

**Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

**Charakterisierung isoliert perfundierter Herzen von Histamin-H<sub>2</sub>-  
Rezeptor überexprimierenden Mäusen.**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von  
Natascha Katharina Mißlinger  
geboren am 19.06.1993 in Landshut

Betreuer: Prof. Dr. med. Joachim Neumann

Gutachter:

1. Univ.-Prof. F. U. Müller (Münster)
2. Prof. W.-H. Zimmermann (Göttingen)

05.02.19

11.12.19

*Meiner Familie gewidmet*

## **Referat**

Histamin ist ein im Körper ubiquitär vorkommendes biogenes Amin, auch mit kardialer Relevanz. Es vermittelt seine Wirkungen über die Histaminrezeptoren H<sub>1</sub>-H<sub>4</sub>. Speziell für den Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor ist bekannt, daß er auch eine wichtige Rolle bei der Genese kardialer Arrhythmien spielt. Um die Funktion des Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptors im Herzen besser beurteilen zu können, wurde ein transgenes Mausmodell untersucht mit kardialer Überexpression des humanen Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptors (transgene Tiere = TG). Es wurden transgene Mäuse mit Geschwistertieren, und zwar Wildtypmäusen (WT), bei welchen ein kardialer Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor funktionell nicht nachweisbar ist, verglichen. In dieser Arbeit wurden Versuche mit isoliert perfundierten Herzen nach Langendorff durchgeführt, außerdem folgten biochemische Untersuchungen des Herzgewebes. Unter basalen Bedingungen unterschieden sich die transgenen Herzen von den Wildtypherzen durch eine geringere Kraftentwicklung, gesteigerte Herzfrequenz, verkürzte Anspannungs- und Erschlaffungszeit, sowie eine höhere Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit. Unter Zugabe von Isoprenalin steigerte sich an transgenen Herzen die Kontraktionskraft, die Herzfrequenz und die Kontraktions- bzw. Relaxationsgeschwindigkeit. Unter Histaminperfusion waren die Kontraktionskraft, sowie Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit verändert. Der inverse Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonist Cimetidin blockierte den positiv inotropen Histamineffekt und senkte zusätzlich die basal hohe Schlagfrequenz der transgenen Herzen, außerdem kam es unter dessen Einfluß zu einer Verlängerung der Anspannungszeit. In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Herzen beider Gruppen einer 20-minütigen Ischämie durch Abschalten der Perfusion ausgesetzt und anschließend reperfundiert. Diese Ischämiedauer führte nicht zu einer Veränderung der herzmechanischen Werte, aber sie führte bei den transgenen Herzen zu anhaltenden Reperfusionsarrhythmien, nicht jedoch bei den Wildtypen. Weiterhin konnte im Western Blot gezeigt werden, daß es bei Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-transgenen Tieren unter Histamineinfluß zu einer Phosphorylierung des Phospholambans an Serin-16 und Threonin-17 kam, ebenso Inhibitor 1 und der PP1. Damit hat der Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor ähnlich positive Effekte auf die Inotropie, wie eine Aktivierung von  $\beta$ -Adrenorezeptoren. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß der Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor einen Einfluß auf die basale Herzfunktion haben kann. Außerdem könnte der Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor ein therapeutisches Potenzial bei der Behandlung kardialer Erkrankungen haben.

Mißlinger, Natascha Katharina: Charakterisierung isoliert perfundierter Herzen von Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor überexprimierenden Mäusen. Halle (Saale), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Medizinische Fakultät, Dissertation, 62 Seiten, 2019

## **Inhaltsverzeichnis**

Referat.....	III
Inhaltsverzeichnis .....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis .....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1. Einleitung .....	1
1.1. Vorkommen von Histamin am Herzen.....	2
1.2. Kardiale Histaminrezeptoren.....	2
1.3. Wirkung des Histamin-H <sub>1</sub> - und H <sub>2</sub> -Rezeptors am Herzen und herznaher Gefäße.....	3
1.4. Signaltransduktion des Histamin-H <sub>2</sub> -Rezeptors .....	5
1.5. Ischämie und Reperfusion .....	7
1.6. Histamin und kardiale Arrhythmien.....	8
1.7. Histamin und Herzinsuffizienz.....	9
2. Fragestellung .....	10
3. Material und Methoden .....	11
3.1. Tiermodell .....	11
3.2. Langendorff-Versuche.....	12
3.2.1. Kalibrierung und Vorbereitung der Anlage .....	13
3.2.2. Präparation der Herzen.....	13
3.2.3. Versuchsreihe 1: Agonisten-Antagonisten-Versuche .....	14
3.2.4. Versuchsreihe 2: Ischämie und Reperfusion.....	15
3.2.5. Datenerfassung.....	15
3.3. Genotypisierung .....	16
3.4. Nachweis spezifischer Proteine im Western Blot .....	16
3.4.1. Homogenisierung der Proben.....	17
3.4.2. Quantitative Bestimmung des Proteingehalts nach Lowry .....	17
3.4.3. SDS-Page .....	17
3.4.4. Western Blots.....	18
3.4.5. Immunologischer Proteinnachweis .....	18
4. Ergebnisse .....	20
4.1. Tiermodell .....	20
4.2. Versuchsreihe 1: Agonisten-Antagonisten-Versuche .....	20
4.3. Versuchsreihe 2: Ischämieversuche .....	32
4.4. Genotypisierung .....	33
4.5. Nachweis spezifischer Proteine.....	34
5. Diskussion.....	37
5.1. Diskussion der Methoden.....	37
5.1.1. Genkonstrukt.....	37
5.1.2. Tiermodell.....	37

5.1.3.	Langendorff-Methode .....	37
5.2.	Diskussion der Ergebnisse.....	39
5.2.1.	Tiermodell.....	39
5.2.2.	Langendorff-Versuchsreihe 1: Agonisten-Antagonisten-Versuche.....	39
5.2.3.	Langendorff-Versuchsreihe 2: Ischämieversuche.....	41
5.2.4.	Proteinexpression und -phosphorylierung .....	42
5.3.	Fazit .....	44
5.4.	Klinischer Ausblick und Anwendbarkeit .....	44
5.4.1.	Histamin-H <sub>2</sub> -Rezeptor-Überexpression .....	44
5.4.2.	Stop-Flow-Ischämie.....	45
5.4.3.	Kardiale Histamin-H <sub>2</sub> -Rezeptor-Signaltransduktion .....	45
6.	Zusammenfassung.....	46
7.	Literaturverzeichnis.....	48
8.	Thesen .....	54
9.	Anlagen .....	55
10.	Selbstständigkeitserklärung .....	IX
11.	Eidesstattliche Erklärung.....	X
12.	Lebenslauf.....	XI
13.	Danksagung .....	XII

### **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1:	Metabolismus des Histamins .....	1
Abbildung 2:	Signaltransduktion des Histamin-H <sub>2</sub> -Rezeptors .....	6
Abbildung 3:	Genkonstrukt .....	11
Abbildung 4:	Schemazeichnung der Langendorff-Apparatur .....	12
Abbildung 5:	Strukturformeln verwendeter Substanzen .....	14
Abbildung 6:	Schemazeichnung Ischämie und Reperfusion .....	15
Abbildung 7:	Basale Parameter von WT und TG im Vergleich.....	21
Abbildung 8:	Basalarrhythmien.....	22
Abbildung 9:	Positiv inotroper Effekt des Histamins .....	23
Abbildung 10:	Kontraktionskraft.....	24
Abbildung 11:	Herzfrequenz .....	25
Abbildung 12:	Frequenzabnahme unter Cimetidin-Einfluß .....	26
Abbildung 13:	Kontraktionszeit T1 .....	27
Abbildung 14:	Erschlaffungszeit T2.....	28
Abbildung 15:	Kontraktionsgeschwindigkeit dF/dT max .....	29
Abbildung 16:	Relaxationsgeschwindigkeit dF/dT min .....	30
Abbildung 17:	Übersicht Substanzwirkungen .....	31

Abbildung 18: Ischämie, Reperfusion und Arrhythmie.....	32
Abbildung 19: Genotypisierung.....	34
Abbildung 20: Originale Western Blots .....	35
Abbildung 21: Phosphorylierung des PLB und P-II .....	36

### Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenfassung der Effekte bei TG .....	30
Tabelle 2: Ischämie, Reperfusion und Zeitkontrolle .....	33

### Abkürzungsverzeichnis

6-OHDA	6-Hydroxydopamin
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatcyclase
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Alkalische Phosphatase Substrat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
β-AR	β-Adrenorezeptor
BSA	<i>Engl. Bovine serum albumin</i> = Rinderserumalbumin
bp	Basenpaare
bpm	<i>Engl. Beats per minute</i> = Herzschläge pro Minute
Bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Calcium <sup>2+</sup> -Ionen
Ca <sup>2+</sup> /CaM-Kinase	Ca <sup>2+</sup> -Calmodulin-abhängige Proteinkinase 2
cAMP	Zyklisches Adenosin 3',5'-monophosphat
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CIM	Cimetidin
cm	Zentimeter
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
CTR	Kontrolle
CSQ	Calsequestrin
dF/dt	Kraftänderung/Zeiteinheit (Kontraktions/Relaxationsgeschwindigkeit)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat

ECF	<i>Engl: enhanced chemofluorescence</i> (Biochemische Färbemethode)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
g	Gramm
HIS	Histamin
HDC	Histidin-Decarboxylase
H <sub>2</sub> -R	Histamin-H <sub>2</sub> -Rezeptor
IE	<i>Engl: International Unit, (auch IU)</i> Internationale Maßeinheit
ISO	Isoprenalin
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
kg	Kilogramm
KO	Knock-Out (eines Gens)
LTCC	L-Typ-Ca <sub>2+</sub> -Kanäle
M	Molar (Mol/Liter)
mA	Milliampère
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
MHC	Schwere Kette des Myosins
min	Minuten
µl	Mikromolar (Mikromol/Liter)
ml	Milliliter
mM	Millimolar (Millimol/Liter)
mN	Millinewton
ms	Millisekunden
n	Stichprobenumfang
n.b.	Nicht berechenbar
p	Statistische Signifikanz (<0,05)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI	PhosphorImager units (arbiträre Einheit x 10 <sup>6</sup> )
PLB	Phospholamban
Post	Nach Ischämie
PP1	Serin-Threonin abhängige Phosphatase 1

Pre	Vor Ischämie
Primer	Oligonukleotid für die PCR
Rec	<i>Engl. Recording</i> = Aufnahmen
RNA	Ribunucleinsäure
rmp	<i>Engl. Rounds per minute</i> =Umdrehungen pro Minute
RyR	Ryanodin-Rezeptor (Ca <sub>2+</sub> -Freisetzungskanal)
s.	siehe
s	Sekunde
SDS	<i>Engl. sodium dodecyl sulfate</i> = Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	<i>engl. Sodium dodecyl sulfat polyacrylamid gelelectrophoresis</i> = Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardabweichung
SER16	Serin-16
SERCA	Ca <sub>2+</sub> -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
Sol.	<i>Engl. Solution</i> = Lösung
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TC	Zeitkontrolle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBST	<i>Engl: Tris Buffered Saline with Tween</i> (Verwendete Puffersubstanz)
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
THR17	Threonin-17
TG	Histamin-H <sub>2</sub> -Rezeptor-transgene Maus
TnI	Troponin-Inhibitor
u.a.	Unter anderem
V	Volumen oder Spannung (Volt)
Vgl.	Vergleiche
v.a.	Vor allem
Vs.	Versus
WT	CD1-Wildtyp-Maus
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

## 1. Einleitung

Histamin ist ein biogenes Amin, welches im Körper aus der Aminosäure L-Histidin durch das Enzym Histidin-Decarboxylase (HDC) synthetisiert wird (Watanabe et al. 1991). Abgesehen davon kann es auch als sogenanntes exogenes Histamin durch die Nahrung aufgenommen werden. So kommt Histamin zum Beispiel in manchen Obst- oder Gemüsesorten, in größeren Mengen aber von allem in länger herangereiften Nahrungsmitteln vor (Bodmer et al. 1999; Halsz et al. 1994). Exogenes Histamin spielt eine wichtige Rolle bei der Histamin-Intoleranz (Maintz und Novak 2007). Erstmals 1907 synthetisch hergestellt (Windhaus A and Voigt W 1907), wurde das Vorkommen von Histamin im Körper im Jahr 1910 nachgewiesen, ebenso seine möglichen Eigenschaften als Transmitter und seine Wirkung auf die glatte Muskulatur (Dale und Laidlaw 1910). Der Begriff Histamin, dessen chemisch exakte Bezeichnung eigentlich 2-(1H-Imidazol-4-yl)ethanamin) lautet, wird vom griechischen Wort *histos* abgeleitet und bedeutet Gewebe. Das Histamin hat viele Aufgaben im menschlichen Organismus, beispielsweise die Beteiligung im allergischen und immunologischen Geschehen (Akdis und Simons 2006; White 1990). Auch werden im Magen-Darm-Trakt (Coruzzi 2012) und im zentralen Nervensystem (ZNS) (Almeida et al. 2015; Watanabe und Yanai 2001), am Gefäßsystem (Best et al. 1927), sowie in der Hämatopoese, Embryonalentwicklung, Zellproliferation und Entwicklung -und damit auch bei der Wundheilung- viele verschiedene Prozesse über Histamin vermittelt (Jutel et al. 2009). Diese Arbeit befasst sich besonders mit der Wirkung von Histamin am Herzen.

Es gibt zwei quantitativ bedeutende Abbaumechanismen für Histamin (Abb. 1), die dem Körper zur Verfügung stehen: Zum einen zu N-Methylhistamin über die Histamin-N-Methyltransferase (HNMT), ihr Vorkommen wurde im Schwein in allen untersuchten Geweben bestätigt, jedoch nicht im Blutplasma (Klocker et al. 2005). Zum anderen mit Hilfe der unspezifischen Diaminoxidase (DAO) zu Imidazol-4-yl-acetaldehyd (Maslinski und Fogel 1991), vorkommend nur in der Peripherie, nicht im ZNS (Yoshikawa et al. 2013). DAO ist für den Abbau über die Nahrung zugeführten Histamins besonders wichtig (Sattler et al. 1988) und spielt daher auch eine Rolle bei der Histamin-Intoleranz. Symptome können bei Personen auftreten, die eine verminderte endogene DAO-Aktivität besitzen (Maintz et al. 2006).

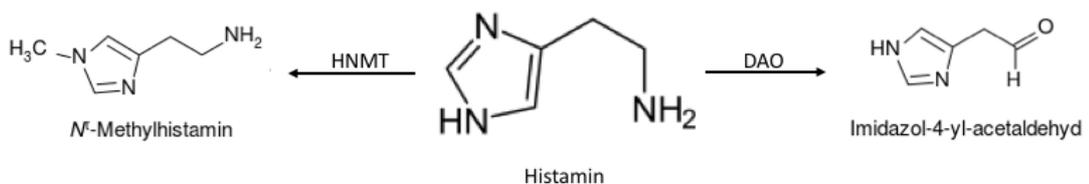


Abbildung 1: Metabolismus des Histamins

Histamin wird über die HNMT zu N-Methylhistamin und über die DAO zu Imidazol-4-yl-acetaldehyd abgebaut.

### **1.1. Vorkommen von Histamin am Herzen**

Im menschlichen Körper liegt der Großteil des Histamins in Mastzellen und basophilen Zellen vor (Jutel et al. 2009), auch das am Herzen wirksame Histamin kommt wahrscheinlich teilweise aus Mastzellen (He et al. 2012). Explantierte menschliche Herzventrikel enthalten 5 µg/g Histamin, welches wohl zum Teil aus Mastzellen stammt (Patella et al. 1995). Im menschlichen Papillarmuskel wurden Konzentrationen von  $707 \pm 100$  ng/g Histamin gemessen (Eckel et al. 1982). Von allen Tieren, die üblicherweise als Versuchstiere im Labor verwendet werden, enthält das Herz der Maus wohl am wenigsten Histamin, wahrscheinlich da die Maus auch kaum über Mastzellen verfügt (Wolff und Levi 1986). Sowohl für Maus als auch Mensch gilt, dass am meisten Histamin im Vorhof gefunden wurde, davon 30% mehr im rechten als im linken. Dieser Umstand könnte durch die höheren Dichte kardialer Ganglien im rechten Vorhof bedingt sein (Wolff und Levi 1986). Histamin wird in der Regel sekretorisch  $Ca^{2+}$ -vermittelt freigesetzt, kann aber auch durch Zytolyse die Mastzelle verlassen (Rangachari 1992). Die Freisetzung von Histamin aus der Mastzelle wird über den Histamin- $H_2$ -Rezeptor mittels cAMP durch negative Rückkopplung inhibiert (Weston und Peachell 1998). Ein wichtiger Histaminliberator für die Mastzelle ist neben Anaphylaxie, Medikamenten, Nahrungsmitteln und Druck auch die Hypoxie (Maintz et al. 2006). Sauerstoffmangel und Histaminfreisetzung beeinflussen sich wohl bei der Entstehung von Arrhythmien gegenseitig. Es gibt jedoch auch mehrere Ergebnisse, die dafürsprechen, daß Histamin am Herzen nicht nur aus Mastzellen stammt. Schon 1999 zeigten Singh und Kollegen (Singh et al. 1999), daß Histamin in sympathischen Nervenendigungen am menschlichen Herzen vorkommt. In einer Studie, die isolierte Herzen von Mastzell-defizienten Knockout-Mäusen und von Wildtyp-Tieren einer Ischämie unterschiedlicher Dauer unterzogen, setzten Knockout-Herzen nach 10 Minuten Ischämiedauer genauso viel, nach 20 oder 30 Minuten weniger Histamin und Noradrenalin frei als Wildtypen. Allerdings war trotzdem noch Histamin meßbar, was die Hypothese untermauerte, Histamin komme nicht nur aus Mastzellen. Es wurde vermutet, daß sympathische Nervenendigungen in den Mauserzen der Ursprung sein könnten. (He et al. 2012). Ebenfalls korrelierte der postsynaptische Histamineffekt mit der Aktionspotenzial-Frequenz sympathischer Neurone (He et al. 2008). Dieser Effekt funktioniert aber offenbar nur bei einem physiologischen Noradrenalingehalt. Die chemisch-sympathische Denervierung mittels 6-Hydroxydopamin senkte nicht nur die NoradrenalinKonzentration, sondern auch die Histaminfreisetzung durch Frequenzerhöhung, was die Hypothese zulässt, Histamin sei ein sympathischer Ko-Transmitter (He et al. 2012).

### **1.2. Kardiale Histaminrezeptoren**

Aktuell sind vier Histaminrezeptoren bekannt,  $H_1$ - $H_4$ . Folkow vermutete 1948 als Erster, daß die Histaminwirkung über mehr als einen Rezeptor vermittelt wird. Dies wurde später bestätigt und die Histamin-Rezeptoren  $H_1$  und  $H_2$  wurden entdeckt (Owen 1977), die auch heute als die

Wichtigsten für die kardiale Histaminfunktion angesehen werden. Der Histamin-H<sub>1</sub>-Rezeptor wurde durch Ash und Schild 1966 erstmals beschrieben (Ash und Schild 1966). Black erhielt für die endgültige Entdeckung des Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptors und des Histaminantagonisten Cimetidin im Jahr 1972 den Nobelpreis für Medizin und Physiologie (Black et al. 1972). Die Verteilung der beiden Rezeptoren ist spezieabhängig. Der 487 Aminosäuren (AS) lange Histamin-H<sub>1</sub>-Rezeptor (Jutel et al. 2009) findet sich im Meerschweinchenherz mehr im Vorhof als im Ventrikel, im Kaninchenherz verhält es sich genau umgekehrt. Bei der Ratte sind die Konzentrationen ähnlich. Beim Menschen wurden im Ventrikel mehr Histamin-H<sub>1</sub>-Rezeptoren gefunden als im Vorhof, aber insgesamt deutlich weniger als bei den anderen Spezies (Matsuda et al. 2004). Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptoren, 538 Aminosäuren lang (Kobayashi et al. 1996), gibt es jedoch im Meerschweinchenventrikel mehr als in seinem Vorhof, beim Kaninchen ist es hier wieder andersrum. In der Ratte ist der Konzentrationsunterschied wieder ähnlich, im humanen Herzen gibt es etwas mehr Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptoren im Vorhof, insgesamt im Herzen deutlich mehr als Histamin-H<sub>1</sub>-Rezeptoren (Matsuda et al. 2004). Die Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-Expression ist außerdem altersabhängig. Im Meerschweinchen gab es Unterschiede zwischen neugeborenen und erwachsenen Tieren im Vorhof (Agata et al. 2010). Die mRNA-Expression von Histamin-H<sub>1</sub>- und H<sub>2</sub>-Rezeptoren ist im gesamten Herzen der Maus, also Vorhof und Ventrikel, nachgewiesen worden, wobei das Vorhandensein des Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptors stark an die Histaminkonzentration im Körper, also endogenes und exogenes Histamin, gebunden war (Fitzsimons et al. 2001). Im isolierten Mäusevorhof sind jedoch nur Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptoren und keine Histamin-H<sub>1</sub>-Rezeptoren nachgewiesen worden (Goren et al. 1994). Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, Histamin-H<sub>1</sub>-Rezeptoren seien nur im Ventrikel exprimiert, wohingegen der Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor auch in Vorhof und Ventrikel vorhanden sein kann. Die beiden anderen Rezeptoren, der Histamin-H<sub>3</sub>-Rezeptor und Histamin-H<sub>4</sub>-Rezeptor, spielen im erweiterten Sinne auch eine kardioprotektive Rolle am Herzen. Beide, über Gi/o-Protein-Kopplung wirkend (Jutel et al. 2009), hemmen die Ausschüttung von Noradrenalin an sympathischen Nervenendigungen (Levi und Smith 2000), welche eine wichtige Ursache von Arrhythmien bei Ischämie darstellt (Du und Dart 1993). Histamin-H<sub>4</sub>-Rezeptoren auf kardialen Mastzellen verhindern zusätzlich die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und tragen damit zur Verringerung von postischämischen Arrhythmien bei (Aldi et al. 2014).

