). "Large animal models for cardiac remuscularization studies: A methodological review." Front Cardiovasc Med **10**: 1011880.

Zerkowski, H. R., A. Broede, K. Kunde, S. Hillemann, E. Schafer, M. Vogelsang, M. C. Michel and O. E. Brodde (1993). "Comparison of the positive inotropic effects of serotonin, histamine, angiotensin II, endothelin and isoprenaline in the isolated human right atrium." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **347**(4): 347-352.

Zhao, Y., T. Wang, J. Guo, T. Yang, W. Li, J. Koichopolos, S. M. Lamothe, Y. Kang, A. Ma and S. Zhang (2016). "Febrile temperature facilitates hERG/IKr degradation through an altered K(+) dependence." Heart Rhythm **13**(10): 2004-2011.

8 Thesen

1. Histamin wirkt am Vorhof von H₂-TG Mäusen positiv chronotrop und inotrop.
2. Histamin wirkt am menschlichen Vorhof positiv inotrop.
3. Die Funktion des humanen H₂-Rezeptors ist im TG-Mausmodell temperaturabhängig.
4. Histamin kann die PLB-Phosphorylierung im Vorhof bei H₂-TG Mäusen und beim Menschen beeinflussen.
5. Histamin führt zu vermehrten Arrhythmien bei H₂-TG Mäusen unter Hyperthermie.
6. Die Dauer der Arrhythmien bei H₂-TG Mäusen ist unter Hyperthermie deutlich erhöht.
7. WT Mäuse, welche keinen humanen H₂-Rezeptor besitzen, zeigen keine Reaktion auf Histamin.

9 Anhang

Puffer und Lösungen

Alle Chemikalien wurden in pro *analysis*-Qualität oder im besten kommerziell erhältlichen Reinheitsgrad verwendet. Soweit keine anderen Angaben gemacht werden, wurde für die Puffer und Lösungen Reinstwasser aus einer Wasseraufbereitungsanlage verwendet.

Genotypisierung der Versuchstiere

DNA-Lysispuffer	25mM NaOH, 0,1mM EDTA, pH 8
DNA-Neutralisationspuffer	4,6g/l Tris-HCl in Aqua dest
DEPC - Wasser	DEPC 0,1 % (V/V)
Agarosegel	Agarose 1 %, TAE- Puffer, RedSafe™ 0,01 %
TAE - Puffer	Tris Base 1,99 M, Eisessig 0,99 M, EDTA 59,5 mM, gelöst in aqua bidest.
Ladepuffer	TAE- Puffer 50 %, Glycerol 50 %, Bromphenolblau
Reaktionsansatz	2x PCR Super Master Mix; BioTool AG, Kirchberg, Schweiz

Kontraktionskraft- und Frequenzmessungen an Mausvorhofpräparaten

Tyrode- Lösung	
Stamm I	NaCl 17,5 % (g/V), KCl 1,005 % (g/V), MgCl ₂ x 6H ₂ O 0,56 % (g/V)
Stamm II	NaHCO ₃ 5,00 % (g/V)
Stamm III	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 0,29 % (g/V)
NaCl	119,8 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
Glukose	5,05 mM
Ascorbinsäure	0,28 mM

Na₂EDTA 0,05 mM
pH 7,4

Verwendete Substanzen

Agarose, Typ SeaKem	FMC bioproducts, Philadelphia, USA
L (+) – Ascorbinsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma- Aldrich, Steinheim
BSA	Sigma- Aldrich, Steinheim
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma- Aldrich, Steinheim
DNA - Leiter GeneRuler™	Fermentas GmbH, St. Leon- Rot
dNTP	MBI Fermentas, Heidelberg
Glukose	Merck, Darmstadt
Glycerol	C. Roth GmbH, Karlsruhe
HCl	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Heparin	Biochrom AG, Berlin
Histamin	Sigma- Aldrich, Steinheim
KCl	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Magermilchpulver	C. Roth GmbH, Karlsruhe
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Na ₂ EDTA	C. Roth GmbH, Karlsruhe
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Pentobarbital	Narcoren; Boehringer Ingelheim
Propranolol	Sigma- Aldrich, Steinheim
PCR- Puffer, 15 mM MgCl ₂	Ampliqon, Odense
Taq- DNA- Polymerase	Ampliqon, Odense
Tris-Puffer	Sigma- Aldrich, Steinheim
Tween 20	Sigma- Aldrich, Steinheim
Tyramin	Sigma- Aldrich, Steinheim

Geräte und Bezugsquellen

PCR-Gerät Mastercycler gradient (Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH Hamburg)

Zentrifuge Modell 5415 C (Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH Hamburg)

Biophotometer (Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH Hamburg)

Elektrophoresekammer Typ Horizon 58 (Life Technologies, Gaithersburg, USA)

Waage Typ AT261 DeltaRange (Mettler Instruments GmbH, Gießen)

pH-Meter (WTW GmbH, STH 600, Weilheim)

Kontraktionskraftmessanlage (Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim)

- Reizgerät mit 4 Kanälen (ELV Takt- und Impulsgenerator TIG 7000)
- Wärmebad (CS Lauda)
- 4 Transducer (Kent, Scientific corporation, Isometric Transducer)
- 4 Doppelwandgefäße, 4 Stative, 4 Elektroden, Halterungsstäbe, Haken