### **1.3. Wirkung des Histamin-H<sub>1</sub>- und H<sub>2</sub>-Rezeptors am Herzen und herznaher Gefäße**

Sehr gut untersucht ist die sympathische Innervation des Herzens. Prinzipiell gibt es hierfür verschiedene Parameter, die durch adrenerge Innervation beeinflusst werden können: Die Chronotropie beschreibt die Schlagfrequenz am Sinusknoten, bei der Inotropie handelt es sich um die Kontraktionskraft und mit der Dromotropie ist die Überleitungsgeschwindigkeit der Aktionspotenziale am AV-Knoten und in den Purkinjefasern gemeint. Des Weiteren gibt es noch

mit der Lusitropie die Möglichkeit, Einfluß auf die Relaxationsgeschwindigkeit nach einer Kontraktion zu nehmen. Eine weitere Möglichkeit der Einflussnahme besteht in der Bathmotropie, die Wiedererregbarkeit des Herzmuskelgewebes (Iaizzo 2005). Der positiv chronotrope Effekt des Noradrenalins basiert nach einigen Autoren auf einer direkten cAMP-vermittelten Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit der HCN-Kanäle des Herzens (Zipes et al. 2018). Dadurch wird das Schwellenpotenzial zur Auslösung eines Aktionspotenzials am Sinusknoten schneller erreicht und die Herzfrequenz nimmt zu (Iaizzo 2005). Die Steuerung der Inotropie und Lusitropie durch adrenerge Innervation wird ebenfalls über cAMP reguliert, allerdings via Aktivierung der Proteinkinase A gefolgt von Phosphorylierungen regulatorischer Proteine: Die Offenwahrscheinlichkeit der L-Typ-Ca<sub>2+</sub>-Kanäle (LTCC) wird erhöht, ebenso die Calcium-Wiederaufnahme durch Phospholamban-Phosphorylierung und die Aktivität von Troponin I (TnI). Dadurch wird die Kontraktionskraft gesteigert und die Relaxation beschleunigt. (Iaizzo 2005). Doch wie entfaltet Histamin seine kardialen Effekte? Es wird aktuell davon ausgegangen, daß die Aktivierungswege simultan zu denen des Noradrenalins laufen (siehe 1.1.). Die Wirkung der Histaminrezeptoren am Herzen ist, ebenso wie ihre Verteilung im kardialen Gewebe, abhängig von der Spezies. Die Arbeitsgruppe um Ginsburg stellte 1980 (Ginsburg et al. 1980) einen positiv inotropen Histamineffekt in beiden Vorhöfen und Ventrikeln am Menschen fest, welcher mit dem Histamin-H<sub>2</sub>-Antagonisten Cimetidin, nicht aber mit Histamin-H<sub>1</sub>-Antagonisten hemmbar war und damit wahrscheinlich am menschlichen Herz über den Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor vermittelt wird. Ebenfalls bewirkte Histamin-H<sub>1</sub>-vermittelt einen negativ dromotropen Effekt am AV-Knoten des Menschen. Ergänzend dazu steht die Studie von Genovese und Kollegen (Genovese et al. 1988), hier wirkte Histamin über den Histamin-H<sub>1</sub>-Rezeptor am Vorhof negativ chronotrop und inotrop, wohingegen der Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor die Frequenz und die Kontraktionskraft steigerte. An Papillarmuskeln des Menschen wurde durch Histamin ein zeit- und konzentrationsabhängiger positiv inotroper Effekt festgestellt (Thoren et al. 2011). Dieser war Gs-Protein vermittelt (Jutel et al. 2009) und cAMP gekoppelt (Johnson et al. 1979). Im Meerschweinchen vermittelte der Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor einen positiv chronotropen Effekt im rechten Vorhof und wirkte positiv inotrop über cAMP im Ventrikel (Reinhardt et al. 1977). Der Histamin-H<sub>1</sub>-Rezeptor hingegen wirkte positiv inotrop am linken Vorhof (Capurro und Levi 1973; Goren et al. 1994). Da die Maus geringere Histaminvorkommen und weniger Histamin-Rezeptoren besitzt als andere Histamin-Versuchstiere, ist die Wirkung des Histamins hier auch weniger untersucht. Über den Histamin-H<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelt Histamin eine Vasokonstriktion an der Aorta von Kaninchen, Ratte und Meerschweinchen (van de Voorde und Leusen 1984). Außerdem bewirkt eine Histamin-H<sub>1</sub>-Aktivierung beim Menschen eine Vasokonstriktion der Koronargefäße, wohingegen der Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor zur Vasodilatation dieser Gefäße führt (Ginsburg et al. 1980).

#### 1.4. Signaltransduktion des Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptors

Der Steigerung der Herzfrequenz und der Kontraktionskraft liegt eine Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-Gs-Proteinkopplung zugrunde, welche über die Adenylatcyclase und einer Erhöhung des cAMP-Gehalts zur Aktivierung der Proteinkinase A, kurz PKA, führt (siehe Abb. 2). Diese phosphoryliert diverse Zielproteine, deren Wirkung dadurch verstärkt oder vermindert werden (Wellner-Kienitz et al. 2013; Zhang et al. 2018). Die Kopplung an die Adenylatcyclase wurde in verschiedenen Spezies wie Mensch, Katze und Meerschweinchen (Klein und Levey 1971), aber auch in unterschiedlichen Geweben, zum Beispiel in Gehirn, Magen und Herzgewebe bestätigt (Hill et al. 1997). Die halbmaximale Konzentration von Histamin, die im Meerschweinchen einen cAMP-Anstieg auslöst, war ähnlich der des Noradrenalins (Klein und Levey 1971), an menschlichen  $\beta$ -Adrenorezeptoren war Noradrenalin allerdings potenter (Eckel et al. 1982). Eine Theorie zum Zustandekommen des positiv chronotropen Effekts besagt, dass diese an der Membran von Sinusknotenmyozyten im rechten Herzvorhof durch eine cAMP-Bindung an HCN-Kanälen (*engl.: hyperpolarisation activated, cyclic nucleotide gated*) und durch Phosphorylierung der spannungsabhängigen LTCC entstehe. Damit kann die Schwelle zur Auslösung eines Aktionspotenzials schneller erreicht werden und die Frequenz nimmt zu (Gekle et al. 2010). Analog könnte es sich mit Histamin über den Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor verhalten. In Vorhof- und Ventrikelmyozyten kommt es zu einer Zunahme der Inotropie über die PKA und die Phosphorylierung von LTCC. Dadurch wird das Aktionspotenzial verlängert, was wiederum einen stärkeren Ausstrom von Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum ermöglicht, welcher über den Ryanodinrezeptor (RyR) erfolgt. Damit kann die Konzentrationskraft steigen, sowohl durch Histamin als auch durch Noradrenalin (Eckel et al. 1982; Gekle et al. 2010; Wellner-Kienitz et al. 2013). Neuere Studien ergänzen diese, von der Sinusmyozytenmembran ausgehenden, Vorgänge durch ein System direkt am sarkoplasmatischen Retikulum. Dort soll ein eigenständiger, rhythmischer Ca<sub>2+</sub>-Ausstrom stattfinden, welcher oben beschriebene Vorgänge ergänzt (Maltsev und Lakatta 2008). Noradrenalin bewirkt außerdem, ebenfalls über die PKA, eine Phosphorylierung des Phospholambans (PLB), was dessen Hemmung der SERCA, die Ca<sub>2+</sub> wieder zurück in das sarkoplasmatische Retikulum pumpt, verringert und die Relaxation des Myokards beschleunigt, also positiv lusitrop und inotrop wirkt (Gekle et al. 2010; MacLennan und Kranias 2003). PLB wird unter Noradrenalin-Einfluss an der Aminosäure Serin-16 (SER16) durch die PKA und bei Threonin-17 (THR17) durch die Calcium-Calmodulin abhängige Proteinkinase Ca<sub>2+</sub>/CaM-K phosphoryliert (MacLennan und Kranias 2003), wobei in Versuchen mit SER16- bzw. THR17-Knockout-Mäusen gezeigt wurde, daß die SER16-Phosphorylierung eine deutlich wichtigere Rolle spielt (Chu et al. 2000). Die Regulation der Phosphorylierung ist von einem Gleichgewicht der Proteinkinasen und Phosphatasen abhängig. Die Serin-Threonin abhängige Phosphatase 1 (PP1) ist für die Umkehr vieler von der Proteinkinase A vermittelten

Reaktionen am Herzen verantwortlich. Die regulatorischen Proteine Inhibitor 1 und Inhibitor 2 kontrollieren wiederum die Aktivität der PP1 (Vafiadaki et al. 2013).

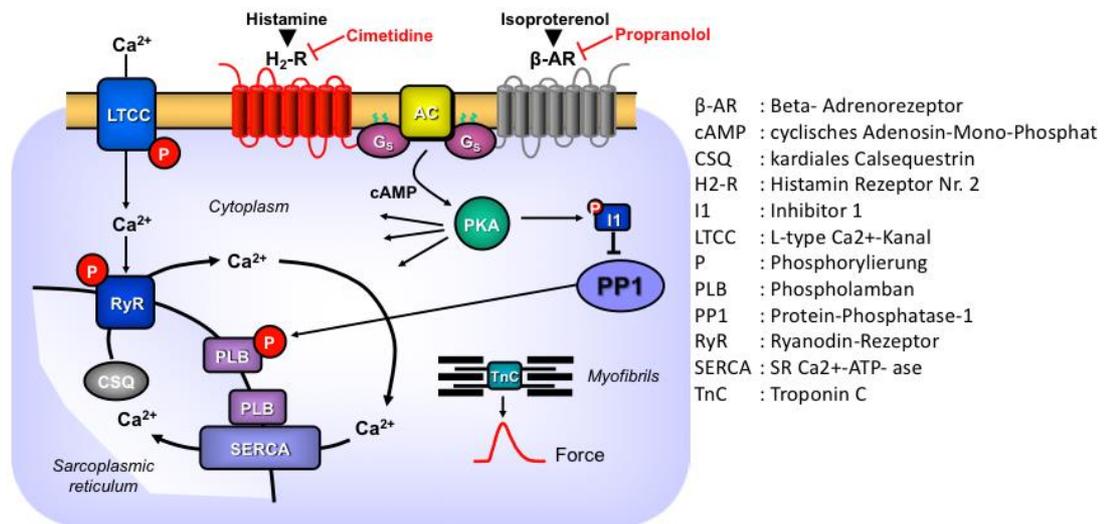


Abbildung 2: Signaltransduktion des Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptors

Histamin bindet an den Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor und Noradrenalin/Isoprenalin an den  $\beta$ -Adrenorezeptor ( $\beta$ -AR). Noradrenalin aktiviert ein G<sub>s</sub>-Protein, wodurch mittels cAMP die Proteinkinase A (PKA) in ihrer Aktivität gesteigert wird. Diese wiederum phosphoryliert in der Zelle diverse Zielproteine. Dazu gehört das Phospholamban (PLB), dessen hemmende Wirkung auf die Ca<sup>2+</sup>-ATP-ase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) dadurch beendet wird und die Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme in das SR beschleunigt. Die Protein-Phosphatase-1 (PP1) ist für die Umkehr dieser Reaktion zuständig. Sie wird durch den Inhibitor 1 (I1), welcher ebenfalls durch die PKA aktiviert wird, gehemmt. Beide Zielproteine der PKA, PLB und I1, tragen zur positiv inotropen und positiv lusitropen Wirkung bei. Auch Histamin ist an ein G<sub>s</sub>-Protein gekoppelt und nimmt wahrscheinlich zum Teil die gleichen Signalwege.

Kardiale Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptoren können allerdings auch an das G-Protein G<sub>q</sub> gekoppelt sein, wie 2013 von Wellner-Kienitz und Kollegen zum ersten Mal gezeigt werden konnte (Wellner-Kienitz et al. 2013). In Parietalzellen des Magens wurde dieser G<sub>q</sub>-Signalweg schon deutlich früher gefunden (Hill et al. 1997). Wo der G<sub>s</sub>-Signalweg über cAMP und PKA LTCC phosphoryliert, aktiviert G<sub>q</sub> über IP<sub>3</sub> und PLC die Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern (Wellner-Kienitz et al. 2013). Wichtig zu erwähnen ist außerdem, daß G-Protein-gekoppelte Rezeptoren im Allgemeinen eine aktivierte und eine inaktivierte Form besitzen, welche sich durch eine unterschiedliche Rezeptorkonformation unterscheiden. Einige dieser Rezeptoren, unter anderem auch die Histaminrezeptoren, besitzen deshalb eine Basalaktivität. Das heißt sie können spontan, ohne Bindung eines Agonisten, ihre Konformation ändern und so ein G-Protein aktivieren (Khilnani und Khilnani 2011).

### 1.5. Ischämie und Reperfusion

Grundsätzlich lautet die Definition von Ischämie, daß der Sauerstoffbedarf des Gewebes größer ist als seine Versorgung. Auf den Verschluss eines Gefäßes bezogen unterscheidet man dabei eine kurzzeitige, eine unvollständige und eine dauerhafte Ischämie (Iaizzo 2005). Auch wenn die Wiederversorgung mit Sauerstoff nach einer ischämischen Phase eine lebensnotwendige Maßnahme darstellt, kann es durch die Reperfusion zu Schäden am Myokard kommen, verursacht durch das sogenannte *Reperfusion-Paradoxon*. Bei Reperfusion wird durch die membranständigen Ca<sup>2+</sup>-Kanäle die intrazelluläre Calciumverfügbarkeit in kurzer Zeit stark erhöht. Eine Wiederaufnahme der Kontraktion unter hohen Calciumspiegeln kann im Herz zu verstärkter Kontraktilität und intrazellulären Ödemen führen. Letztlich kann die Zellmembran reißen und Zellen sterben ab. Die Verletzung des Myokards durch Reperfusion sollte von der durch Ischämie getrennt gesehen werden, wobei in Experimenten mit Ischämie und Reperfusion die Übergänge oft fließend sind (Ferreira 2010; Iaizzo 2005). Ein kurzzeitiger Gefäßverschluss kann entweder gar keine Auswirkungen auf das Herz haben, oder es nach Reperfusion wie betäubt (*stunned myocardium*) wirken lassen (Bolli und Marbán 1999). Es zeigt sich eine kurzzeitige kontraktile Dysfunktion, aber das Herz erholt sich vollständig. Ursache einer kurzzeitigen Okklusion könnte zum Beispiel ein schwerer Spasmus sein (Kloner and Jennings 2001a). Auf molekularer Ebene könnten freie Radikale, ein kurzzeitiger Calciumüberschuss oder eine verminderte Reaktionsfähigkeit der Myofilamente die geschwächte Herzfunktion provozieren (Bolli und Marbán 1999). Veränderungen in den Myofilamenten sind von späteren Untersuchungen unwahrscheinlicher eingestuft wurden, als oxidative Schäden (Kaplan et al. 2002). Andere Daten von menschlichem Gewebe sehen Änderungen der Myofilamente, besonders Proteolyse des Troponin I, durchaus als relevant an (McDonough et al. 2001). Ein weiterer Zustand relativer Ischämie ist das *Hibernation Myocardium*, des Myokards im Winterschlaf. *Hibernation* ist auch eine reversible kardiale Dysfunktion im Sinne einer verminderten Kontraktilität und unterscheidet sich vom *Stunning* vor allem dadurch, daß *Hibernation* nicht mit einer verminderten Koronargefäß-Durchblutung einhergeht. Man geht davon aus, daß eine vorübergehende Senkung des Sauerstoffbedarfs des Gewebes, um die relative Ischämie zu überstehen, die Ursache für das dysfunktionelle Myokard sein könnte (Kloner and Jennings 2001b; Zipes et al. 2018).

Murry et al. entdeckten 1986 erstmals, daß eine sogenannte *Ischämische Präkonditionierung*, also kurze ischämische Phasen vor einer langen Ischämie, einen kardioprotektiven Einfluß bezogen auf die postischämische Infarktgröße haben könnten (Kloner and Jennings 2001b; Lawson et al. 1993; Murry et al. 1986). Wie genau ischämische Präkonditionierung von klinischem Nutzen wäre, ist allerdings noch nicht vollständig geklärt (Williams et al. 2015).

## 1.6. Histamin und kardiale Arrhythmien

Schon relativ früh wusste man, daß die kardiale Histaminkonzentration in Abwesenheit von Sauerstoff, beziehungsweise bei Sauerstoffunterversorgung, anstieg. Folglich erhöht eine Ischämie die Histaminkonzentration (Anrep et al. 1936). Cameron und Kollegen (Cameron et al. 1985) zeigten in einer Untersuchung mittels EKG (Elektrokardiogramm) an ischämisch infarktgeschädigten und nicht geschädigten linken Ventrikeln des Meerschweinchens *in vitro*, daß Histamin in beiden Situationen die Schrittmachertätigkeit der Purkinjefasern steigerte, sowie Rhythmusstörungen, vorzeitige Depolarisationen und Spontandepolarisationen verursachte. Der Schwellenwert war allerdings in infarktgeschädigten Herzen niedriger, das heißt ein vorausgegangener ischämischer Schaden machte das Myokard anfälliger für Histamin, was sich wiederum mit selektiver Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-Blockade abschwächen ließ. Diese Ergebnisse entsprachen denen von Senges und Kollegen (Senges et al. 1977) an isolierten Meerschweinchen-Papillarmuskeln. Hier sorgte Histamin für eine gesteigerte und abnormale Schrittmachertätigkeit mit zusätzlichen Schrittmacherpotenzialen, wahrscheinlich ausgelöst in den Purkinjefasern. Auch für diesen Effekt wurde vor allem der Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor verantwortlich gemacht, da selektiver H<sub>2</sub>-Antagonismus dem Beschriebenen deutlich besser entgegenwirken konnte als ein Histamin-H<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonismus (Trzeciakowski und Levi 1982). Dai erweiterte die Theorie des Zusammenhangs von Histamin und einer Sauerstoffunterversorgung insofern, daß sich in der Ratte Ischämie und Histaminkonzentration bezogen auf die Verletzlichkeit des Myokards nicht nur in eine Richtung, sondern gegenseitig beeinflussen. Er stellte fest, daß Hypoxie-induzierte Arrhythmien unter Einfluß von Histamin schneller auftraten, als ohne (Dai 1989). Zudem wird die durch den Histamin-H<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelte verlangsamte AV-Überleitung als entscheidender arrhythmogener Faktor angesehen (Hageman et al. 1979). Eine verminderte Kraftentwicklung im Ventrikel macht sich zum Beispiel bemerkbar, wenn dieser nicht in regelmäßigen Abständen erregt wird. Allerdings ist Histamin nicht nur arrhythmogen, sondern senkt die Reizschwelle bei evoziertem Kammerflimmern *in vitro* in Meerschweinchenherzen schon in sehr geringen Dosen (< 1 pg/ml), dies geschieht wohl sowohl Histamin-H<sub>1</sub>- wie auch Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-vermittelt (Trzeciakowski und Levi 1982). Also hat Histamin eine arrhythmogene Wirkung auf das Herz verschiedener Spezies und eine Ischämie ist ein möglicher Reiz, der Histamin freisetzt. Außerdem macht es das Herz verwundbarer, als es in Abwesenheit von Histamin wäre. Es wird davon ausgegangen, daß sich diese Erkenntnisse auf den Menschen zumindest teilweise übertragen lassen und damit potenziell klinische Relevanz haben (He et al. 2012; Levi et al. 1982)

Es existieren darüber hinaus natürlich noch weitere Möglichkeiten, endogenes Histamin im Körper freizusetzen. Beim Meerschweinchen setzt Anaphylaxie Histamin frei, was zu vergleichbaren arrhythmogenen Effekten wie eine Ischämie führt. Diese Histaminwirkungen konnten nicht durch selektiven Histamin-H<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonismus beeinflusst werden, daher

spielt wohl auch hier eine Histamin-H<sub>1</sub>-H<sub>2</sub>-Rezeptor-Koaktivierung eine Rolle (Capurro und Levi 1973). Darüber hinaus wird während einer Anaphylaxie vom Koronarendothel Thromboxan freigesetzt, welches das Gewebe zusätzlich anfälliger für eine vaskulär bedingte Ischämie machen kann (Allan und Levi 1981). Außerdem verstärkte das während systemischer Anaphylaxie freigesetzte Leukotrien D<sub>4</sub> den positiv chronotropen Effekt von Histamin, ebenfalls im Meerschweinchen (Burke et al. 1982). Eine weitere Möglichkeit zur potenziell pathologischen Histaminfreisetzung besteht in der Applikation diverser Pharmaka, dazu gehören unter anderem Morphin (Moss und Rosow 1983), einige Antibiotika und nicht-opioid Analgetika (Yilmaz et al. 2009). Auch Stress ist ein bekannter Histamin-freisetzender Reiz mit kardialer Relevanz (Huang et al. 2002). Zuletzt spielt Histaminfreisetzung noch bei der Bypasschirurgie, also primär am Menschen, eine wichtige Rolle: In einer Studie von Cirkel und Kollegen (Cirkel et al. 1994) aus dem Jahr 1994 sprach einiges dafür, daß Histamin eine Mitschuld an postoperativen Arrhythmien tragen könnte. Nach CABG-Operationen (*engl. coronary artery bypass grafting*) war nicht nur die Plasmakonzentration an Histamin höher, auch zeigten Patienten mit Histamin-H<sub>1</sub>-Rezeptor und Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-Antihistaminika-Vorbehandlung signifikant weniger postoperative Arrhythmien.

### **1.7. Histamin und Herzinsuffizienz**

Herzinsuffizienz ist eine der häufigsten Erkrankungen der westlichen Welt und darin definiert, daß das Herz nicht in der Lage ist, die metabolischen Anforderungen der Peripherie zu erfüllen (Zipes et al. 2018). Es gibt mehrere Einteilungen, die der New York Heart Association erfolgt zum Beispiel anhand der klinischen Einschränkung des Patienten in Schweregrad I-IV (Dolgin 1994). Durch die mangelnde Blutversorgung kann es zu vermehrter Ausschüttung von Noradrenalin und damit zu tachykarden Rythmusstörungen und anderen Arrhythmieformen kommen. Eine Ursache der Arrhythmogenese bei der Herzinsuffizienz ist eine Störung im Ca<sub>2+</sub>-Haushalt der Zelle. Es gibt Hinweise darauf, daß diese Störung durch eine veränderte Phosphorylierung zustande kommt. Durch eine gesteigerte Aktivität der PP1 könnte es einerseits zu einer Hemmung der SERCA durch PLB kommen, andererseits könnte der Ryanodinrezeptor über eine vermehrte PKA-Aktivierung überphosphoryliert werden. Damit wäre der Ausstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum erhöht, während die Wiederaufnahme verringert ist, zudem könnte es zum Ca<sub>2+</sub>-Leckstrom kommen (Ikeda et al. 2008).  $\beta$ -Adrenorezeptor-Blocker stellen eine bekannte Therapiemöglichkeit bei Herzinsuffizienz dar (Braunwald und Bristow 2000; Bristow 1997). Allerdings gab es zuletzt auch einige Studien, die dem Histamin-H<sub>2</sub>-Antagonismus einen kardioprotektiven Effekt bei der Herzinsuffizienz zusprachen, entweder in Kombination mit  $\beta$ -Adrenorezeptor-Blockern (Kim et al. 2006), aber auch ohne diese (Takahama et al. 2010).

## **2. Fragestellung**

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, spielt die Wirkung von Histamin eine entscheidende Rolle bei der Herzfunktion, insbesondere bei der Entstehung kardialer Arrhythmien durch Ischämie.

Ziel dieser Arbeit sollte sein, den Histamin H<sub>2</sub>-Rezeptor am Herzen näher zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde ein Tiermodell mit Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-überexprimierenden Mäusen und Wildtyp-Tieren verwendet. Um das vollständige Herz *in vitro* untersuchen zu können, wurde dafür eine Langendorff-Versuchsanordnung, das isoliert perfundierte Herz, gewählt und die Herzaktionen dabei fortlaufend aufgezeichnet. Durch Zugabe von herzwirksamen Substanzen sollten sich die Auswirkungen dieser Rezeptor-Überexpression näher definieren lassen. Um zusätzlich die Rolle des Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptors bei der Genese von Arrhythmien zu untersuchen, wurden die Herzen beider Maustypen einer Ischämie mit anschließender Reperfusion unterzogen. Später wurden die Herzen aus allen Versuchsbedingungen biochemisch mittels des Western-Blots untersucht.

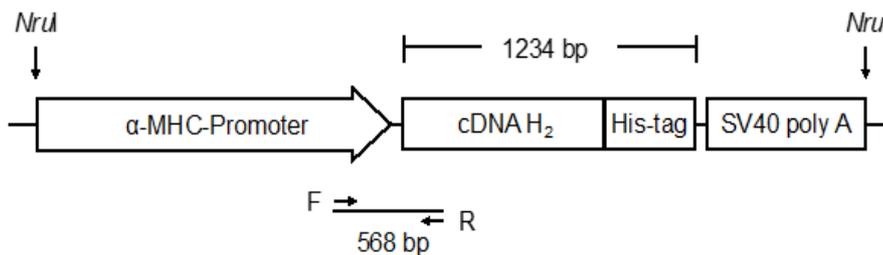
Die Rolle des Histamins als potenziell arrhythmogen wurde schon mehrfach beleuchtet, ebenso gibt es einige Studien zur Rolle des kardialen Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptors in diesem Zusammenhang. Diese Arbeit soll zusätzlich untersuchen, ob der Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor schon unter basalen Bedingungen pathologische Einflüsse auf das Myokard haben kann.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Tiermodell

In allen Versuchsreihen wurden Wildtyp-Mäuse (WT) und deren transgene, Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-überexprimierte Geschwistertiere (TG) verwendet. Zur Generierung dieses transgenen Mausmodells wurde die genetische Information (cDNA) des menschlichen Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptors verwendet, welche dem Institut freundlicherweise von Professor Dr. Seifert von der Universität Hannover zur Verfügung gestellt wurde. Um eine kardiale Expression des Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptors in der Maus zu ermöglichen, wurde die Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-cDNA in eine Expressionskassette eingefügt, also in eine DNA-Sequenz, die in den Kardiomyozyten der Maus abgelesen werden kann. Dazu wurde ein herzspezifischer Promotor verwendet, die  $\alpha$ -Isoform der schweren Kette des Myosins ( $\alpha$ -MHC). Als Terminierungssequenz wurde eine Poly-A-Sequenz des Simian-Virus 40 verwendet. Diese Expressionskassette, wie in Abb. 3 dargestellt, wurde in befruchtete Eizellen des Mausstammes FBV/N eingefügt. Die so erzeugten transgenen Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor überexprimierenden Tiere wurden in einen CD1-Hintergrund eingekreuzt.

Es wurden zu gleichen Teilen männliche und weibliche Mäuse verwendet, im Alter von sechs Monaten und einem durchschnittlichen Gewicht von 39,2 Gramm. Die Tiere wurden nach Geschlechtern getrennt gehalten. Ihnen stand frisches Wasser und handelsübliches Labortierfutter zur freien Verfügung. Die Reinigung der Käfige und die Versorgung der Versuchstiere fanden den gesetzlichen Vorschriften entsprechend durch die Zentrale Tierhaltung der Medizinischen Fakultät der MLU statt.



Genotypisierungs-PCR:

F = Forward-Primer: MHC-Seq-P1 (5'-ACCCTTACCCACATAGACC-3')

R = Reverse Primer: hH2R-SEQ-P1R (5'-AGCAGGTCAGTGATAGCCAA-3')

Produktgröße: 568 bp

Abbildung 3: Genkonstrukt

Es wurde die kodierende Sequenz des menschlichen Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptors kombiniert mit einem C-terminalen His-tag (=6x Histidin) in die Herzmuskelzell-spezifische Expressionskassette inkloniert.

### 3.2. Langendorff-Versuche

Bei einer Langendorff-Apparatur handelt es sich um eine Vorrichtung, um ganze Herzen *ex vivo* eine begrenzte Zeit zu Versuchszwecken weiter versorgen zu können. Ein frisch entnommenes Herz wird hierbei kontinuierlich mit einer nährstoffhaltigen, oxygenierten und temperierten Pufferlösung perfundiert. Zusätzlich können externe Reize und Substanzen zugeführt werden. Letztlich beschränkt sich die Funktionsweise der Langendorff-Apparatur auf eine Versorgung der Herzkranzgefäße. In die Aorta wird eine Kanüle bis kurz vor die Aortenklappe vorgeschoben, eine Pumpe baut einen konstanten hydrodynamischen Druck der Perfusionsflüssigkeit auf. Dieser Druck verschließt die Aortenklappe und die Flüssigkeit kann in die Koronararterien gelangen und das Herzgewebe versorgen (Dhein et al. 2005). Hier wurde eine Apparatur mit konstanter Fließgeschwindigkeit verwendet. Diese Methode wurde von Oskar Langendorff 1895 in Rostock vorgestellt (Langendorff 1895) und stellt bis heute eine weit verbreitete Untersuchungsmethode in der Herzforschung dar, unter anderem auch da das Organ unabhängig von systemischen Einflüssen untersucht werden kann (Owen 1977).

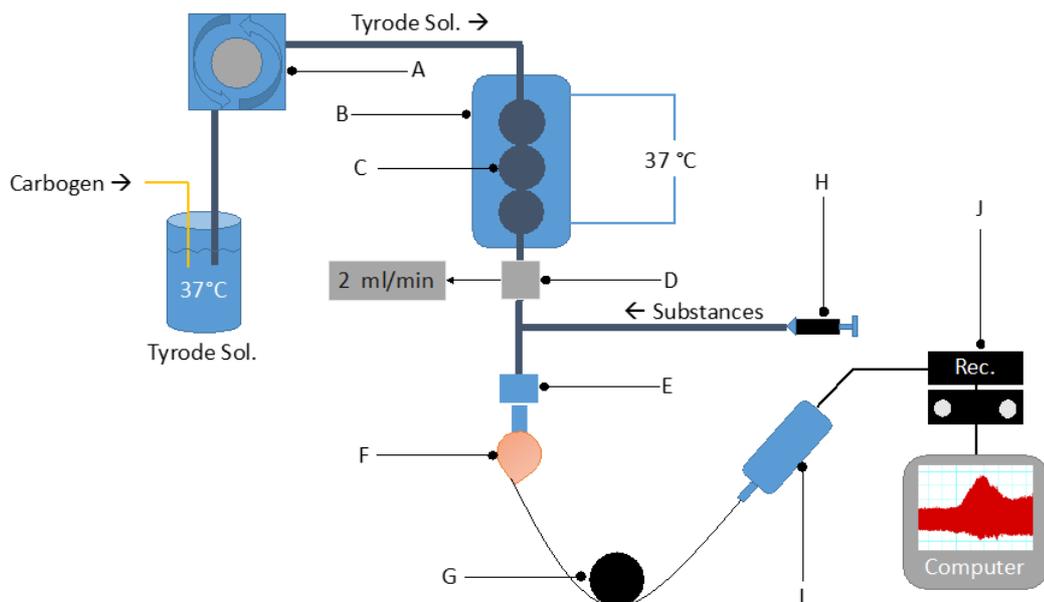


Abbildung 4: Schemazeichnung der Langendorff-Apparatur

Die temperierte und Carbogen-begaste Tyrode-Lösung wird über eine Rollpumpe (A) mit konstanter Flussgeschwindigkeit in die Langendorff-Apparatur eingeschleust. Die physiologische Körpertemperatur von 37°C wird mit einem Wärmetauscher (B) aufrechterhalten. Eine Blasenfalle (C) soll Embolien durch Luftblasen verhindern, über ein Flussmessgerät (D) wird die Fließgeschwindigkeit kontrolliert. Das über eine Kanüle (E) in die Anlage eingehängte Langendorff-Herz (F) ist durch ein Metallhäkchen an eine Umlenkrolle (G) gekoppelt, die kontraktile Werte des Herzens über einen Kraftaufnehmer (I) und einen Brückenverstärker/Digitalisierer (J) an den Computer leitet. Über eine Pumpenanlage (H) können dem System Substanzen beigeführt werden. (Rec = engl. Recording, Aufnehmen; Sol. = engl. Solution, Lösung)

### **3.2.1. Kalibrierung und Vorbereitung der Anlage**

Die Langendorff-Apparatur wurde vor jeder Inbetriebnahme zunächst mit 20%-Ethanol in Wasser gereinigt und anschließend mit entmineralisiertem Wasser mindestens 30 Minuten gespült. Die während der Reinigungsschritte mittels einer Sartorius-Filteranlage gereinigte Tyrode-Nährlösung (siehe Anhang) wurde auf 37°C erwärmt, oxygeniert (Carbogen, 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>) und blasenfrei in die Langendorff-Apparatur eingespeist. Ein konstanter Fluß von 2 ml/min wurde durch eine Peristaltikpumpe und ein Flußmeßgerät gewährleistet, die Regulierung des Flusses erfolgte manuell. Um eine korrekte Übertragung der später gemessenen Kontraktionskraft zu gewährleisten, wurden alle verwendeten Messgeräte nach jedem Versuch mit entmineralisiertem Wasser gereinigt.

### **3.2.2. Präparation der Herzen**

Zu Beginn wurde jedes Tier in einen separaten Kunststoffkäfig gesetzt und die Identität der Maus nochmals anhand ihrer Ohrmarkierung sichergestellt, diese war im Vorfeld im Zusammenhang mit der Genotypisierung (TG/WT) zugeordnet worden. Die Durchführung dieses Verfahrens wird in Kapitel 3.3 nochmals genau erläutert. Ebenfalls wurden alle Versuchstiere gewogen. Nach der Injektion von 1,5 mg/kg/Körpergewicht Pentobarbital zur Anästhesie und 1000 IE = 0,2 ml Heparin intraperitoneal als Antikoagulation wurde der Zeitpunkt der sichtbaren Betäubung abgewartet und die erforderliche Tiefe der Anästhesie mit einem Schmerzreiz überprüft. Wenn das Tier keine Reaktionen mehr zeigte, wurde im fixierten Zustand die ventrale Haut längs mit einer abgerundeten Schere aufgeschnitten, der Rippenboden dargestellt und ebenfalls eröffnet, das Herz wurde nun unter Schonung möglichst großer Teile des Aortenbogens entfernt und sofort mit einer bereitgestellten und etwas heparinisierte gekühlten Tyrode-Lösung gereinigt. Um eine spätere Nachgenotypisierung möglich zu machen, wurde noch ein etwa 0,5 cm langes Stück Schwanzspitze entnommen. Dieses wurde, wie auch nach Versuchsdurchführung das Herz, in einem 2 ml-Reaktionsgefäß in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Damit die Schädigung des Gewebes weitestgehend vermieden werden konnte, wurde das entnommene Herz sofort, nachdem es in ein mit Carbogen begastes, mit Tyrode befülltes, Präparationsgefäß gegeben wurde, mithilfe eines Mikroskops auf eine Kanüle mit ringförmig verdicktem Ende mit einem Bindfaden unter Schonung der Herzklappen über die Aorta fixiert und erneut mit oxygenierter Tyrode-Lösung gespült. Nach kurzen Entfernungen von Fett- und Lungengewebsresten konnte das Herz auf der Kanüle in die Langendorff-Apparatur eingehängt werden, wobei auch hier strikt auf Blasenfreiheit geachtet wurde, um eine Schädigung des Gewebes durch Embolie zu vermeiden. Durch die Herzspitze führte man nun zuletzt ein Metallhäkchen ein, welches mit einem Metalldraht über eine bewegliche Kunststoffrolle mit einem Kraftaufnehmer verbunden war (vgl. Abb. 4). Über diesen Kraftaufnehmer wiederum konnten die herzmechanischen Daten

erfasst werden. Vor der Durchführung jedes Versuchs wurde eine Zeitspanne 20 Minuten eingehalten, bis das Herz sich im Sinusrhythmus befand.

### 3.2.3. Versuchsreihe 1: Agonisten-Antagonisten-Versuche

Im ersten Teil der *in vitro* Versuche wurde der Effekt der WT- und TG-Mauserzen auf verschiedene Substanzen untersucht, und zwar nach folgendem Schema: Nach der wie oben beschriebenen „Kalibrierungsphase“ von 20 Minuten wurde die gewählte Substanz durch eine Braun-Injekt-Pumpanlage für genau 5 Minuten in das System eingeleitet und der Effekt des Herzgewebes aufgezeichnet. Danach wurden die Herzen zur späteren Laboranalyse eingefroren. Zunächst wurde 1  $\mu\text{M}$  Isoprenalin (ISO) (vgl. Abb. 5), ein nicht-selektives  $\beta$ -Sympathomimetikum, bei beiden Genotypen zur Stimulierung der  $\beta$ -Adrenorezeptor-vermittelten Wirkung angewendet. Eine funktionsfähige Expression dieses adrenergen Rezeptors in beiden Versuchstypen sollte so überprüft werden. Außerdem dienten diese Versuche als Positivkontrolle für eine erfolgreiche Präparation. Des Weiteren sollte der Effekt von 1  $\mu\text{M}$  Histamin (HIS) auf WT- und TG-Tierherzen untersucht werden. Damit sollte die Expression des klonierten Histamin- $\text{H}_2$ -Rezeptors und dadurch eventuelle Unterschiede zu WT festgestellt werden. Um darüber hinaus darzustellen, ob die so herbeigeführten Effekte tatsächlich Histamin- $\text{H}_2$ -Rezeptor-vermittelt waren, wurde im nächsten Versuchsablauf 1  $\mu\text{M}$  Histamin in Kombination mit 100  $\mu\text{M}$  Cimetidin (CIM), einem Histamin- $\text{H}_2$ -Rezeptor-Antagonisten, zugeführt. Um die alleinige Wirkung von Cimetidin auf die Herzen zu untersuchen, wurde dieselbe Menge ohne zusätzliche Gabe von Histamin untersucht. Letztlich wurde zur Kontrolle noch dieselbe gefilterte Tyrode-Lösung in der zuführenden Spritzenanlage verwendet, mit der auch die gesamte Langendorff-Apparatur befüllt worden war (vgl. Abb. 4). Diese letzte Versuchsbedingung diente zur Erfassung basaler Parameter für die weiterführende Labordiagnostik.

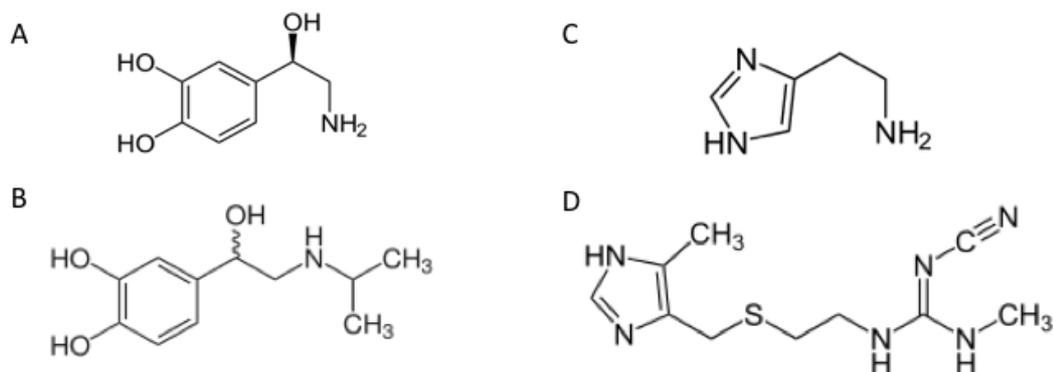


Abbildung 5: Strukturformeln verwendeter Substanzen  
Strukturformeln von Noradrenalin (A) und des  $\beta$ -Adrenorezeptor-Agonisten Isoprenalin (B).  
Histamin (C) und der Histamin- $\text{H}_2$ -Rezeptor-inverse Agonist Cimetidin (D).

### 3.2.4. Versuchsreihe 2: Ischämie und Reperfusion

Im zweiten Teil der *in vitro*-Versuche wurde der Einfluß eines Sauerstoffmangels auf die WT- und TG-Mäuseherzen mit einer Stop-Flow Ischämie untersucht. Dazu wurde die Pumpe abgeschaltet und das Herz nicht mehr mit Nährstoffen oder Sauerstoff versorgt. Nach derselben Kalibrierungsphase von etwa 20 Minuten wurde der Fluss für exakt 20 Minuten unterbrochen, um dann die Herzen für 15 Minuten zu Reperfundieren. Herz und Schwanzspitze wurden auch nach diesem Versuch eingefroren. Insgesamt wurden die Maus Herzen also etwa 60 Minuten in der Langendorff-Apparatur untersucht. Um eventuelle Folgen der reinen Verweilzeit außerhalb des Organismus, wie zum Beispiel Gewebeschäden und deren Effekte ausschließen zu können, wurden zur Kontrolle sogenannte „Zeitkontrollen“ (TC), also eine Aufzeichnung der Herzmechanik ohne zusätzliche Einflussnahme über etwa 60 Minuten, durchgeführt.

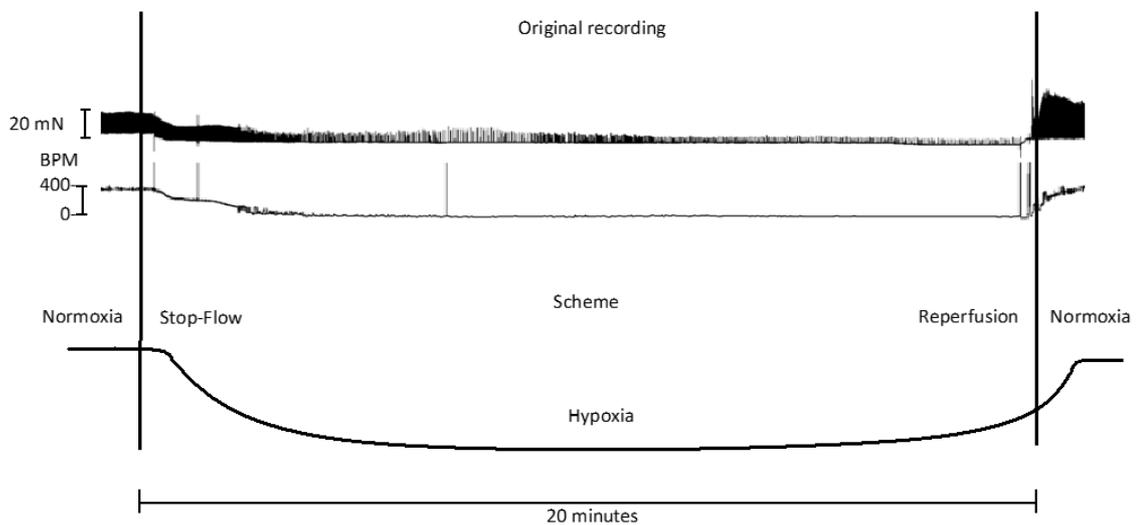


Abbildung 6: Schemazeichnung Ischämie und Reperfusion

Die Herzen von WT und TG wurden einer 20-minütigen Stop-Flow Ischämiephase ausgesetzt. Danach wurde die Pump-Anlage wieder eingeschaltet, die Tierherzen wurden für 5 Minuten reperfundiert.

### 3.2.5. Datenerfassung

Wie bereits beschrieben, wurden die Herzkontraktionen über eine Umlenk-Rolle, welche mit einem Kraftmesser verbunden war, für die Datenerfassung aufgezeichnet. Die Daten des Kraftmessers wurden verstärkt, digitalisiert und mit dem Programm LabChart 5 am Computer aufgezeichnet, daraus wurden dann die Werte für die statistische Auswertung mit den Programmen Microsoft Excel und Graphpad Prism 5 entnommen. Aufgezeichnet wurden Kontraktionskraft, Herzfrequenz, Anspannung- und Erschlaffungszeit des Myokards, außerdem die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit. Grafiken wurden mit Prism 5 und Microsoft PowerPoint erstellt.

### **3.3. Genotypisierung**

Um die gezüchteten Mäuse in Wildtypen oder Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-überexprimierte transgene Tiere zuordnen zu können, wurde den Tieren im Alter von vier Wochen zwei Millimeter ihrer Schwanzspitze entfernt, außerdem wurden die Tiere am Ohr markiert, um sie auch später identifizieren zu können. Die Genotypisierung fand mit einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) statt. Bei diesem Verfahren kann eine DNA mit Hilfe genspezifischer Primer an definierten Stellen zu Fragmenten bekannter Größe vervielfacht werden. Die Auftrennung im Agarosegel ermöglicht die Größenbestimmung der vervielfältigten DNA-Fragmente. Zur Vorbereitung wurden die Proben mit 250 µl Lösung 1 zur alkalischen Zersetzung des Gewebes über Nacht bei 55°C im Thermomixer schüttelnd inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl Lösung 2 zur Neutralisierung konnte damit der PCR-Ansatz hergestellt werden (s. Anhang). Dazu wurde ein Mastermix hergestellt, bestehend aus entmineralisiertem Wasser, den reverse- und forward-Primern, sowie vorgefertigtem 2-Fach Super Master Mix (Biotool). Zu 19 µl des angefertigten Mastermix wurde 1 µl DNA-Probe hinzugegeben. In einem Eppendorf „Mastercycler gradient“ durchliefen die Ansätze das entsprechende Programm zur Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-Genotypisierung (siehe Anhang). Währenddessen konnte das 1%ige Agarosegel vorbereitet werden: 1g Agarose pro 100 ml TAE-Puffer wurden aufgekocht, mit 10 µl Red-Safe-Farbstoff versetzt und in die Gelkammer gegossen, die Kämme eingesetzt und mindestens 30 Minuten polymerisiert. Nach Entfernen der Kämme wurde das Gel in eine mit TAE-Puffer gefüllte Gelkammer für eine horizontale Gelelektrophorese überführt und die Taschen mit den PCR-Produkten beladen. In die erste Tasche wurden 8 µl DNA-Größenmarker (100 bp-Leiter) zur Kontrolle des Laufes und zur Größenbestimmung der Banden gegeben, es wurde eine Stromstärke von 100 mA angelegt. Nach einer Laufdauer von etwa 20-30 Minuten wurde das Gel unter einem UV-Betrachter kontrolliert. Wenn sich die DNA-Leiter gut aufgetrennt hatte und die gewünschten Banden sichtbar waren, wurde das Agarosegel mit einer Kamera fotografiert und das Bild konnte ausgewertet werden. Alle verwendeten Tiere wurden vor Durchführung der Langendorff-Versuchsreihen genotypisiert.

### **3.4. Nachweis spezifischer Proteine im Western Blot**

Um die Effekte von Isoprenalin bzw. Histamin auf die Signaltransduktion im TG- und WT-Herzgewebe zu untersuchen, wurde die Phosphorylierung wichtiger regulatorischer Proteine mit Hilfe phosphorylierungsspezifischer Antikörper im Western Blot untersucht. Dies waren Phospholamban (PLB), phosphoryliert an Serin-16 und Threonin-17, sowie PP1-Inhibitor 1 (I1) und Troponin-inhibitor (TnI). Zur Kontrolle wurde auch die Expression der nicht-phosphorylierten Proteine bestimmt. Als Beladungskontrolle diente der Nachweis von Calsequestrin (CSQ).

### 3.4.1. Homogenisierung der Proben

Wie bereits beschrieben wurden die in der Langendorff-Apparatur untersuchten Herzen sofort nach Versuchsende in flüssigen Stickstoff eingefroren. Danach wurden sie bis zur späteren Verwendung bei -80°C gelagert. Im ersten Schritt zur Homogenisierung wurde das gefrorene Herz nach Zugabe von 100 µl Homogenisierungspuffer (NaHCO<sub>3</sub>/SDS-Lösung; Zusammensetzung s. Anhang) in einem Mikro-Dismembrator durch eine Stahlkugel bei 2700 rpm pulverisiert. Daraufhin wurde nochmals dieselbe Menge des Homogenisierungspuffers zugefügt und der Ansatz in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Probe wurde auf Eis gemischt und es folgte eine Ultraschallhomogenisierung (3 x 30 s). Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Probe bei 14.000 rpm in einer gekühlten (4°C) Eppendorffzentrifuge zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen und der Proteinüberstand (Homogenat) in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Proteinbestimmung nach Lowry.

### 3.4.2. Quantitative Bestimmung des Proteingehalts nach Lowry

Zur Ermittlung des Proteingehalts wurden nach dem Protokoll von Lowry (1954) eine Verdünnung von Proben und Mengenstandards mit Aqua dest. hergestellt. Als Proteinstandard wurde 1 mg Rinderserumalbumin in entmineralisiertem Wasser verwendet. Zu den Verdünnungen der Proben wurde je 500 µl Lösung D (+ 15 Minuten Inkubationszeit) und 0,1 ml Lösung E (siehe Anhang) zugegeben. Nach weiteren 15 Minuten Inkubation wurden Standard- und Probelösungen in Küvetten umgefüllt und mithilfe eines Eppendorf BioPhotometers die optische Dichte bei 595 nm bestimmt. Anhand einer Excel-Tabelle wurde der Proteingehalt anhand der mitgeführten Standardkurve berechnet und die Probenmenge für eine Verdünnung auf 1 µg Protein /µl Endvolumen berechnet.