PowerLab-System von ADInstruments (Brückenverstärker, PowerLab (=Digitalisierer), LabChart Pro-Software (Version 8))

Software Prism 5; Graphpad Software, San Diego, USA

Primer

Forward Primer MHC-Seq-P1 (5'-ACCCTTACCCCACATAGACC-3')

Reverse Primer hH2R-SEQ-P1R (5'-AGCAGGTCAGTGATAGCCAA-5')

PCR- Programm

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

Tabelle 3: Patientendaten

Datum	21.04.22	27.04.22	02.08.22	04.08.22
Alter	82	70	77	61
Geschlecht	m	m	m	m
EF (%)	50	35	50	72
Diagnose	3-Gefäß-KHK AV-Block I. Grades	3-Gefäß-KHK Aortenklappen- stenose	3-Gefäß-KHK Hauptstamm- stenose	3-Gefäß-KHK Hauptstamm- stenose
NYHA	II-III	III	III	III
CCS	II-III	II-III	III	III
Medikamente	Amlodipin 5 mg, Acetylsalicyl- säure 100 mg, Atorvastatin 40 mg, Enalaprilmaleat 10 mg, Bisohexal 5 mg	Acetylsalicyl- säure 100 mg, Atorvastatin 40 mg, Bisohexal 5 mg, Delix 5 mg, Moxonidin 0,3 mg, Siofor 500 mg	Plavix 75 mg, Eliquis 2,5 mg, Calciumacetat- Nefro 500 mg, Doxazosin 4 mg, Moxonidin 0,2 mg, Myfortic 180 mg, Sevelamercarb onat 800 mg, Torem 200 mg, Urbason 4 mg, Xipamid 20 mg	Allopurinol 300 mg, Acetylsalicyl- säure 100 mg, Atorvastatin 40 mg, Bisohexal 5 mg, Enalapril 5 mg, HCT 12,5 mg, Omacor 1000 mg, Pulmicort 0,5 mg/2 ml SUV, Salbutamol 120 µg/25 µl HUB

10 Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die eingereichte Dissertation mit dem Titel:

Wirkung der Temperatur auf die Kontraktionskraft und Arrhythmien von isolierten Vorhöfen transgener Mäuse mit kardialer Histamin H₂-Rezeptorüberexpression

im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Prof. Dr. med. J. Neumann)

1. 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.
2. Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.
3. Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

11 Publikationen & Preise

1. Hoffmann R, Gergs U, Kirchhefer U, Neumann J (2022) Effect of temperature on contractility of isolated H₂-receptor overexpressing mouse atrial preparations. *Inflamm Res* (Abstract)
2. Abella LMR, Hoffmann R, Neumann J, Hofmann B, Gergs U. Levosimendan increases the phosphorylation state of phospholamban in the isolated human atrium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2023; doi: 10.1007/s00210-022-02348-7.
3. Neumann J, Hoffmann R, Gergs U (2022) H₂-histamine receptor overexpression increases hyperthermia-induced arrhythmias. *J Atrial Fibrillation* (Abstract)
4. Hoffmann R, Gergs U, Kirchhefer U, Neumann J (2023) Effect of temperature on contractility and phospholamban phosphorylation in isolated H₂-receptor overexpressing mouse atrial preparations. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 396(Suppl1):S44 (Abstract)
5. Hoffmann RJR, Gergs U, Hofmann B, Kirchhefer U, Neumann J. Temperature alters the inotropic, chronotropic and proarrhythmic effects of histamine in atrial muscle preparations from humans and H₂-receptor overexpressing mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2023; doi: 10.1007/s00210-023-02457-x.
6. Best Poster Award, 50th Anniversary Meeting, European Histamine Research Society, Hannover 2022
7. Best Abstract Award for Posters, 17th Venice Arrhythmias, Venice 2022

12 Danksagung

Zuallererst danke ich Herrn Prof. Dr. Joachim Neumann sowohl für die Überlassung dieses spannenden Themas und die umfangreiche und nie ermüdende Betreuung meiner Arbeit. Ich konnte mich jederzeit auf eine fachliche und präzise Antwort auf all meine Fragen verlassen.

Auch allen anderen Mitarbeitenden des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie gebührt mein Dank. Herr Dr. Ullrich Gergs stand stets für Fragen zu den Postern und vor allem zum Erstellen dieser Arbeit zur Stelle. Besonders Frau Lina Rayo-Abella, Pia Willmy und Rebecca Schwarz möchte ich für die freundschaftliche Aufnahme in das Team danken. Sie haben maßgeblich dazu beigetragen, dass ich diese Doktorarbeit so gut meistern konnte und haben mir auf den Konferenzen sowohl physisch als auch psychisch zur Seite gestanden. Zudem möchte ich Frau Stefanie Simmrodt dafür danken, dass sie während der gesamten Zeit immer direkt zur Stelle war, was die Organisation anging.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie, meiner Freundin Kati und allen meinen FreundInnen danken. Ohne eure ständige Motivation und die Geduld mit mir hätte ich diese Arbeit nicht so schnell beenden können. Obwohl es länger gedauert hat, als geplant, gilt: Was lange währt, wird endlich gut.