### 3.4.3. SDS-Page

Die SDS-Page (engl. *Sodium dodecyl sulfat polyacrylamid gelelectrophoresis* = Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) beschreibt die Wanderung von Molekülen im elektrischen Feld und die Auftrennung anhand ihrer Größe (Laemmli 1970). Wir verwenden in unserem Haus bei der Herstellung des Trenngels ein Puffersystem nach Porzio und Pearson, um die Auftrennung noch zusätzlich zu verbessern (Porzio und Pearson 1977).

Für dieses Verfahren wurde in eine zuvor vorbereitete vertikale Elektrophorese-Apparatur mit 10%igem Trenngel und 4%igem Sammelgel Elektrophorese-Puffer eingefüllt. Dann konnten die zuvor verdünnten und mit 2 x Probenpuffer (siehe Anhang) angemischten und 10 Minuten bei 95°C im Thermomixer erhitzten Proben in die Taschen des Sammelgels pipettiert werden. Nicht genutzte Taschen wurden mit Probenpuffer befüllt, um eine Verzerrung der Spuren zu verhindern. Pro Probe wurden 60 µl mit einem Proteingehalt von 60 µg in die Taschen gegeben. Eine Tasche

wurde mit 20 µl eines Größenmarkers versehen (siehe Anhang). Die beladenen Gele wurden in eine auf 4°C gekühlte Elektrophoresekammer überführt und eine Stromstärke von 40 mA pro Gel angelegt. Auf diese Weise wanderten die Proteine über einen Zeitraum von ca. 240 Minuten durch das Trenngel. Wenn die Bromphenolblau-Front das Ende des Trenngels erreicht hatte wurden sie für den Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran entnommen.

#### **3.4.4. Western Blots**

Die Methode des Western Blots beschreibt eine Möglichkeit, die nach der SDS-Page im Gel enthaltenen Proteinbanden auf eine Membran zu übertragen und damit zur weiteren Untersuchung mit Antikörpern nutzbar zu machen. Dazu wurde das entnommene Gel in eine Transferrkassette geschichtet. Das Transfersandwich war folgendermaßen aufgebaut: ausgehend von der Kathodenseite (-) ein Schaumstoffschwamm, ein Blatt Blottingpapier, das Gel, eine Nitrocellulosemembran (0,45 µm), ein Blatt Blottingpapier und wieder ein Schaumstoffschwamm. Wichtig war, daß die Nitrocellulosemembran luftblasenfrei auf der Anodenseite des Gels platziert wurde. In einer Trans-Blot Zelle (BIO-RAD) konnten in Blotting-Puffer nun über Nacht bei insgesamt 4,5 Ampère-Stunden die im Gel enthaltenen Proteine auf die Membran übertragen werden. Am nächsten Morgen wurde mit einer reversiblen Ponceaurot-Färbung kontrolliert, ob der Transfer erfolgreich war.

#### **3.4.5. Immunologischer Proteinnachweis**

Die mit Ponceaurot gefärbte Membran wurde eingescannt, um die erfolgreiche Elektrophorese und den Transfer zu dokumentieren. Außerdem konnte diese Kopie als Vorlage für die Schnitthöhe auf der eigentlichen Membran genutzt werden. Die Proteinbanden des Proteinstandards wurden identifiziert, an ihnen konnte der Bereich, in dem sich die gewünschten Proteine befinden sollten, abgeschätzt werden. Nach dem Schneiden wurde der linke obere Rand der Membranstreifen markiert, um ein späteres falsches Ablesen zu vermeiden. Die Streifen wurden in geschlossene Inkubationskammern gelegt und mit 10 ml Tris-NaCl Puffer mit pH 7,4 (TBST) 3 x 10 Minuten schüttelnd ausgewaschen. Dann wurden die Streifen mit je 10 ml Blocking-Puffer weitere zwei Stunden schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert, um freie Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Als Ladungskontrolle der jeweiligen Gele wurde das Calsequestrin (CSQ) bestimmt, außerdem phosphoryliertes PLB (P-SER16, P-THR17), P-TnI und P-II als biochemischer Marker positiv lusitroper und inotroper Vorgänge (vgl. 1.3. und 1.4.). Außerdem wurde der Gesamtgehalt an Phospholamban bestimmt. Für die Inkubation mit dem CSQ-Antikörper wurde 5% Milchpulver in TBST verwendet, für alle anderen Antikörper wurde 2% BSA (*Engl. Bovine serum albumin* = Rinderserumalbumin) in TBST verwendet. Nach dem Blocken verlief der Immunoblot wie folgt: Inkubation mit dem primären Antikörper gegen das jeweilige Protein, der primäre Antikörper wiederum wurde von einem IgG

(sekundärer Antikörper) erkannt, der gegen die Antikörper des Tieres gerichtet war, aus dem der erste Antikörper stammt. Diese zweiten Antikörper waren mit einem Enzym -in diesem Fall die Alkalische Phosphatase (AP)- gekoppelt, welches beim Umsetzen eines Substrats ein Fluoreszenzsignal erzeugt. So konnten die Zielproteine detektiert werden. Nach Abschütten des Blocking-Puffers wurden also die ersten Antikörper hinzugefügt: Anti-CSQ, Anti-Phospho-DARPP-32 (= Phospho-Inhibitor 1), Anti-P-Serin-16-PLB, Anti-P-Threonin-17-PLB, Anti-PLB und Anti-P-TnI (Siehe Anhang). Diese Ansätze wurden über Nacht bei 4°C im Kühlraum schüttelnd inkubiert. Am Folgetag wurde wieder 3 x 10 Minuten mit TBST schüttelnd gespült, danach wurden die sekundären Antikörper appliziert: anti-mouse-IgG für CSQ und PLB, sowie anti-rabbit-IgG gegen die restlichen Antikörper. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden wurde auch dieser Antikörperansatz mit 3 x 10 Minuten TBST gewaschen und 2 x 2 Minuten mit AP-Puffer zur Einstellung des pH-Optimums von 9,4 für die Alkalische Phosphatase äquilibriert. Zuletzt erfolgte die ECF- (*enhanced chemofluorescence*) Färbung. Dazu wurden 10 ml ECF-Substrat-Lösung je Streifen in die Kammer gegeben und 5 Minuten dunkel inkubiert. Nach Abspülen mit AP-Puffer wurde das Ergebnis mit dem PhosphorImager (Tycoon 9410) bei 532 nm dargestellt und später mit dem Analyseprogramm ImageQuant und Microsoft Excel am Computer ausgewertet, wobei CSQ als Ladungskontrolle diente.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Tiermodell

Bei den verwendeten Labortieren handelte es sich um Mäuse der Linie CD1, darunter Wildtypen und transgene Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-überexprimierende Tiere. Äußerlich zeigten die Tiere keine sichtbaren Unterschiede voneinander, die Differenzierung nach Wildtyp (WT) und Transgen (TG) war nur nach Genotypisierung möglich. Ebenfalls in ihrer Entwicklung und in Ihrem Verhalten waren keine Unterschiede zwischen WT und TG zu bemerken. Direkt nach der Entnahme wurden die Herzen inspiziert, morphologisch konnten keine Anomalien bei den transgenen Mäusen festgestellt werden.

### 4.2. Versuchsreihe 1: Agonisten-Antagonisten-Versuche

Um zu untersuchen, wie sich TG- und WT-Herzen unter verschiedenen Bedingungen verhalten, wurden diese in der Langendorff-Apparatur mit unterschiedlichen Rezeptoragonisten und -antagonisten perfundiert. Dabei wurden vor Zugabe einer Substanz die Werte für Kontraktionskraft  $F$  (mN), Herzfrequenz (BPM, engl. *beats per minute*), Anspannungszeit  $T_1$  und Erschlaffungszeit  $T_2$  (ms) des Myokards, sowie die Kontraktionsgeschwindigkeit  $dF/dt_{max}$  und Relaxationsgeschwindigkeit  $dF/dt_{min}$  (mN/s) bestimmt (=Ausgangslage). Der Substanzeffekt wurde exakt fünf Minuten aufgezeichnet, dann wurden die Herzen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Kurz vor dem Einfrieren wurden nochmal dieselben Parameter erhoben, wie in der Ausgangssituation (=Effekt). Mit der Langendorff-Apparatur und einer sauerstoffreichen Nährstofflösung wurden annähernd physiologische Bedingungen simuliert.

Zunächst sollen die Unterschiede von WT und TG in ihrer Ausgangslage, also die Werte vor Substanzzugabe, dargestellt werden (siehe Abb. 7). Die absolute Kraftentwicklung war bei TG mit  $24,81 \pm 1,27$  mN kleiner als bei WT mit  $30,01 \pm 1,21$  mN ( $p < 0,05$ ). Die Ruheherzfrequenz (BPM) der TG lag allerdings bei  $437,45 \pm 18,71$  und war damit deutlich höher als beim Wildtyp mit  $297,16 \pm 8,41$  ( $p < 0,05$ ). Analog geht eine kürzere Anspannungs- und Erschlaffungszeit der TG von  $29 \pm 1,40$  und  $41 \pm 2,70$  ms im Vergleich zu der Zeit der Wildtypen ( $37 \pm 1,04$  und  $46 \pm 1,15$  ms) mit den Frequenzwerten einher. Auch zeigen die Kontraktionsgeschwindigkeit  $dF/dt_{max}$  sowie Relaxationsgeschwindigkeit  $dF/dt_{min}$  bei TG größere Werte:  $2308,14 \pm 311,50$  und  $-2264,55 \pm 296,91$  mN/s, im Vergleich zu WT:  $1232,04 \pm 197,94$  bzw.  $-1143,17 \pm 182,92$  mN/s. Somit unterschieden sich Wildtypmäuse und Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-überexprimierende Tiere in allen zu Beginn erhobenen Messwerten.

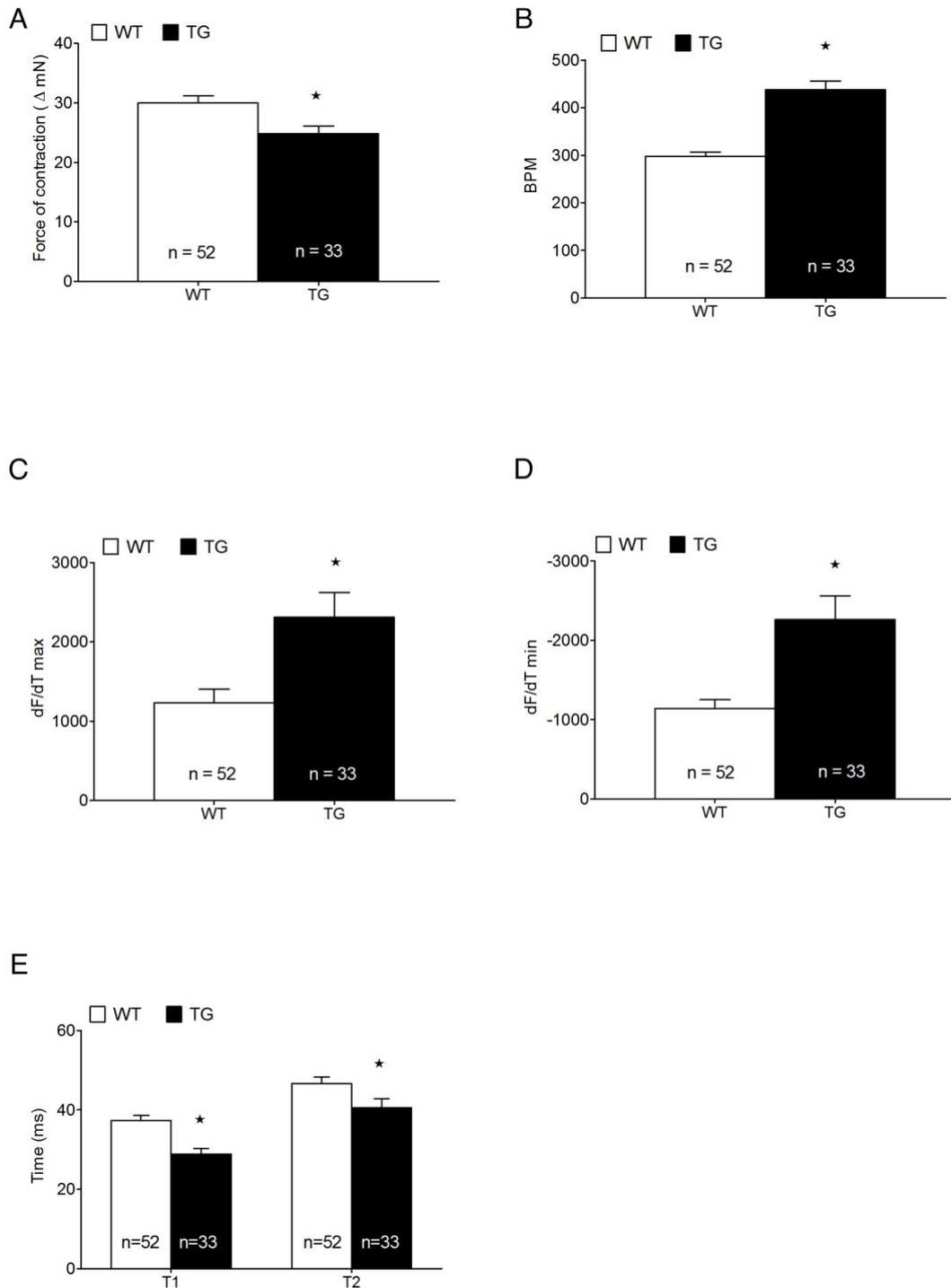


Abbildung 7: Basale Parameter von WT und TG im Vergleich  
 Basal zeigten die TG gegenüber den WT eine niedrigere Kraftentwicklung (A), höhere Herzfrequenzen (B), eine größere Spanne bei Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit (C, D) und kürzere Anspannungs- bzw. Erschlaffungszeiten (E). (\*  $p < 0,05$  vs. WT)

Zudem wurden alle Versuche auf das Vorhandensein von basalen Arrhythmien in den 10 Minuten vor Substanz/Ischämie-Effekt untersucht. Dabei zählte eine einzelne (einmalige) unregelmäßige Kontraktion als Artefakt, mehrere jedoch als Arrhythmie. Mäuseherzen mit Arrhythmien

unmittelbar vor dem jeweiligen Substanz-Effekt wurden nicht ausgewertet. Bei den WT hatten 48% Arrhythmien unter basalen Bedingungen, die transgenen Tiere lagen hier bei 70% (s. Abb. 8). Untersucht man die geschlechtsspezifischen Unterschiede in den Gruppen WT und TG, fällt kein Unterschied zwischen Männchen und Weibchen auf.

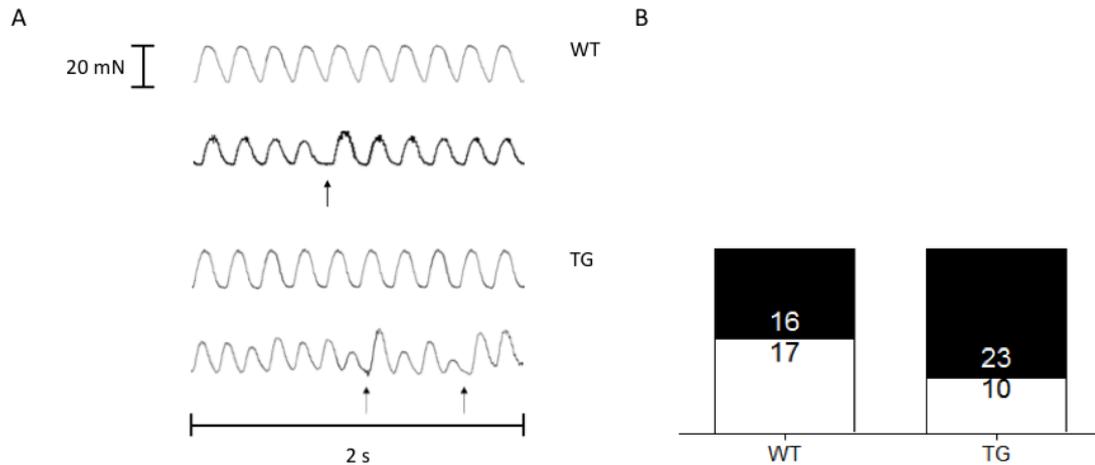


Abbildung 8: Basalarrhythmien

Originalmechanogramme von Arrhythmien bei WT und TG in der Äquilibrationsphase im Vergleich zum Sinusrhythmus (A) und Verteilung der Arrhythmiehäufigkeit (B). Die Rhythmusstörungen fanden bei TG häufiger statt.

Nach einer Äquilibrationsphase von 20 Minuten wurden die Herzen mit jeweils unterschiedlichen Substanzen perfundiert und nach 5 Minuten dieselben kontraktile Parameter erhoben, wie zu Anfang. Dabei ergaben sich folgende Versuchsgruppen: ISO (1  $\mu$ M Isoprenalin), HIS (1  $\mu$ M Histamin), CIM (100  $\mu$ M Cimetidin) und die Kombination von HIS und CIM. CTR (=Kontrolle) bezeichnet die Ausgangssituation als Vergleichswert.

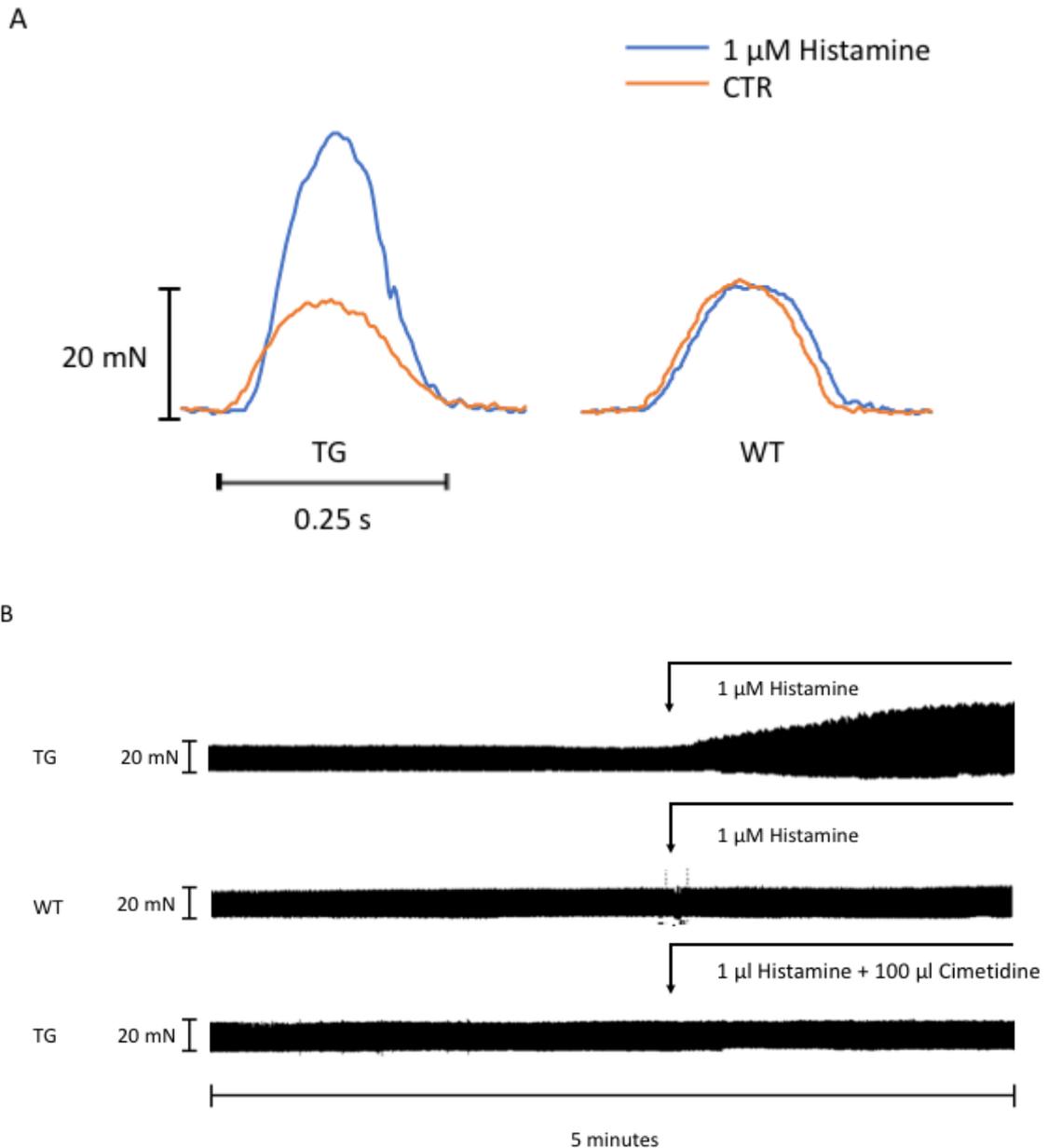


Abbildung 9: Positiv inotroper Effekt des Histamins

1  $\mu\text{M}$  Histamin führte zur Kraftzunahme bei transgenen Tieren, nicht jedoch bei Wildtypen (A). Dieser Effekt ließ sich mit 100  $\mu\text{M}$  Cimetidin aufheben (B). Der schwarze Pfeil markiert den Zugabezeitpunkt der Substanz, mit welcher das Herz bis Versuchsende perfundiert wurde.

Die Kontraktionskraft nahm bei Wildtypen unter dem Einfluß von Isoprenalin von  $30,01 \pm 1,21$  auf  $39,91 \pm 3,41$  mN zu ( $p < 0,05$ ). Unter den Bedingungen HIS, CIM und der Kombination aus Beiden konnte keine Änderung beobachtet werden (Abb. 10). Bei TG kam es bei ISO zu einer Steigerung der Kraft von  $24,81 \pm 1,27$  auf  $54,38 \pm 10,04$  mN ( $p < 0,05$ ). Ebenso wurde bei Applikation von 1  $\mu\text{M}$  Histamin eine Kraftzunahme auf  $41,07 \pm 4,32$  mN beobachtet ( $p < 0,05$ ). Dieser Effekt wurde in Kombination mit Cimetidin, einem Histamin- $\text{H}_2$ -Rezeptorantagonisten, in der Bedingung HIS+CIM unterdrückt, wie in Abb. 9 dargestellt ist. CIM allein hatte keine Auswirkungen auf die Kontraktionskraft.

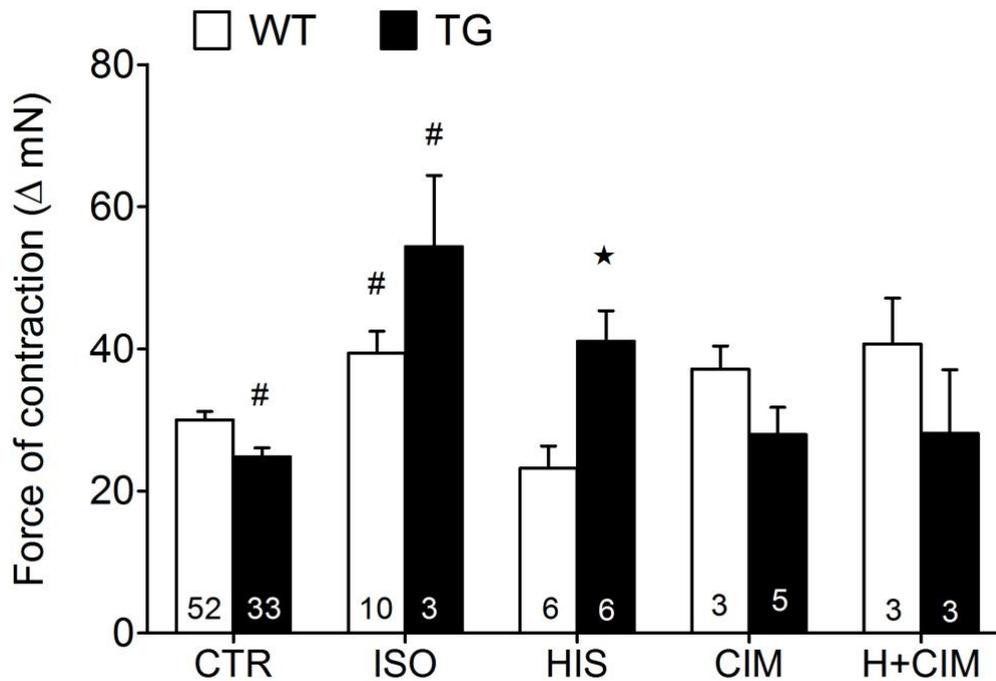


Abbildung 10: Kontraktionskraft

Bei transgenen Herzen kam es zu einer Zunahme der Kraft nach Zugabe von Isoprenalin oder Histamin. In Wildtypherzen hatte nur ISO diesen Effekt. (\*  $p < 0,05$  vs. WT, #  $p < 0,05$  vs. CTR)

Die Herzfrequenzen (Abb. 11) der Versuchsgruppen WT und TG unterschieden sich schon ohne Zugabe einer Substanz voneinander. Die Wildtyp-Tiere zeigten unter ISO eine Frequenzzunahme von  $297,16 \pm 8,41$  auf  $360,18 \pm 27,17$  bpm ( $p < 0,05$ ). Unter den anderen Substanzen ergab sich keine Änderung der Herzfrequenz. In der Gruppe TG zeigte sich nur bei ISO, nicht bei Histamin eine Erhöhung zur Ausgangssituation, außerdem waren die Werte unter dem Einfluß von Isoprenalin ( $564,24 \pm 80,88$  bpm) höher als die der Wildtypen unter ISO.

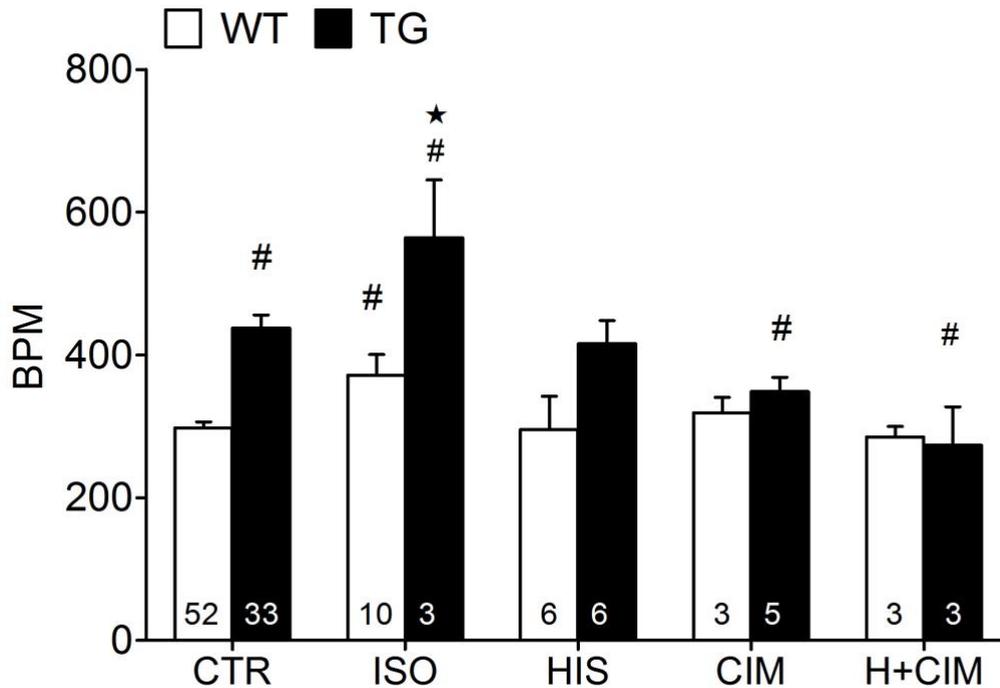


Abbildung 11: Herzfrequenz

ISO führte zu einer Zunahme der Herzfrequenz beim WT und TG. CIM senkte die Herzfrequenz, allerdings nur bei TG. (\*  $p < 0,05$  vs. WT, #  $p < 0,05$  vs. CTR)

Bei alleiniger Perfusion mit  $100 \mu\text{M}$  Cimetidin kam es jedoch bei transgenen Tieren zu einer Abnahme der Herzfrequenz von  $437,45 \pm 18,71$  auf  $348,37 \pm 20,34$  bpm. In Kombination von HIS und CIM war ebenfalls eine Frequenzminderung der TG auf  $273 \pm 53,63$  bpm zu registrieren. Eine zuvor niedriger gewählte Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  CIM hatte nicht die beschriebenen Effekte (siehe Abb.12).

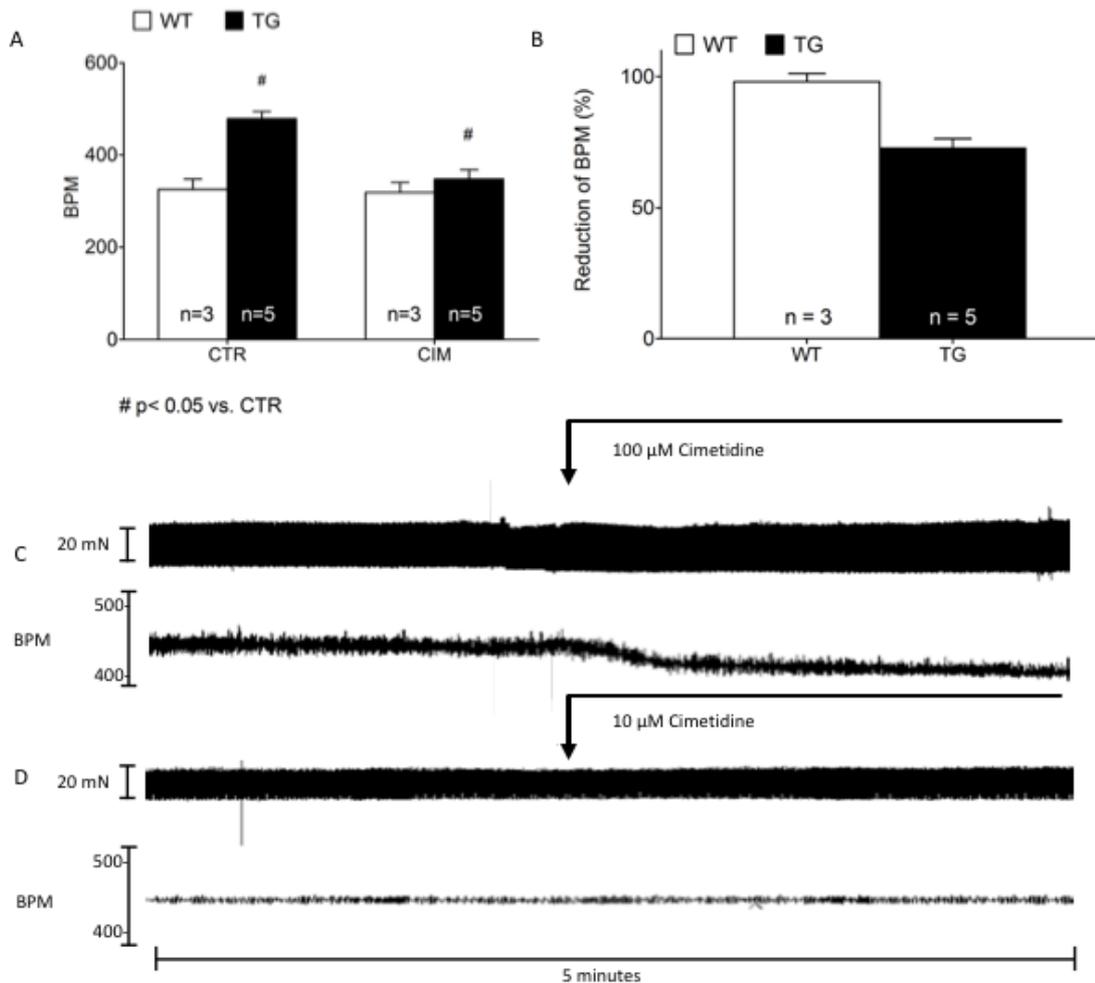


Abbildung 12: Frequenzabnahme unter Cimetidin-Einfluß  
 Cimetidin führte zu einer Abnahme der Herzfrequenz im TG, nicht jedoch im WT (A). Der Abfall betrug etwa 73% (B). Im Originalmechanogramm ist der Senkung der Herzfrequenz bei einer Gabe von 100 µM CIM deutlich sichtbar (C), bei einer niedrigeren Dosis findet er nicht statt (D). (# p < 0,05 vs. CTR)

Die Zeit bis zum Maximum einer einzelnen Kontraktion ( $T_1$  in ms) der transgenen Tiere war gegenüber der Zeit der Wildtypen schon in der Ausgangslage verkürzt. Es kam zu keiner weiteren Verkürzung bei TG unter den Bedingungen ISO oder HIS, allerdings sorgte die Perfusion mit 100 µM Cimetidin zu einer Verlängerung von  $T_1$  von  $29 \pm 1,40$  auf  $39 \pm 1,60$  ms. Bei den WT-Versuchen führte die Zugabe von Isoprenalin zu einer Verkürzung von  $T_1$  von  $37 \pm 1,03$  auf  $25 \pm 3,00$  ms. Weitere Veränderungen unter anderen Bedingungen fanden nicht statt (vgl. Abb. 13).

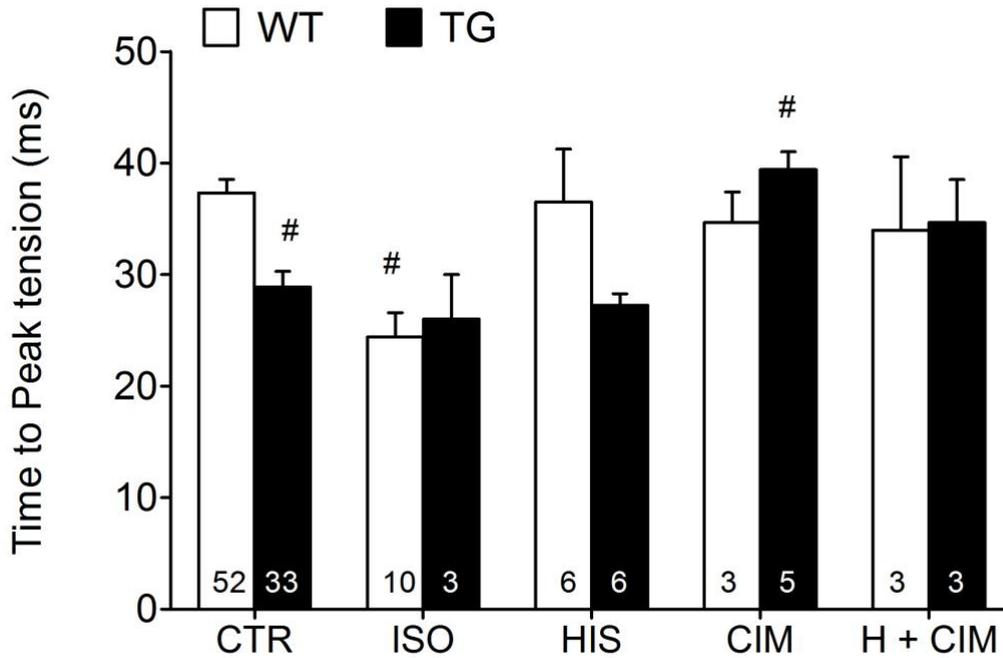


Abbildung 13: Kontraktionszeit T1

Zu einer Verkürzung der Anspannungszeit kam es beim Wildtypen nur unter Einfluß von Isoprenalin. Bei TG führte nur CIM zu einer Verlängerung. (#  $p < 0,05$  vs. CTR)

Des Weiteren wurde die Erschlaffungszeit T<sub>2</sub> untersucht. Auch hier lag bei TG der basale Zeitwert unter dem der WT. Bei den Wildtypen ist eine Verringerung der Zeit unter ISO von  $46 \pm 1,15$  auf  $29 \pm 4,10$  ms zu erkennen. Keine weitere Substanz veränderte die Erschlaffungszeit der Wildtypen. Bei den transgenen Tieren in der Bedingung mit alleiniger CIM-Perfusion war T<sub>2</sub> nicht verändert, jedoch verlängerte sich T<sub>2</sub> in der Kombination HIS+CIM auf  $62 \pm 19$  ms (vgl. Abb. 14).

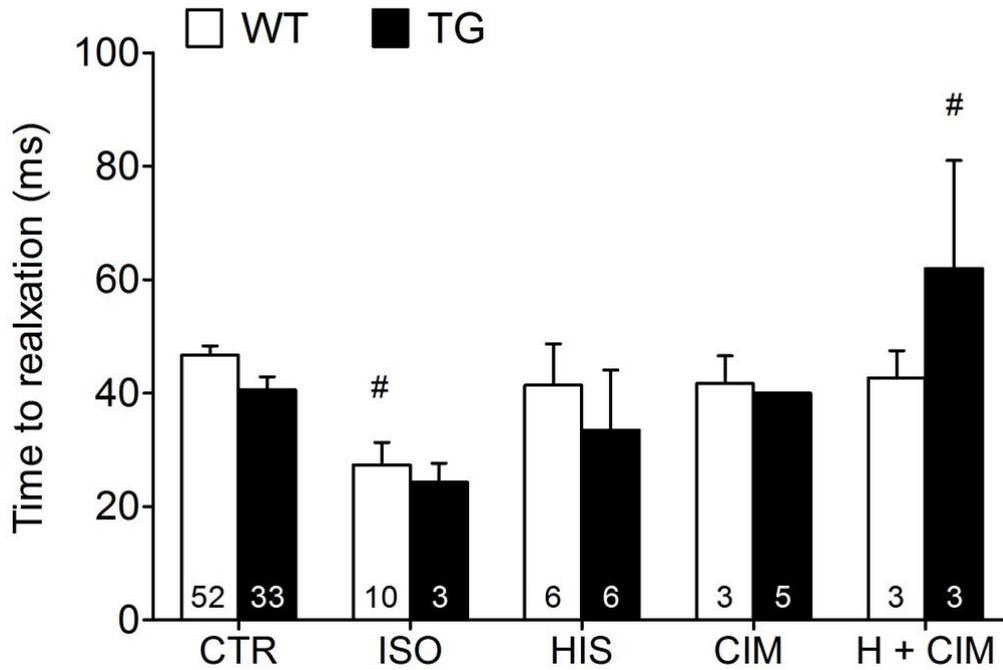


Abbildung 14: Erschlaffungszeit T<sub>2</sub>

Analog zu T<sub>1</sub> führte ISO beim Wildtyp wieder zu einer Verkürzung der Erschlaffungszeit. Beim transgenen Mäuseherz kam es unter HIS+CIM zu einer Verlängerung von T<sub>2</sub>. (# p < 0,05 vs. CTR)

Die Kontraktionsgeschwindigkeit  $dF/dt_{max}$  der TG war ebenfalls in der Ausgangslage schon höher als die der WT. Unter Einfluß von Isoprenalin wurde dieser Wert nochmals von  $2308,14 \pm 311,50$  auf  $5240,67 \pm 719,78$  mN/s erhöht. Der Anstieg unter Histamin war beim TG erhöht, sowohl gegenüber dem Ausgangswert, als auch gegenüber dem Wert der WT unter Histamin-Einfluss (auf  $3850,50 \pm 1034,50$  mN/s). Im WT-Versuch nahm unter dem Einfluß von Isoprenalin der Wert von  $1232,04 \pm 197,94$  auf  $2510,51 \pm 327,03$  mN/s zu. Des Weiteren fand keine Veränderung bei anderen Versuchsbedingungen statt (s. Abb. 15).

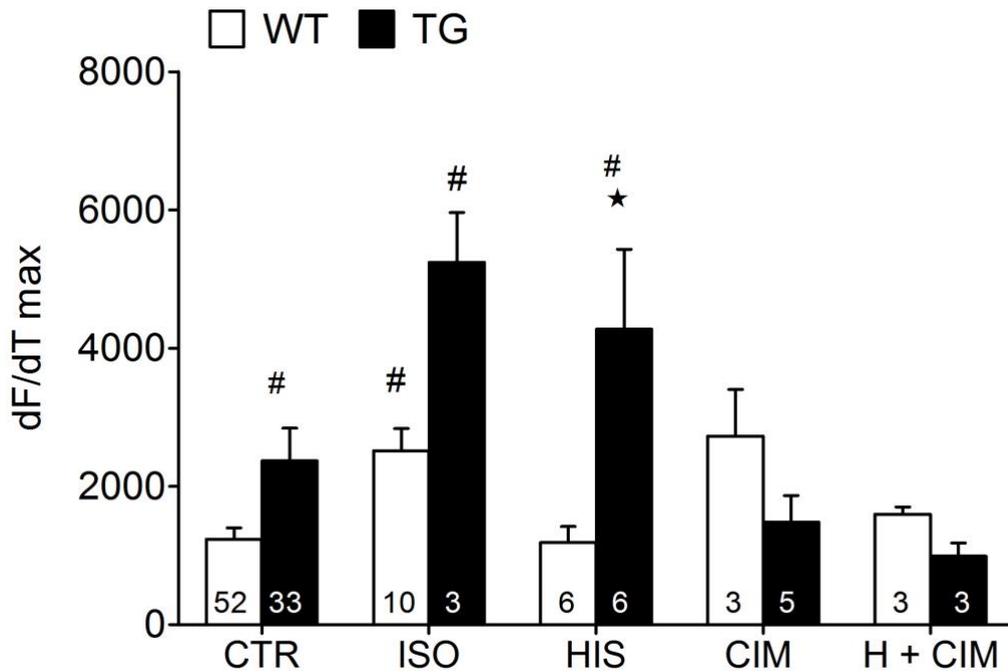


Abbildung 15: Kontraktionsgeschwindigkeit dF/dT max

Die relativ hohe Kontraktionsgeschwindigkeit dF/dt max der Transgenen wurde durch ISO und HIS weiter gesteigert. Beim WT kam es nur durch ISO zu einer weiteren Steigerung. (\* p < 0,05 vs. WT, # p < 0,05 vs. CTR)

Die Relaxationsgeschwindigkeit dF/dt<sub>min</sub> im Ventrikel lag vor Zugabe einer Substanz bei TG unter den Wildtypen. Hier ist für TG eine weitere Geschwindigkeitserhöhung bei ISO von  $-2264,55 \pm 296,91$  auf  $-6705,00 \pm 481,04$  mN/s und für HIS auf  $-4487,17 \pm 1327,00$  mN/s messbar. Beim Wildtyp erfolgte bei ISO eine Abnahme von  $-1143,17 \pm 182,92$  auf  $-2580,71 \pm 564,07$ . Auch hier wurde dF/dt<sub>min</sub> nicht in anderen Substanzversuchen verändert (s. Abb. 16)

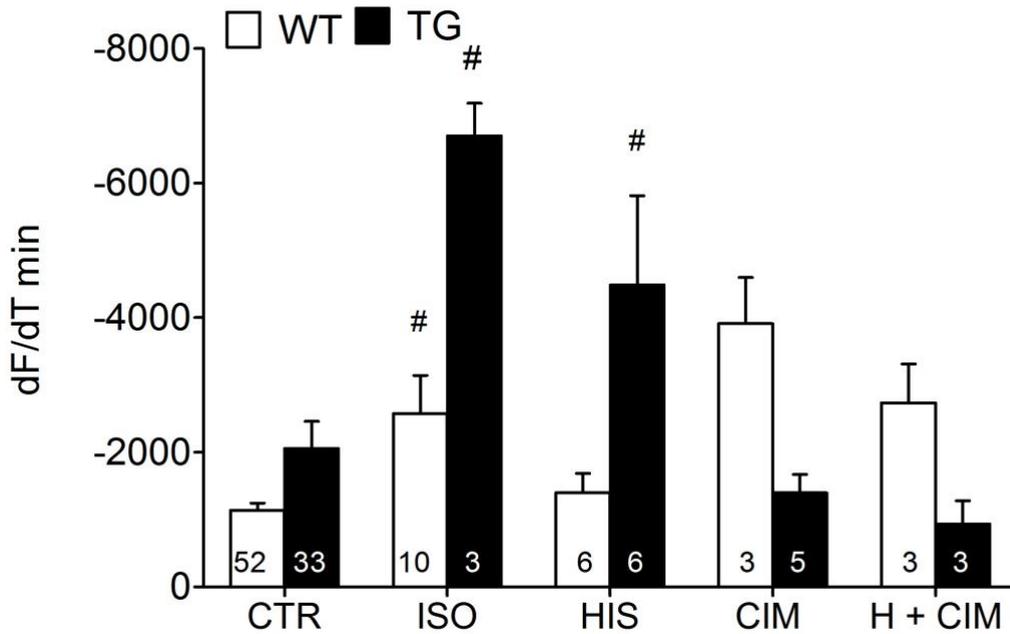


Abbildung 16: Relaxationsgeschwindigkeit dF/dT min

Die Werte der Relaxationsgeschwindigkeit wurden bei TG durch ISO und HIS deutlich vermindert. Beim Wildtyp hatte nur ISO diesen Effekt, nicht jedoch Histamin. (# p < 0,05 vs. CTR)

Tabelle 1: Zusammenfassung der Effekte bei TG

TG	Kraft	Frequenz	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	dF/dT <sub>max</sub>	dF/dT <sub>min</sub>
ISO	↑	↑	=	=	↑	↓
HIS	↑	=	=	=	↑	↓
CIM	=	↓	↑	=	=	=
HIS+CIM	=	↓	=	↑	=	=

- ↑ = Zunahme/Verlängerung
- ↓ = Abnahme/Verkürzung
- = = Keine Veränderung zur Ausgangssituation

Übersicht der Ergebnisse der Agonisten-Substanzversuche mit Isoprenalin (ISO), Histamin (HIS), Cimetidin (CIM) und einer Kombination aus HIS und CIM.

Zusammenfassend führte 1  $\mu\text{M}$  Isoprenalin (ISO) sowohl bei WT als auch bei TG zu einer Zunahme der Kontraktionskraft und Herzfrequenz (s. Tabelle 1). Die Anspannungszeit  $T_1$  war bei WT unter ISO im Vergleich zur Ausgangslage verkürzt, jedoch nicht bei transgenen Herzen.  $T_2$  war beim Wildtyp unter ISO verkürzt, nicht jedoch bei TG. Bei WT und TG war  $dF/dt_{\text{max}}$  vergrößert und  $dF/dt_{\text{min}}$  verringert. Die Perfusion mit 1  $\mu\text{M}$  Histamin (HIS) bewirkte nur bei TG eine Erhöhung der Kontraktionskraft, eine Frequenzerhöhung war nicht zu verzeichnen. Ebenfalls war  $dF/dt_{\text{max}}$  vergrößert,  $dF/dt_{\text{min}}$  verringert, und bei  $T_1$  und  $T_2$  keine Veränderung messbar. Im Wildtyp zeigte HIS keine Veränderung zur Ausgangslage. Zur Blockade des Histamin- $H_2$ -Rezeptors und damit einer Aufhebung des Histamineffekts wurde 1  $\mu\text{M}$  HIS in Kombination mit 100  $\mu\text{M}$  Cimetidin (CIM) gegeben. Unter dieser Versuchsbedingung wurden keine Auswirkungen auf die Kraft, die Kontraktionsgeschwindigkeit, die Relaxationsgeschwindigkeit und  $T_1$  verzeichnet. Jedoch war die Herzfrequenz verringert und  $T_2$  erhöht. Bei WT gab es keine Veränderungen. Die alleinige Gabe von 100  $\mu\text{M}$  CIM führte zu einer Abnahme der Herzfrequenz von 73% bei transgenen Herzen. Dies korreliert mit der ebenfalls messbaren Verlängerung von  $T_1$ . Auch hier war bei Wildtypen keine Veränderung messbar. Des Weiteren hatten im Vorfeld niedriger gewählte Konzentrationen von CIM keine suffiziente Histamin- $H_2$ -Rezeptor-Blockade und auch keine Frequenzabnahme zur Folge. Als Zeitkontrolle (TC) wurden WT und TG nur mit Tyrode perfundiert. Bei beiden Bedingungen wurden keine Effekte festgestellt (s. Abb. 17).

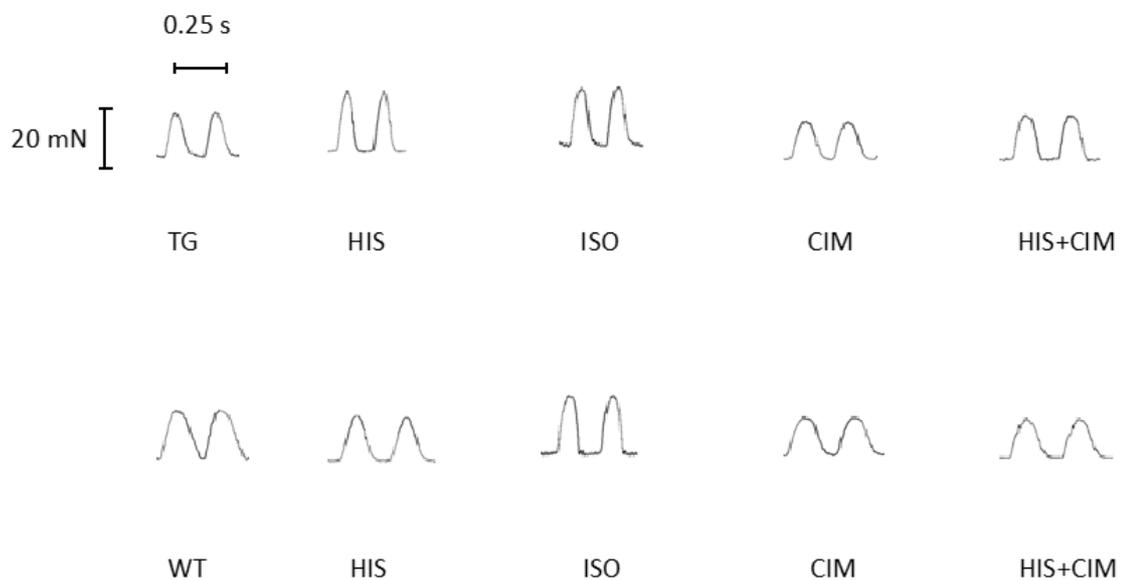


Abbildung 17: Übersicht Substanzwirkungen

Im transgenen Tierherzen führten Histamin und Isoprenalin zu positiv inotropen Effekten, der Effekt des Histamins konnte durch CIM beendet werden. Im WT zeigte Isoprenalin als einzige Substanz eine Wirkung.

### 4.3. Versuchsreihe 2: Ischämieversuche

Um den Einfluß des Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptors im Herzgewebe auf eine Unterversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen beurteilen zu können, wurden vergleichend isoliert perfundierte TG- und WT-Herzen einer Ischämie mit anschließender Reperfusion ausgesetzt, wie im Methodenteil beschrieben. Die Kontraktionsdaten wurden über den gesamten Versuchsverlauf aufgezeichnet. Statistisch ausgewertet wurde die Herzfunktion vor Beginn der Ischämie (basale Kontraktilität = Ausgangslage) und am Ende der Reperfusion kurz vor dem Einfrieren der Herzen. Zusätzlich wurden verschiedene Zeitpunkte im Versuchsverlauf analysiert. Dies waren die Zeitpunkte des halben Kraftabfalls F<sub>1/2</sub> nach Einleitung der Ischämie, des Auftretens der ersten Arrhythmie in der Ischämiephase, sowie die letzte Arrhythmie nach Beginn der Reperfusion. Außerdem fand noch eine „Zeitkontrolle“ (TC) statt. Die Herzen wurden über den gleichen Zeitraum in der Langendorff-Apparatur ohne weitere Manipulation perfundiert, wie zuvor die Ischämie-Reperfusion-Versuche.

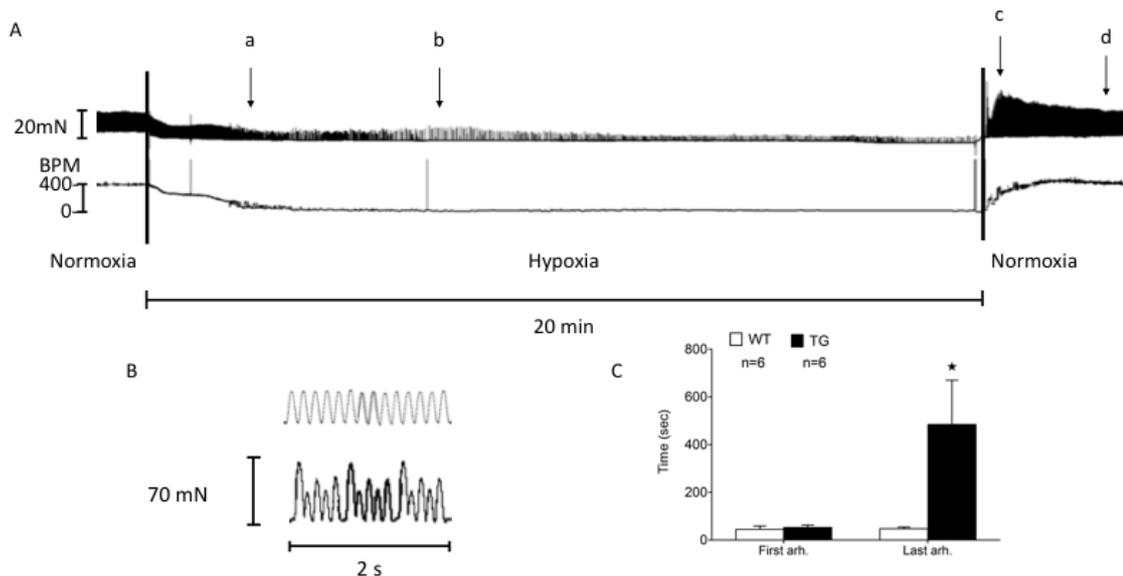


Abbildung 18: Ischämie, Reperfusion und Arrhythmie

Die Auswertung des Mechanogramms (A) zeigt den schnell stattfindenden halben Kraftabfall N<sub>1/2</sub> (a). Einige WT-Herzen zeigten starke Ischämie-Arrhythmien (b). Nach der Reperfusion hatten TG und WT einen starken postischämischen Peak (c). Die Wildtypen erholten sich nach kurzer Zeit (d). Bei den transgenen Herzen blieben allerdings häufig Reperfusionarrhythmien bestehen (B). Das Andauern dieser Rhythmusstörung war damit bei TG länger, als bei WT (C). (\* p < 0,05 vs. WT, arrh. = Arrhythmie)

Wie in Abb. 18 gezeigt, fielen die Kontraktionskraft und die Herzfrequenz nach kurzer Zeit ab und es stellten sich Arrhythmien ein. Der halbe Kraftabfall und die ersten Arrhythmien traten bei beiden Gruppen zur gleichen Zeit ein, jeweils in den ersten 1-1,5 Minuten. Nach einer Ischämiedauer von 20 Minuten wurde die Perfusionspumpe wieder angestellt, eine deutliche postischämische Kraftzunahme war sowohl bei WT (51,4 ± 4,16 mN) als auch bei TG (56,4 ± 6,08 mN) sofort nach Beginn der Reperfusion zu verzeichnen, etwas später stabilisierten sich die

Herzen. Vergleicht man nun die Kontraktionsdaten der Herzen am Ende der Reperfusion kurz vor dem Einfrieren, lässt sich keine Veränderung zur jeweiligen Ausgangslage feststellen, die Herzen beider Versuchsgruppen erholten sich vollständig. Allerdings zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Zeitpunkten der letzten Arrhythmie nach Reperfusion bei TG und WT. Die Wildtypen erholen sich im Schnitt nach  $47,7 \pm 6,87$  s vollständig von der Ischämie, wohingegen sich bei den transgenen Mäusen ein anderes Bild zeigt, dass 50% der transgenen Herzen Arrhythmien bis zum Ende der Versuchsaufzeichnung haben und somit durch die Ischämie und Reperfusion längerfristig beeinträchtigt worden sind. Dadurch bedingt ergibt sich eine durchschnittliche Erholungszeit von 482,00 s mit entsprechend großen Abweichungen ( $\pm 183,81$  s).

Beim Vergleich der Zeitkontrolle TC mit den Ischämieversuchen konnte nach Ablauf der Versuchszeit kein Unterschied bei den Kontraktionsdaten gemessen werden, was bedeutet, daß es weder bei WT noch bei TG zu einer Schädigung des Herzens durch die Ischämie und Reperfusion gekommen ist.

Tabelle 2: Ischämie, Reperfusion und Zeitkontrolle

	WT			TG		
	Pre n=6	Post n=6	TC n=3	Pre n=6	Post n=6	TC n=4
Kraft F (mN)	32,47 $\pm 3,54$	30,63 $\pm 3,21$	32,42 $\pm 1,28$	31,97 $\pm 2,73$	29,55 $\pm 1,82$	28,8 $\pm 2,25$
Frequenz BPM	313,67 $\pm 16,86$	328,17 $\pm 19$	274,95 $\pm 19,71$	417,67 $\pm 16,72$	401,67 $\pm 10,87$	409,3 $\pm 22,19$
Anspannungszeit T1 (ms)	28 $\pm 1$	32 $\pm 2$	39 $\pm 7$	31 $\pm 2$	33 $\pm 2$	28 $\pm 1$
Erschlaffungszeit T2 (ms)	48 $\pm 3$	45 $\pm 6$	29 $\pm 2$	41 $\pm 3$	45 $\pm 4$	36 $\pm 4$
Max. Kraftanstiegs- geschwindigkeit dF/dt max	3037,0 $\pm 1197,5$	2389,67 $\pm 1169,45$	1393,67 $\pm 92,13$	2679,0 $\pm 573,87$	2525,0 $\pm 794,74$	1444,5 $\pm 216,84$
Min. Kraftabfalls- geschwindigkeit dF/dt min	-2780,33 $\pm 546,55$	-1970 $\pm 612,3$	-1263,67 $\pm 269,02$	-2669,0 $\pm 472,14$	-2589,0 $\pm 691,78$	-1679,25 $\pm 484,29$

Es wurden Messdaten vor der Ischämie (Pre) und am Ende der Reperfusion (Post) erhoben. Zusätzlich wurde eine Zeitkontrolle (TC) durchgeführt. Es ergaben sich keine Unterschiede in den herzmechanischen Daten zwischen diesen Versuchsbedingungen.

#### 4.4. Genotypisierung

Zur Bestimmung des Genotyps wurde die genomische DNA der Mäuse isoliert in eine PCR eingesetzt und die PCR-Produkte wurden im Agarosegel anhand ihrer Größe aufgetrennt. Es wurde ein Primerpaar eingesetzt, welches nur bei TG-Tieren ein PCR-Produkt entstehen ließ. Bei Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-überexprimierenden Mäusen konnte daher eine Bande bei 555 bp nachgewiesen werden, bei Wildtypen war diese nicht vorhanden. Bei fragwürdigen Ergebnissen in den Langendorff-Experimenten fand eine erneute Genotypisierung statt, um auszuschließen,

daß es eine Verwechslung der Tiere durch schlecht interpretierbare Ohrmarkierungen gegeben hatte oder daß im Verlauf der Genotypisierung Proben verwechselt worden waren.

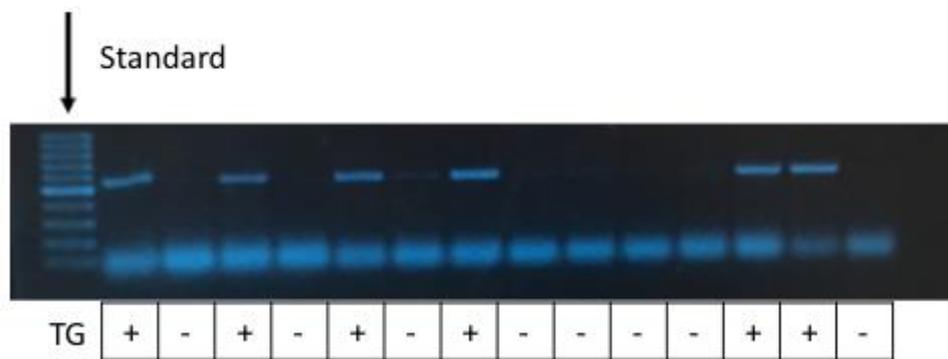


Abbildung 19: Genotypisierung  
 Im UV-Betrachter konnte das zur Genotypisierung verwendete Gel ausgewertet werden. Transgene DNA wurde so in der PCR geschnitten, daß eine Bande bei 555 kb ersichtlich war.

#### 4.5. Nachweis spezifischer Proteine

Zum Nachweis von spezifischen Proteinen wurden zuvor homogenisierte Herzproben in einer SDS-Page nach ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt. Mittels eines Western Blots wurde die Information auf eine Zellulose-Membran übertragen und durch Antigen-Antikörper-Reaktion immunologisch nachgewiesen (siehe 3.4.). Mit dem Programm ImageQuant wurde die Intensität der Proteinbanden bestimmt und die Werte in Microsoft Excel statistisch ausgewertet. Um eine Vergleichbarkeit verschiedener Blots zu erzielen und ungleiche Proteinbeladungen einzelner Gelspuren auszugleichen, wurden die Banden der einzelnen Proteine jeweils als Quotient des CSQ-Wertes des jeweiligen Blots dargestellt.

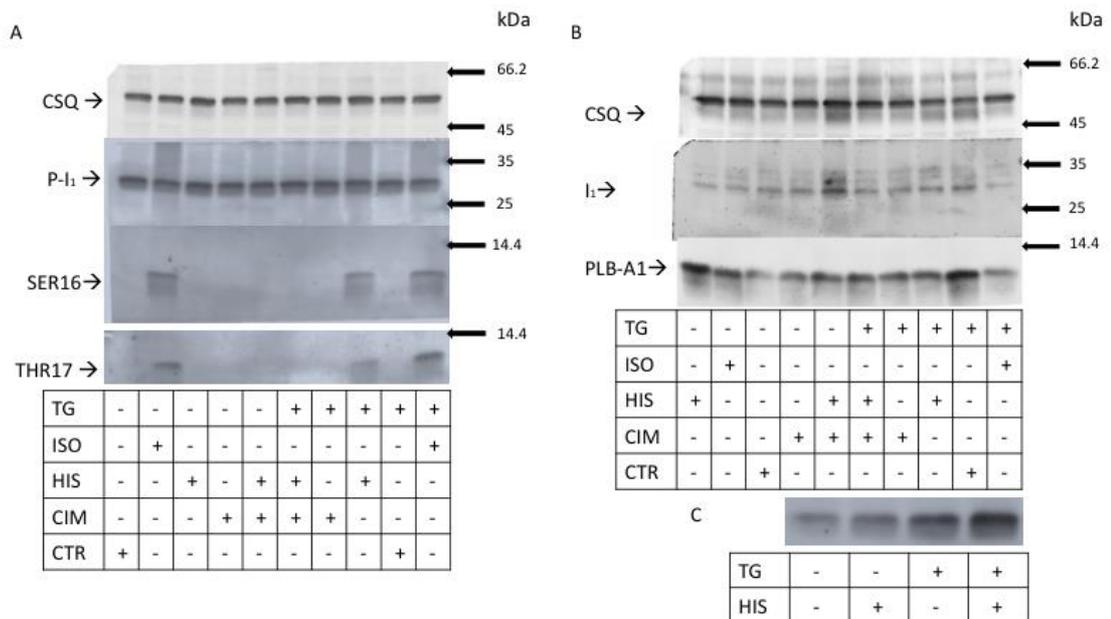


Abbildung 20: Originale Western Blots

Für SER16 und THR17 sind Banden-Signale bei WT mit ISO, TG mit ISO und TG mit HIS zu erkennen. Außerdem sind die Spuren des P-I1 deutlich intensiver. Das trifft für keine der anderen Versuchsbedingung zu (A). In (B) ist eine Spur des gesamten PLB dargestellt, hier ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen. Beim P-TnI konnten deutlich stärkere Signale bei den transgenen Versuchstieren festgestellt werden, als bei WT (C).

Um die positiv inotrope Wirkung des Histamins analog zu der des Isoprenalins nachzuweisen, wurde der Phosphorylierungsgrad von PLB an Serin-16 (SER16) und Threonin-17 (THR17) in den Proben analysiert (s. Abb. 20). Die PLB-Banden beider Phosphorylierungen sollten im Bereich von unter 12 kDa zu finden sein. Für Serin-16 konnte eine Phosphorylierung sowohl bei TG, als auch bei WT unter dem Einfluß von Isoprenalin festgestellt werden. Beim transgenen Mäuseherz lag der Wert für SER16/CSQ bei  $14,94 \pm 7,75$ , beim WT mit  $35,54 \pm 6,23$  höher (siehe Abb. 21A). Bei mit Histamin behandeltem Herzgewebe war nur eine SER16-Phosphorylierung des PLB der transgenen Tiere nachweisbar, mit einem SER16/CSQ-Quotienten von  $15,45 \pm 0,66$ . Wildtypherzen zeigte unter Histaminzugabe keine PLB-Phosphorylierung, ebenso wenig die anderen Versuchsbedingungen CTR, Cimetidin und Histamin + Cimetidin. Die Threonin-17-Phosphorylierung von PLB wurde nur unter Histamin-Einfluss (HIS) und ohne Zugabe einer Substanz (CTR) untersucht. Ein Nachweis von phosphoryliertem THR17 fand nur bei TG unter vorheriger Behandlung mit Histamin statt ( $THR17/CSQ = 28,09 \pm 4,66$ ). Kein Effekt konnte jedoch bei WT unter Histamin oder bei WT und TG in der Bedingung CTR festgestellt werden (Siehe Abb. 21).

Des Weiteren wurde die Phosphorylierung des Inhibitors 1 (P-I1) untersucht, ein wichtiges Protein in der Regulierung der Aktivität der PP1 und somit der Umkehr der oben beschriebenen positiv inotropen Effekte. Unter Einfluß von Histamin beziehungsweise bei CTR konnte P-I1 sowohl bei WT (CTR:  $24,49 \pm 6,34$ ; HIS:  $34,89 \pm 2,39$ ) als auch bei TG (CTR:  $27,79 \pm 3,57$ ;

HIS:  $80,67 \pm 12,05$ ) nachgewiesen werden, jedoch waren die Werte für transgene Tierherzen unter Histamineinfluss erhöht (Siehe Abb. 21C). Bei der Bestimmung des gesamten Gehalts an Phospholamban (PLB) wurden keine Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp-Herzen festgestellt, unabhängig von der Behandlung der Herzen (Abb. 21D).

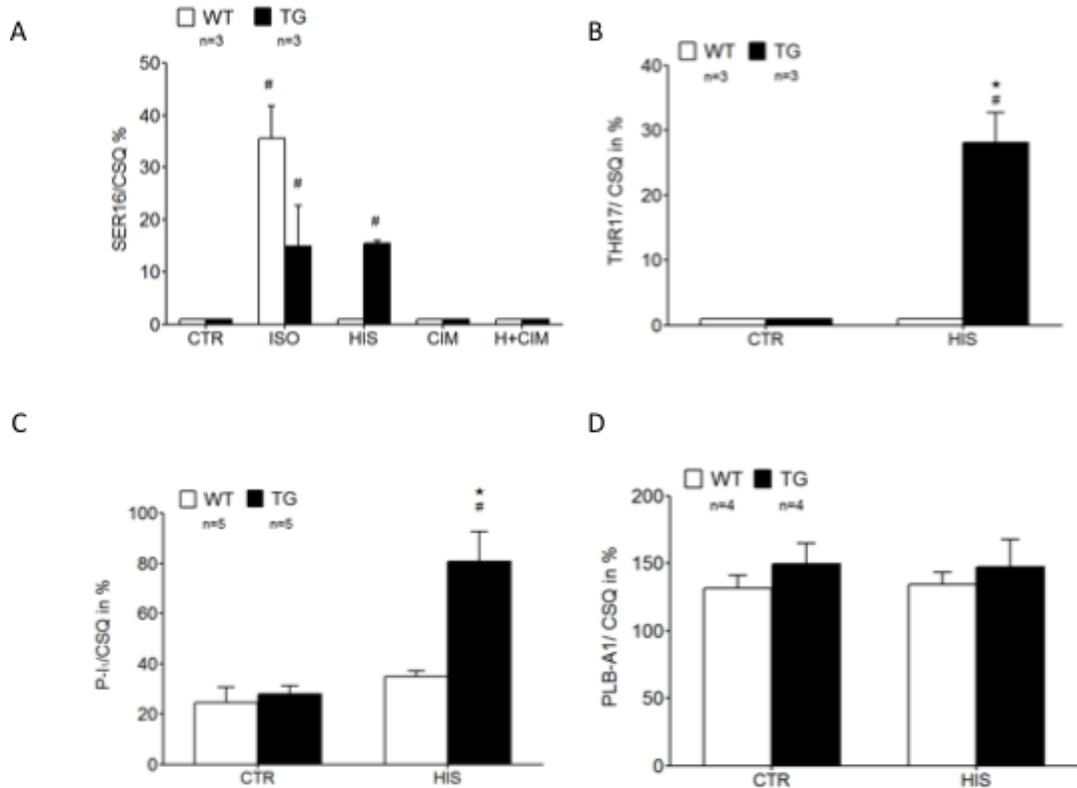


Abbildung 21: Phosphorylierung des PLB und P-I1

Eine Phosphorylierung an Serin-16 (SER16) fand man bei WT unter ISO und TG unter ISO oder HIS (A). An der Stelle des THR17 fand diese auch nur bei TG HIS statt (B). Ebenso wurde ein stärkeres Signal für den Inhibitor 1 (P-I1) bei TG HIS registriert (C). Die Werte des gesamten PLB unterschieden sich nicht (D). (\*  $p < 0,05$  vs. WT, #  $p < 0,05$  vs. CTR)

Abschließend wurde noch der Anteil des phosphorylierten (p-TnI) am gesamten Troponin I (TnI) bei WT und TG unter Histaminzugabe und ohne Substanz (CTR) untersucht. TnI konnte bei etwa 30 kDa auf der Membran nachgewiesen werden. In Abb. 20C ist ein Ausschnitt aus einem Western Blot dargestellt. Es ist ein deutlicher Unterschied in der Intensität von Transgenen zu Wildtypen sichtbar. TG maß in der Kontrolle CTR  $84,34 \pm 7,53$ , wohingegen der Wildtyp bei  $46,52 \pm 8,29$  lag. Für den Histamineffekt konnte aufgrund von fehlendem Probenmaterial leider kein eindeutiges Ergebnis mehr bestimmt werden.

Zusammenfassend fand bei transgenen Herzen unter Histamineinfluss eine Phosphorylierung von PLB an Serin-16 und Threonin-17 statt, ebenso eine Erhöhung der Inhibitor 1-Phosphorylierung. Für WT fand nur ein messbarer Effekt unter Isoprenalin, nicht aber unter Histamin statt. Ohne Zugabe einer herzwirksamen Substanz wurden keine Veränderungen bei den hier untersuchten Proteinen registriert. Der Gehalt an p-TnI war im Herzgewebe von TG höher als bei Wildtypen.

## **5. Diskussion**

### **5.1. Diskussion der Methoden**

#### **5.1.1. Genkonstrukt**

Es sind bereits mehrere Studien mit  $\alpha$ -MHC Promotern durchgeführt worden, die eine herzspezifische Expression des jeweiligen Gens zur Folge hatten (Au et al. 2018; Fröba et al. 2018; Köhler et al. 2013). Jedoch ist das Ausmaß der Expression und somit die Rezeptordichte des hier exprimierten Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptors noch nicht genauer bekannt. Dies liegt unter anderem auch daran, daß es aktuell keinen kommerziellen Antikörper gibt, mit dem der Rezeptor nachweisbar wäre. Ein vergleichbares Problem trat auch bei der kardialen Expression des 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptors auf (Gergs et al. 2010). Vorteil des verwendeten Modells ist allerdings, daß die CD1-Wildtypmäuse keine funktionellen wirksamen Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptoren im Herzen exprimieren, während er im transgenen Mausmodell überexprimiert und funktionell nachweisbar ist. Auf diese Weise lassen sich differenzierte Aussagen tätigen.

#### **5.1.2. Tiermodell**

Auch wenn selten ein direkter Rückschluss von einem Tierexperiment egal welcher Art auf den Menschen getroffen werden kann, bietet es einige Vorteile. So steht Herzgewebe des Menschen nur selten zu experimentellen Zwecken zur Verfügung. Besonders wichtig für Studien ist immer die Vergleichbarkeit, wobei eine Kontrolle über die Versuchsbedingungen unerlässlich ist. Dabei ist vor allem auch der Ausgangszustand des jeweiligen Untersuchungsmaterials gemeint. Im Gegensatz zu menschlichen Herzpräparaten ist am Tiermodell die Möglichkeit gegeben, Alter, Geschlecht, Gesundheitszustand und Lebensweise der Tiere festzulegen. Ebenfalls kann durch Routine bei Entnahme und extrakorporaler Lagerungszeit eine vergleichbare Ausgangssituation geschaffen werden. Dazu kommt, daß bei einigen Tieren, wie auch hier bei der Maus, das Herz als Ganzes untersucht werden kann, wohingegen das beim Menschen üblicherweise nur mit Gewebeproben möglich ist. Letztlich gilt es zu erwähnen, daß humanes Herzgewebe oft nur von Herzen mit Vorerkrankung entnommen werden kann, z.B. im Zuge einer notwendigen Operation. Tiermodelle bieten viele Möglichkeiten der Analytik, insbesondere im Bereich der Grundlagenforschung, wobei natürlich immer über die klinische Anwendbarkeit diskutiert werden muss. Dieses Tiermodell kann Hinweise auf die Situation im menschlichen Herzen liefern.

#### **5.1.3. Langendorff-Methode**

Bei der Technik nach Langendorff werden ganze Herzen dem Tier entnommen und in einer Perfusionsanlage unter Nährstoff- und Sauerstoffzufuhr über einen längeren Zeitraum funktionstüchtig gehalten. Bei dieser komplexen Methode kann es im Ablauf zu verschiedenen Fehlerquellen kommen. Es ist unerlässlich, einem strikten Protokoll der Reinigung und

Erneuerung von Material zu folgen, um eine Kontamination oder einen Eintrag von Partikeln, die die Koronargefäße verschließen könnten, weitestgehend ausschließen zu können.

Im ersten Schritt, der Anästhesie, wurden die Tiere mit Pentobarbital betäubt. Dieses Medikament wird unter anderem auch zur Euthanasie in der Veterinärmedizin verwendet. Segal und Kollegen (Segal et al. 1990) zeigten, daß sich Rattenherzen unter Pentobarbitalnarkose in Bezug auf die Inotropie und  $dP/dt_{max}$  anders verhielten, als nicht-narkotisiert, was wiederum bei der klinischen Vergleichbarkeit beachtet werden muss. Allerdings muss ganz klar betont werden, daß heute eine Organentnahme ohne vollständige Anästhesie keine ethische oder rechtliche Möglichkeit ist. Abgesehen davon kommt es bei Organentnahme und Präparation immer zu einer kurzen Phase der Ischämie, die sich zwar minimieren, aber nicht vollständig umgehen lässt. Je nach Dauer der Ischämie und Auswirkungen auf das Herzgewebe lassen sich unterschiedliche Arten von Ischämie-Schäden einteilen. Ein möglicher solcher Schaden ist das *stunned myocardium*, also das betäubte Myokard. Nach einer kurzen Phase der Sauerstoffunterversorgung erholt sich das Herz wieder vollständig (Iaizzo 2005). Dementsprechend sollte es zu keinen Auswirkungen für den weiteren Versuchsablauf kommen. Jedoch kann es sein, daß durch die kurze Ischämiezeit bei der Entnahme des Organs schon eine sogenannte ischämische Präkonditionierung stattgefunden hat. Murry und Kollegen (Murry et al. 1986) legten nahe, daß kurze ischämische Phasen vor einer längeren einen positiven Effekt auf die Ischämieverträglichkeit hätten. Ob diese Präkonditionierung durch Ischämie tatsächlich stattfindet, wird seit Längerem diskutiert und ist immer noch unklar (Mikhail et al. 2003). Eine Problematik der Langendorff-Methode ist ebenfalls, daß schon eine winzige Luftblase während des Einhängvorgangs des Herzens an die Anlage zur Embolie führen kann, zudem kann ein kleiner Rest Blut einen Thrombus verursachen. Die Wahrscheinlichkeit beider Fälle kann durch sorgfältiges Arbeiten verringert werden, abgesehen davon äußern sich diese Ereignisse in der Regel schon kurz nach Beginn des Versuchs und sind in der Aufzeichnung sichtbar. Auch kann es im Zuge der Präparation zu Schäden am Gewebe kommen, die eventuell nicht auf den ersten Blick im Mechanogramm ersichtlich sind. Da außerdem der Ventrikel selbst nicht gefüllt ist, kann es zu abnormen dreidimensionalen Ausdehnungen des Herzens kommen. Dieser Umstand kann Messdaten beeinflussen und Koronararterien verschließen (Iaizzo 2005). Ein anderes Problem der fehlenden Ventrikelfüllung ist, daß zwar das Herz mit einer 37°C warmen Flüssigkeit perfundiert wird, allerdings nur an einer kleinen Kontaktfläche. Ob also im gesamten Gewebe eine gleichmäßige Temperatur herrscht, lässt sich nur schwer bestimmen. Letztlich zu erwähnen ist noch der konstante Fluss. In dieser Versuchsreihe wurde mit einem konstanten Fluss von 2 ml/min gearbeitet, was durch eine Peristaltikpumpe mit Flussmessgerät sichergestellt wurde. Das Problem mit konstanten Flussmodellen ist allerdings, daß dieser nicht automatisch an einen akut erhöhten Bedarf des Herzens angepasst wird und somit zu einer funktionellen Ischämie führen kann. Ebenfalls könnte auch ein zu hoher Fluss zu einer Ödembildung im Gewebe führen (Dhein et al. 2005).

Trotz einiger Schwierigkeiten, die die Langendorff-Methode mit sich bringt, ist es eine etablierte Methode in der experimentellen Herzforschung. Ein Grund dafür ist, daß sich Herzen unterschiedlicher Spezies isoliert, aber unter annähernd physiologischen Bedingungen weiter in Funktion halten lassen. Das Herz ist ein, wenn nicht sogar das, zentrale Organ unseres Kreislaufs und steht unter ständiger hormoneller und vegetativer Kontrolle. Zusätzlich ist die Wirkung von Histamin auf den Organismus komplex und bis heute nicht in allen Aspekten verstanden. Allein unter immunologischen Gesichtspunkten wäre es schwer, die kardialen Effekte von Histamin *in vivo* zu beurteilen. Daher eignet sich für Untersuchungen, die organspezifische Effekte genauer beleuchten wollen, dieses *in vitro* Modell nach Langendorff besonders (Owen 1977). Einfacher zu handhaben wären eventuell noch Versuche an isolierten Vorhöfen (Au et al. 2018). Allerdings ist die Verteilung, sowie der Effekt kardialer Histaminrezeptoren von Vorhof zu Ventrikel zum Teil sehr unterschiedlich und die Aussagekraft reiner Vorhofexperimente begrenzt (siehe 1.2. und 1.3.).

## **5.2. Diskussion der Ergebnisse**

### **5.2.1. Tiermodell**

In den durchgeführten Untersuchungen konnten keine Unterschiede zwischen TG und WT festgestellt werden, wie bereits beschrieben, erfolgte die Differenzierung nur anhand des Genotyps. Der Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor kommt in einigen anderen Geweben vor, damit ist er auch für viele weitere Prozesse im Körper verantwortlich (Vgl. 1.). Ein Review von Schneider und Kollegen (Schneider et al. 2014) aus dem Jahr 2014 beschäftigt sich mit dem aktuellen Wissensstand von Histamin-H<sub>1</sub>- und Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-Knockout-Tiermodellen in Bezug auf Verhaltensänderung wie zum Beispiel Lernen, Bewegung, circadiane Rhythmen oder Nahrungsaufnahme. Hier kommt man zu dem Schluß, daß Auswirkungen von Histamin-H<sub>1</sub>- oder H<sub>2</sub>-Rezeptor-Knockout definitiv vorhanden sind, während die Studienlage zu Histamin-H<sub>1</sub>-Rezeptoren und Verhalten allerdings besser ist, als zu Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptoren. Da eine Verringerung der Histamin-Rezeptordichte Auswirkungen auf den Organismus zu haben scheint, könnte auch eine Überexpression dieser Rezeptoren physiologische Veränderungen hervorrufen.

### **5.2.2. Langendorff-Versuchsreihe 1: Agonisten-Antagonisten-Versuche**

In dieser Versuchsreihe waren isolierte, vollständige Herzen von transgenen Tieren und Wildtyp-Mäusen in einer Langendorff-Apparatur mit unterschiedlichen Substanzen perfundiert worden. Im Vergleich zu Wildtypen hatten Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-überexprimierende Mäuseherzen eine basal höhere Schlagfrequenz, begleitet von einer Verkürzung der Anspannungszeit T<sub>1</sub> sowie der Erschlaffungszeit T<sub>2</sub>. Ebenso war  $dp/dt_{max}$  erhöht, beziehungsweise der Minimalwert erniedrigt. Die in der Ausgangslage entwickelte Kontraktionskraft lag allerdings unter dem Kraftwert der CD1-Wildtypen. Milano und Kollegen (Milano et al. 1994) bestimmten die Herzfrequenz und die

Kontraktionskraft rechter Vorhöfe von  $\beta_2$ -Adrenorezeptor-überexprimierenden Mäusen im Vergleich zu Wildtypen. Sowohl die Herzfrequenz, als auch die Kontraktionskraft, waren bei den transgenen Tieren in der Ausgangssituation erhöht. *In vivo* zeigte sich ebenfalls basal eine deutlich höhere Herzfrequenz. Vergleichbar wären also nur die Werte für die Frequenzwerte. Allerdings handelt es sich bei der hier durchgeführten Untersuchung zu Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-Überexpression um eine Langendorff-Versuchsreihe mit isolierten, vollständigen Organen. Ergebnisse können daher abweichen. In einer anderen Studie von Bittner und Kollegen (Bittner et al. 1997), welche zwar an isolierten Herzen von WT und TG, aber auch mit  $\beta_2$ -Rezeptor-Überexpression, stattfand, waren die basalen Frequenzwerte der TG ebenfalls gegenüber denen der WT erhöht.

Die Herzen beider Versuchsgruppen, WT und TG, wurden mit 1  $\mu$ M Isoprenalin, einem nicht-selektiven  $\beta$ -Agonisten, perfundiert. Bei WT-Mäusen kam es zu einer Steigerung der Kontraktionskraft, der Herzfrequenz und der Kontraktionsgeschwindigkeit, ebenso zu einer Verringerung von T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> und dF/dt<sub>min</sub>. Dies entspricht früheren Ergebnissen für eine Isoprenalingabe an Langendorff-WT-Hezen (Fahrion und Neumann 2017). Bei TG kam es zu ähnlichen Ergebnissen, allerdings war keine Veränderung von T<sub>1</sub> und T<sub>2</sub> messbar. Liu und Kollegen untersuchten 2002 (Liu et al. 2002)  $\beta_2$ -Adrenorezeptor-überexprimierende Maushezen, die eine gestörte inotrope Reaktion auf Histamin zeigten. Nach 14-tägiger Applikation verschiedener  $\beta$ -Adrenorezeptorblocker war der inotrope Effekt durch Histamin wiederhergestellt. Die Autoren schlussfolgerten aus ihren Versuchen, daß nicht die spontane Aktivität des überexprimierenden  $\beta_2$ -Adrenorezeptors, sondern seine Besetzung durch Agonisten zur Aktivierung des PKA-Signalweges und zu dem verminderten Histamineffekten führte. Daß andersrum eine Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-Überexpression zu einer verminderten  $\beta_2$ -Adrenorezeptor-Wirkung führt, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden. Isoprenalin löste an TG-Hezen einen positiv inotropen und chronotropen Effekt aus.

Die Gabe von 1  $\mu$ M Histamin hatte auf isolierte WT-Hezen keinen Effekt. Dies entspricht den Versuchen von Goren und Kollegen (Goren et al. 1994), hier war die minimale Histaminkonzentration, die einen Effekt zur Folge hatte, 10<sup>-5</sup> M. Bei transgenen Tierhezen kam es jedoch zu einer Zunahme der Kontraktionskraft, dieser positiv inotrope Effekt wurde nicht nur an ganzen Herzpräparationen, sondern auch an linken Vorhöfen und isolierten Cardiomyozyten mit Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor Überexpression nachgewiesen (Fröba et al. 2018; Meister et al. 2014). Bei den Versuchen von Milano und Kollegen (Milano et al. 1994) an  $\beta$ -Adrenorezeptor-überexprimierenden Mäusen zeigten isolierte rechte Vorhöfe eine basal hohe Kraft- und Frequenzentwicklung, die sich unter Stimulation mit Isoprenalin nicht steigern ließ, dies ließ sich in den hier durchgeführten Versuchen mit Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptoren also nicht analog bestätigen, nur die Herzfrequenz ließ sich durch Histamingabe nicht weiter steigern. Ebenso war in eine Steigerung von dF/dt<sub>max</sub>, sowie eine Verringerung von dF/dt<sub>min</sub> und T<sub>2</sub> zu verzeichnen. Der

deutliche Unterschied in den Effekten auf Wildtypen und transgenen Mäusen auf Histamin zeigt außerdem, daß der Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor erfolgreich überexprimiert wurde.

Die Blockade des Histamineffekts unter gleichzeitiger Perfusion mit Cimetidin ist bereits bekannt und beschrieben (Köhler et al. 2013). Unter beiden Versuchsbedingungen mit 100 µM Cimetidin zeigte zudem sich eine Frequenzabnahme bei den transgenen Mäusen. Bei alleiniger Gabe von Cimetidin (CIM) war zusätzlich T<sub>1</sub> verkürzt, in Kombination mit Histamin (HIS+CIM) hingegen nur T<sub>2</sub>.

Worin ist die beschriebene veränderte Herzmechanik der Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-überexprimierenden Mäusen begründet? In der dazu analogen Studie mit kardialer β<sub>2</sub>-Rezeptor-Überexpression von Milano und seiner Arbeitsgruppe (Milano et al. 1994) wurde nahegelegt, daß eine Wirkung endogener Katecholamine auf eine gesteigerte Menge an Rezeptoren als Ursache für diese gesteigerte Aktivität ausgeschlossen werden sollte, etwa weil die Behandlung mit einem externen neutralen Agonisten, welcher die Rezeptorbindungsstellen vollständig besetzte und damit die endogenen Katecholamine verdrängte, ohne eine Wirkung zu erzeugen, keine Senkung der basal hohen Aktivität hervorrief oder ebenso eine Antagonisierung zu keiner Senkung behalf. Jedoch reduzierte ein inverser Agonist sehr wohl die gesteigerten Werte in Richtung Kontrolle. Ursache könnte also die in 1.4. beschriebene basale Aktivität G-Protein-gekoppelter Rezeptoren sein. Was lässt sich daraus für die hier untersuchte Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-Überexpression schließen? Für diese Theorie würde die hohe Herzfrequenz, ebenso die veränderten Werte für Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit im Vergleich zum Wildtyp sprechen. Auch die verkürzten Anspannung- und Erschlaffungszeiten passen dazu. Dazu kommt noch die Wirkweise des Cimetidins als inverser Agonist, indem es die basal hohe Herzfrequenz senkt (Monczor et al. 2003). Bei der Inotropie scheint es sich jedoch anders zu verhalten. Zunächst befindet sich der Wert der anfänglichen Kontraktionskraft unter dem des Kraftwertes der Wildtypen. Auch findet eine weitere Zunahme unter Histamin statt, wobei es zu keiner Abnahme der Kraft unter Cimetidin kommt.

### **5.2.3. Langendorff-Versuchsreihe 2: Ischämieversuche**

Im Zuge der Ischämie-Versuchsreihe wurden die isolierten Herzen von Wildtyp-Tieren und Transgenen in einer Langendorff-Apparatur nach einer etwa 20-minütigen Äquilibrationsphase einer Stop-Flow Ischämie von 20-minütiger Dauer unterzogen, daraufhin folgte eine Reperfusion von 15 Minuten. Ebenso wurde eine sogenannte „Zeitkontrolle“ durchgeführt, die Herzen wurden für die gleiche Zeitspanne permanent perfundiert. Bei den Wildtypen konnten nach Ischämie und Reperfusion keine Veränderungen registriert werden, weder zur Ausgangslage, noch zur Zeitkontrolle. Die herzmechanischen Daten zeigen keine Änderung und Reperfusionsarrhythmien traten nur kurzzeitig auf. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von He und Kollegen aus dem Jahr 2012 (He et al. 2012) überein, hier bildeten sich bei Wildtypen die

Arrhythmien bis eine Minute nach Reperfusion zurück. Bei Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-überexprimierenden Tieren bleiben in einigen Versuchen Arrhythmien nach Reperfusion allerdings im gesamten Aufzeichnungszeitraum von 15 Minuten bestehen, die Zeitspanne bis Erreichen des Sinusrhythmus unterschied sich. Ergebnisse mehrerer Studien legen nahe, daß der Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor bei pathologischen Vorgängen wie Ischämie und Reperfusion eine Rolle spielt. Dai (Dai 1989) setzte Langendorff-Rattenherzen einer Hypoxie, jedoch ohne Reperfusion, aus. In Herzen mit Histamin-Vorbehandlung setzten ventrikuläre Tachyarrhythmien früher ein als ohne. Dem Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor wurde dafür eine entscheidende Rolle beigemessen. Asanuma und Kollegen zeigten (Asanuma et al. 2006), daß sich eine Blockade von Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptoren als kardioprotektiv bei Ischämie und Reperfusion erwies. Luo und Kollegen (Luo et al. 2013) hingegen unternahmen Versuche mit Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-KO-Mäusen: die Infarktgröße nach Ischämie und Reperfusion war kleiner, als bei Wildtypen. Ebenso zeigten isolierte linke Vorhöfe mit Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-Überexpression, welche eine 30-minütige Hypoxiephase durchlaufen hatten, bei der Reoxygenierung eine schnellere Erholung der Kontraktionskraft als die Wildtypen (Au et al. 2018). Zu diskutieren gilt in diesem Zusammenhang ebenfalls, daß die Prozentzahl der Basalarrhythmien für TG mit 70% höher lag, als bei WT mit 48%. Darin könnte die Ursache der gemessenen Arrhythmien liegen. Jedoch sollte bedacht werden, daß die Arrhythmiehäufigkeit in der Äquilibrationsphase bestimmt wurde, die Phase, die den Herzen zur Erholung nach der Präparation zur Verfügung stand. Fraglich bleibt außerdem, ob es durch die Entnahme der Herzen und die dabei unterbrochene Sauerstoffversorgung zu einer Phase der präischämischen Konditionierung gekommen sein könnte (Lawson et al. 1993). Abgesehen davon müssen Temperaturschwankungen im Herzgewebe beachtet werden: Zwar wurde jedes Herz mit einer auf 37°C erwärmten Nährflüssigkeit perfundiert, aber diese Zufuhr wurde bei der Ischämie abgestellt und das Herz kühlte auf Raumtemperatur ab. Ning und Kollegen (Ning et al. 1998) untersuchten die Auswirkungen von Temperaturunterschieden bei Ischämie und Reperfusion: Herzen in den Gruppen von 4-30°C zeigten keinen Unterschied in der Erholung, bei 34°C war der Zustand der Tierherzen jedoch deutlich herabgesetzt. Da hier die Herzen wahrscheinlich unter 30°C abgekühlt waren, wäre dies eine Erklärung für die vollständige Erholung nach Ischämie und die geringen bis nicht vorhandenen Unterschiede zwischen WT und TG. *In vivo* wären durch eine Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-Überexpression also eventuell andere Ergebnisse zu erwarten, als in diesem *in vitro*-Versuch, die Folgen von Ischämie und Reperfusion könnten gravierender ausfallen.

#### **5.2.4. Proteinexpression und -phosphorylierung**

Die Herzen von Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-überexprimierenden Mäusen und Wildtypen wurden im Anschluss an die Langendorff-Versuche eingefroren und die Expression bzw. Phosphorylierung wichtiger kardialer Proteine mittels Western Blot untersucht.

Um den Aktivitätszustand des Phospholambans zu untersuchen, wurde in WT- und TG-Herzen spezifisch deren Serin-16- und Threonin-17-Phosphorylierung analysiert (Vgl. 1.4.). Eine Serin-16-Phosphorylierung von PLB wurde für transgene Tiere nach Vorbehandlung mit Isoprenalin (ISO) und Histamin (HIS) gefunden. Die Wildtypen reagierten nur auf ISO. Es ist bekannt, daß der Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor über den G<sub>s</sub>-Signalweg, cAMP und PKA am Herzen wirkt (Wellner-Kienitz et al. 2013). Über diesen Signalweg vermittelt auch das Noradrenalin seine Effekte, diese sind sehr gut erforscht. Außerdem ist bekannt, daß PLB an Serin-16 unter adrenerger Stimulation durch die PKA phosphoryliert wird und so positiv inotrope Effekte erzielt werden (Kranias and Hajjar 2017). In der vorliegenden Arbeit wurde in Bezug auf die PLB-Serin-16-Phosphorylierung dieser Signalweg auch für den Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor bestätigt.

Des Weiteren wurde die PLB-Phosphorylierung an Threonin-17 untersucht. Diese Aminosäure des Phospholambans wird durch die Calcium-Calmodulin abhängige Proteinkinase II phosphoryliert und ist somit von einem Calciumionen-Anstieg in der Zelle abhängig (Kranias and Hajjar 2017; MacLennan and Kranias 2003). Bei der Auswertung der Western Blots konnte bei mit Histamin perfundierten transgenen Herzen diese Threonin-17-Phosphorylierung von PLB nachgewiesen werden, nicht jedoch bei Wildtypen oder CTR. Somit ist auch dieser Signalweg für Histamin über den Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor nachgewiesen worden. Der intrazelluläre Calciumanstieg kommt G<sub>s</sub>-vermittelt über LTCC, gefolgt von einer Calciumfreisetzung aus dem SR und durch G<sub>q</sub> aus intrazellulären Speichern zustande (Wellner-Kienitz et al. 2013).

Wie schon in 1.4. dargestellt, fällt dem Inhibitor 1 (I1) bei der Aufrechterhaltung der Phospholambanwirkung eine wichtige Rolle zu. Der durch PKA phosphorylierte und damit aktivierte I1 vermindert die Aktivität der Protein-Phosphatase 1, wodurch die Dephosphorylierung von PLB verzögert wird und somit das  $\beta$ -adrenerge Signal verstärkt wird (Ikeda et al. 2008). Unter Histaminstimulation konnten in den hier durchgeführten Versuchen ein stärkeres Signal des Inhibitor 1 für TG festgestellt werden, als es für WT oder CTR der Fall war. Auch dieser Effekt des Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptors wurde dadurch bewiesen.

Zuletzt wurde der Gehalt an phosphoryliertem Troponin I, einem weiteren wichtigen Regulator der Lusitropie, untersucht. Hierbei konnten keine aussagekräftigen Daten für die Histaminwirkung erhoben werden. Zu erwarten wäre eine Analogie zur adrenergen Stimulation gewesen. Solaro und seine Arbeitsgruppe zeigten, daß es unter Katecholamin-Einfluss zu einem Anstieg des phosphorylierten TnI kommt (Solaro et al. 1976). In der hier vorgestellten Untersuchung war allerdings die Expression von TnI bei transgenen Tieren im Vergleich zu Wildtypen deutlich erhöht. Eine mögliche Erklärung könnte in einem beginnenden adaptiven Prozess der Nagetierherzen liegen: durch die basal erhöhte Herzfrequenz könnte es zu einer reaktiven Hypertrophie kommen.

### 5.3. Fazit

Es konnten Unterschiede zwischen in isolierten Herzen von TG und WT festgestellt werden. Unter basalen Bedingungen unterschieden sich die Herzen in allen erhobenen Daten voneinander. Die Vermutung liegt nahe, daß die im Vergleich zum nicht-transgenen Tier erhöhte Herzfrequenz auf einer basalen Aktivität des Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptors beruht. Dafür sprechen die Wirkungen von Histamin und Cimetidin in den Agonisten-Antagonisten-Versuchen, sowie analoge Versuchsreihen bei anderen transgenen Tiermodellen mit  $\beta$ -Rezeptor-Überexpression (siehe 5.2.2). Um den hier beschriebenen Rezeptor am Herzen unabhängig von neuronalen und humoralen Einflüssen untersuchen zu können, stelle sich die Langendorff-Methodik als geeignet dar.

Um einen Gewebeschaden an den Mausherzen auszulösen, reichte die in dieser Versuchsreihe durchgeführte Dauer der Ischämie nicht aus. Ebenfalls konnte kein Reperfusionsschaden detektiert werden. Eine längere oder wiederholt durchgeführte ischämische Phase (Präkonditionierung) wäre in einer weiteren Versuchsreihe sinnvoll. Um die Histaminfreisetzung während einer Ischämie *in vivo* zu simulieren, könnte eine Histaminperfusion in der Reperusionsphase ergänzt werden. Abgesehen davon kann, wie in 5.2. diskutiert, von den hier durchgeführten *in vitro*-Versuchsreihen nicht direkt auf ein Ergebnis *in vivo* geschlossen werden. Allerdings konnten Hinweise auf eine niedrigere Schwelle für Reperusions-Arrhythmien der transgenen Mäuseherzen gefunden werden.

Mittels biochemischer Labormethoden konnte nachgewiesen werden, daß durch Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-Aktivierung, analog zur sympathischen Innervation, in der Maus mehrere Proteine phosphoryliert werden, mit der Folge eines positiv inotropen Effekts.

### 5.4. Klinischer Ausblick und Anwendbarkeit

#### 5.4.1. Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-Überexpression

Das pathologische Potenzial des Histamins, in der Genese kardialer Arrhythmien, vermittelt über den Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor, ist schon länger bekannt (Trzeciakowski und Levi 1981). Daher ist es sicherlich sinnvoll, diesen Rezeptor in transgenen Tiermodellen isoliert untersuchen zu können. Allerdings hat die hier charakterisierte Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-Überexpression auch andere Hintergründe. Physiologisch kann es zu einer vermehrten Rezeptordichte oder -expression kommen, der sogenannten *Up-Regulation*. Ein solches ist zum Beispiel bei längerer Gabe von Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-Blockern in Parietalzellen beobachtet worden (Takeuchi et al. 1999). Zusätzlich ist für die Expression des Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor bekannt, daß diese -im Gegensatz zum Histamin-H<sub>1</sub>-Rezeptor- abhängig ist von der vorhandenen Menge endogenem und exogenem Histamins (Fitzsimons et al. 2001). Auch auf genetischer Ebene spielt die Histamin-Rezeptor-Aktivität eine Rolle. Preuss und Kollegen (Preuss et al. 2007) zeigten, daß eine Punktmutation im Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-Gen die basale Rezeptoraktivität sowie den Einfluß von Liganden

verändern kann. Derartige Mutationen wären auch im Menschen denkbar. Da Histamin, wie in der Einleitung dargestellt, ein ubiquitär vorkommendes Amin ist und in einer durchschnittlichen Ernährungsweise häufig aufgenommen wird, könnten selbst kurzzeitige Veränderungen der Rezeptoraktivität funktionelle Auswirkungen haben. Um die verschiedenen Aspekte mit dem Schwerpunkt Herzfunktion zu untersuchen, ist das hier verwendete Tiermodell besonders geeignet.

#### **5.4.2. Stop-Flow-Ischämie**

Auch wurde die Beteiligung des Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptors bei Ischämie/Reperfusion-Schäden am Herzen schon häufiger diskutiert. Zum Beispiel sprechen sowohl die Gruppe um Asanuma, als auch He und Kollegen einer Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-Blockade einen von  $\beta$ -Adrenorezeptor-Blockern unabhängigen protektiven Effekt zu (Asanuma et al. 2006; He et al. 2012). Dieses Wissen konnte durch die vorliegende Arbeit um die Rolle der basalen Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-Aktivität im arrhythmogenen Geschehen ergänzt werden. Auch wenn eine Stop-Flow Ischämie an explantierten Herzen, wie sie hier an der Langendorff-Apparatur durchgeführt wurde, ein gut durchführbares Modell für ischämische Herzkrankheiten darstellt, ist sie in der Regel nicht physiologisch, da es beim Patienten üblicherweise nur zu einer partiellen Ischämie infolge eines Myokardinfarkts kommt. Am ehesten physiologisch ist die Stop-Flow Ischämie des Langendorff-Modells bei Organtransplantation. Auch werden die Methoden der Erhaltung isolierter Organe durch *ex vivo*-Perfusion auf explantierte Herzen angewandt (Tsutsumi et al. 2001; Xin et al. 2017).

#### **5.4.3. Kardiale Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-Signaltransduktion**

In der vorliegenden Arbeit wurde zudem mittels Western Blot und immunologischem Nachweis die Phosphorylierung verschiedener Zielproteine im Zusammenhang positiv inotroper Effekte untersucht. Histamin ist ein Ko-Transmitter im sympathisch-vegetativen System (Vgl. 1.1.). Mit der Erkenntnis, daß Histamin die gleichen Proteine aktivieren kann, wie die adrenerge Reizleitung, spricht das für dessen Rolle in der Therapie kardialer Erkrankungen. Ein wichtiges Beispiel dafür ist die chronische Herzinsuffizienz, welche unter anderem eng mit der Funktion des Phospholambans verbunden ist (Marks 2013). Mehrere Studien sprechen dem Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonismus eine kardioprotektive Rolle im Zusammenhang mit dieser Erkrankung zu, zum Teil auch unabhängig von  $\beta$ -Adrenorezeptorblockern (Adelborg et al. 2018; Kim et al. 2006; Takahama et al. 2010; Zeng et al. 2014). In der hier vorliegenden Arbeit wurde auch eine gesteigerte basale Aktivität des Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptors gezeigt, die unter physiologischen Bedingungen vorkommen kann (Vgl. 5.4.1.). Eine *Up-Regulation* des Rezeptors würde auch mit einer gesteigerten Aktivierung seiner Signalwege einhergehen. Auch wenn die aktuelle Studienlage zu diesem Thema strittig ist, könnte eine Überaktivierung der PKA oder der Calcium-

Calmodulin abhängige Proteinkinase II durch Überphosphorylierung zum Bild der Herzinsuffizienz beitragen (Ikeda et al. 2008).

## 6. Zusammenfassung

Histamin ist ein an vielen Funktionen im Körper beteiligtes biogenes Amin. Es vermittelt seine Wirkung über vier bekannte Rezeptoren, Histamin-H<sub>1</sub>- bis -H<sub>4</sub>-Rezeptoren. Der Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor vermittelt am Herzen verschiedener Spezies, unter anderem auch Maus und Mensch, einen positiv inotropen und chronotropen Effekt. Abgesehen davon ist er in die Genese einiger Kardiopathien involviert, zum Beispiel bei der Entstehung von Herzrhythmusstörungen oder der Herzinsuffizienz. Nachdem es schon einige Untersuchungen zum Thema pathologische Histaminwirkung gibt und ebenfalls ein Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-KO-Mausmodell, war es nun Ziel dieser Arbeit, die kardiale Überexpression des Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptors zu untersuchen und näher zu charakterisieren. Dazu wurde ein transgenes Mausmodell verwendet, bei dem Mäuse der Linie CD1 einen humanen Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor exprimierten. Um sicherzustellen, daß dieser Rezeptor nur am Herzen exprimiert wird, wurde das H<sub>2</sub>-Rezeptor-cDNA unter Kontrolle eines  $\alpha$ -MHC-Promoter in das Mausgenom eingeschleust. Für die weiteren Versuche wurden die so generierten Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-transgenen Tiere (TG) und CD1-Wildtypen (WT), welche hier funktionell keine nachweisbaren Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptoren am Herzen haben, verwendet.

Zwei Versuchsreihen fanden *in vitro* an einer Langendorff-Apparatur statt, an welcher die isolierten, ganzen Mäuseherzen für einen gewissen Zeitraum extrakorporal am Leben gehalten werden konnten. In Versuchsreihe 1 wurden den Herzen verschiedenen herzwirksame Pharmaka verabreicht, wie 1  $\mu$ M Isoprenalin, ein  $\beta$ -Adrenorezeptoragonist, um die Funktion des  $\beta$ -Rezeptor-Effekts zu testen. Außerdem wurde 1  $\mu$ M Histamin verwendet, um das funktionelle Vorhandensein des transgen exprimierten Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptors im Vergleich zum Wildtyp aufzuzeigen und den Histamineffekt am TG zu beobachten. Zur Antagonisierung des Histamineffekts wurden 100  $\mu$ M Cimetidin, ein inverser Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonist, genutzt. In der zweiten Versuchsreihe wurden die Langendorff-Herzen nach einer Stabilisierungsphase einer 20-minütigen Stop-Flow-Ischämie unterzogen und anschließend reperfundiert. Die unterschiedlichen Auswirkungen einer Ischämie auf Wildtypen und Transgene sollten untersucht werden. Nach beiden Versuchsreihen wurden die Tierherzen in flüssigem Stickstoff eingefroren und zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Um die Mechanismen des Histamins über den Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor noch genauer zu definieren, wurden diese Herzen einer weiterführenden biochemischen Untersuchung (Western Blot) unterzogen. Zur Charakterisierung des positiv inotropen Histamineffekts wurden folgende Proteine bzw. deren Phosphorylierung bestimmt: Das gesamte Phospholamban, sowie das an Serin-16 und Threonin-17 phosphorylierte Phospholamban. Außerdem der aktivierte (phosphorylierte) Inhibitor 1, welcher die Aktivität der

Protein-Phosphatase 1 hemmt. Letztlich noch ein Bestandteil des Troponin-Komplexes, das TnI, und Calsequestrin als Beladungskontrolle der Gele.

In den Versuchen an der Langendorff-Apparatur konnte gezeigt werden, daß sich die Herzen von transgenen Tieren unter basalen Bedingungen durch eine geringere Kraftentwicklung, einer höheren Herzfrequenz, Anspannungs- und Erschlaffungszeit (jeweils verkürzt), einer gesteigerten ventrikulären Kraftanstiegsgeschwindigkeit, sowie Kraftabfallgeschwindigkeit von den WT- Herzen unterschieden. Bei beiden Versuchsgruppen konnte außerdem ein positiv inotroper Effekt durch den nichtselektiven  $\beta$ -Rezeptor-Agonisten Isoprenalin erzielt werden. Ein solcher Effekt unter Histamin war allerdings nur bei TG feststellbar. Die positiv inotrope Wirkung des Histamins ließ sich durch die Gabe des inversen Agonisten Cimetidin aufheben, zudem wurde die basal hohe Herzfrequenz in etwa auf das Niveau der Wildtypen gesenkt. Die Ischämiedauer von 20 Minuten führte weder bei WT noch bei TG zu einer meßbaren, irreversiblen Schädigung des Myokards. Allerdings ließ sich ein Unterschied der beiden Gruppen hinsichtlich der Dauer der Reperfusionsarrhythmien feststellen. Bei transgenen Tierherzen hielten die Arrhythmien deutlich länger an, als bei WT. Biochemische Untersuchungen ergaben, daß unter Einwirkung von Histamin bei TG eine Phosphorylierung des Phospholambans (PLB) an Serin-16 und Threonin-17 stattgefunden hatte, nicht jedoch bei CTR oder bei WT. Außerdem war der Gehalt des phosphorylierten Inhibitors 1 höher, als bei CTR bzw. WT.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit die transgene Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-überexprimierende Mauslinie näher charakterisiert. Es konnten basal und unter Einfluß verschiedener herzwirksamer Substanzen Unterschiede zwischen TG und WT festgestellt werden. Das Verhalten unter Ischämie/Reperfusion wurde untersucht, zuletzt noch wurde der Zusammenhang zwischen positiv inotroper Wirkung des Histamins und der PLB-Phosphorylierung gezeigt.

Der kardiale Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor ist dafür bekannt, an mehreren Kardiopathien wie Arrhythmien oder Herzinsuffizienz beteiligt zu sein. Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-Blocker werden daher als medikamentöse Therapie für diese Erkrankungen in Betracht gezogen. Da Histamin in sehr viele Signalübertragungsvorgänge im menschlichen Körper eingebunden ist, ist es wichtig, die Auswirkungen der Rezeptoraktivierung auf bestimmte Organe, wie hier das Herz, isoliert zu evaluieren. Diese Erkenntnisse können zur Beantwortung der Frage nach Möglichkeiten und Grenzen von Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptoren als therapeutisches Ziel beitragen.

## 7. Literaturverzeichnis

- Adelborg K, Sundbøll J, Schmidt M, Bøtker HE, Weiss NS, Pedersen L, Sørensen HT (2018) Use of histamine H<sub>2</sub> receptor antagonists and outcomes in patients with heart failure: A nationwide population-based cohort study. *Clin Epidemiol* 10:521–530
- Agata N, Kato Y, Namekata I, Takahara A, Tanaka H, Chino D, Koike K, Tanaka Y (2010) H<sub>2</sub>receptor-mediated positive inotropic effect of histamine in neonatal guinea-pig left atria. *Biol Pharm Bull* 33:2033–2035
- Akdis AC, Simons RFE (2006) Histamine receptors are hot in immunopharmacology. *European journal of pharmacology* 533:69–76
- Aldi S, Takano K-i, Tomita K, Koda K, Chan NY-K, Marino A, Salazar-Rodriguez M, Thurmond RL, Levi R (2014) Histamine H<sub>4</sub>-receptors inhibit mast cell renin release in ischemia/reperfusion via protein kinase C  $\epsilon$ -dependent aldehyde dehydrogenase type-2 activation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 349:508–517
- Allan G, Levi R (1981) Thromboxane and prostacyclin release during cardiac immediate hypersensitivity reactions in vitro. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 217:157–161
- Almeida DO de, Ferreira HS, Pereira LB, Fregoneze JB (2015) Hypertensive response to stress: The role of histaminergic H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> receptors in the medial amygdala. *Physiol Behav* 144:95–102
- Anrep VG, Barsoum SG, Talaat M (1936) Liberation of histamine by the heart muscle. *The Journal of physiology* 86:431–451
- Asanuma H, Minamino T, Ogai A, Kim J, Asakura M, Komamura K, Sanada S, Fujita M, Hirata A, Wakeno M, Tsukamoto O, Shinozaki Y, Myoishi M, Takashima S, Tomoike H, Kitakaze M (2006) Blockade of histamine H<sub>2</sub> receptors protects the heart against ischemia and reperfusion injury in dogs. *Journal of molecular and cellular cardiology* 40:666–674
- Ash AS, Schild HO (1966) Receptors mediating some actions of histamine. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* 27:427–439
- Au B, Gergs U, Neumann J (2018) Histamine H<sub>2</sub>-receptors affect atrial function during hypoxia and reoxygenation in transgenic mice. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 391:1:39
- Best CH, Dale HH, Dudley HW, Thorpe WV (1927) The nature of the vaso-dilator constituents of certain tissue extracts. *The Journal of physiology* 62:397–417
- Bittner HB, Chen EP, Milano CA, Lefkowitz RJ, van Trigt P (1997) Functional analysis of myocardial performance in murine hearts overexpressing the human beta 2-adrenergic receptor. *Journal of molecular and cellular cardiology* 29:961–967
- Black WJ, Duncan AW, Durant JC, Ganellin RC, Parsons ME (1972) Definition and antagonism of histamine H<sub>2</sub>-receptors. *Nature* 236:385–390
- Bodmer S, Imark C, Kneubhl M (1999) Biogenic amines in foods: Histamine and food processing. *Inflammation research* 48:296–300
- Bolli R, Marbán E (1999) Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev* 79:609–634
- Braunwald E, Bristow MR (2000) Congestive Heart Failure: Fifty Years of Progress. *Circulation : an American Heart Association journal* 102:IV14
- Bristow MR (1997) Mechanism of Action of Beta-Blocking Agents in Heart Failure. *The American journal of cardiology* 80:26L
- Burke AJ, Levi R, Guo GZ, Corey JE (1982) Leukotrienes C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> and E<sub>4</sub>: Effects on human and guinea-pig cardiac preparations in vitro. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 221:235–241
- Cameron SJ, Gaide SM, Goad LP, Altman BC, Cuevas J, Myerburg JR, Bassett LA (1985) Enhanced adverse electrophysiologic effects of histamine after myocardial infarction in guinea pigs. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 232:480–484
- Capurro N, Levi R (1973) Anaphylaxis in the guinea-pig isolated heart: Selective inhibition by burimamide of the positive inotropic and chronotropic effects of released histamine. *British journal of pharmacology* 48:620–628

- Chu G, Lester JW, Young KB, Luo W, Zhai J, Kranias EG (2000) A single site (Ser16) phosphorylation in phospholamban is sufficient in mediating its maximal cardiac responses to beta -agonists. *J Biol Chem* 275:38938–38943
- Cirkel J, Schtz A, Baumert J-H, Adt M (1994) Arrhythmias during CABG-surgery ? Are they partly histamine-induced? *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* 8:175
- Coruzzi G (2012) Role of histamine H4 receptors in the gastrointestinal tract. *Frontiers in Bioscience S4*:226–239
- Dai S (1989) Histamine enhances hypoxia-induced ventricular arrhythmias. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 16:925–931
- Dale HH, Laidlaw PP (1910) The physiological action of beta-aminazolyethylamine. *The Journal of physiology* 41:318–344
- Dhein S, Mohr WF, Delmar M (2005) *Practical Methods in Cardiovascular Research*. Springer Verlag: 168-182
- Dolgin M (ed) (1994) *Nomenclature and criteria for diagnosis of diseases of the heart and great vessels*, 9. ed., 3. print. A Little, Brown handbook. Little Brown and Co, Boston, Mass.
- Du XJ, Dart AM (1993) Mechanisms of noradrenaline release in the anoxic heart of the rat. *Cardiovascular Research* 27:2011–2015
- Eckel L, Gristwood RW, Nawrath H, Owen DA, Satter P (1982) Inotropic and electrophysiological effects of histamine on human ventricular heart muscle. *The Journal of physiology* 330:111–123
- Fahrion CM, Neumann J (2017) *Untersuchungen zur ventrikulären Funktion an Mäusen mit herzspezifischer Deletion von Calsequestrin*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Ferreira R (2010) The reduction of infarct size--forty years of research--second of two parts. *Rev Port Cardiol* 29:1219–1244
- Fitzsimons CP, Lazar-Molnar E, Tomoskozi Z, Buzás E, Rivera ES, Falus A (2001) Histamine deficiency induces tissue-specific down-regulation of histamine H2 receptor expression in histidine decarboxylase knockout mice. *FEBS Lett* 508:245–248
- Fröba J, Gergs U, Neumann J (2018) Histamine increases contractility in isolated cardiomyocytes of mice overexpressing the H2-receptor. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 391:1:59
- Gekle M, Markwardt F, Wischmeyer E, Klöckner Nikilaj, et al. (2010) *Taschenlehrbuch Physiologie: 70 Tabellen*. Thieme, Stuttgart
- Genovese A, Gross SS, Sakuma I, Levi R (1988) Adenosine promotes histamine H1-mediated negative chronotropic and inotropic effects on human atrial myocardium. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 247:844–849
- Gergs U, Baumann M, Böckler A, Buchwalow IB, Ebelt H, Fabritz L, Hauptmann S, Keller N, Pönicke K, Rueckschloss U, Werner F, Neumann J (2010) Cardiac overexpression of the human 5-HT4 receptor in mice. *American journal of physiology / Heart and circulatory physiology* 299:788–798
- Ginsburg R, Bristow RM, Stinson BE, Harrison CD (1980) Histamine receptors in the human heart. *Life sciences* 26:2245–2249
- Goren N, Perez Leiros C, Sterin-Borda L, Borda E (1994) Effect of histamine in autoimmune myocarditis mice. *Int J Immunopharmacol* 16:737–745
- Hageman RG, Urthaler F, Isobe HJ, James NT (1979) Chronotropic and dromotropic effects of histamine on the canine heart. *Chest* 75:597–604
- Halsz A, Barth g, Simon-Sarkadi L, Holzapfel W (1994) Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology* 5:42–49
- He G, Hu J, Ma X, Li M, Wang H, Meng J, Jia M, Luo X (2008) Sympathetic histamine exerts different pre- and post-synaptic functions according to the frequencies of nerve stimulation in guinea pig vas deferens. *Journal of neurochemistry* 106:1710–1719
- He G, Hu J, Li T, Ma X, Meng J, Jia M, Lu J, Ohtsu H, Chen Z, Luo X (2012) Arrhythmogenic effect of sympathetic histamine in mouse hearts subjected to acute ischemia. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 18:1–9

- Hill SJ, Ganellin CR, Timmerman H, Schwartz JC, Shankley NP, Young JM, Schunack W, Levi R, Haas HL (1997) International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmacol Rev* 49:253–278
- Huang M, Pang X, Letourneau R, Boucher W, Theoharides TC (2002) Acute stress induces cardiac mast cell activation and histamine release, effects that are increased in Apolipoprotein E knockout mice. *Cardiovascular research : journal of the European Society of Cardiology* 55:150–160
- Iaizzo AP (ed) (2005) *Handbook of Cardiac Anatomy, Physiology, and Devices*. Humana Press
- Ikeda Y, Hoshijima M, Chien KR (2008) Toward biologically targeted therapy of calcium cycling defects in heart failure. *Physiology (Bethesda)* 23:6–16
- Johnson LC, Weinstein H, Green PJ (1979) Studies on histamine H<sub>2</sub> receptors coupled to cardiac adenylate cyclase. Blockade by H<sub>2</sub> and H<sub>1</sub> receptor antagonists. *Molecular pharmacology* 16:417–428
- Jutel M, Akdis M, Akdis CA (2009) Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. *Clin Exp Allergy* 39:1786–1800
- Kaplan P, Matejovicová M, Lehotsky J, Flameng W (2002) Effect of myocardial stunning on thiol status, myofibrillar ATPase and troponin I proteolysis. *Mol Cell Biochem* 233:145–152
- Khilnani G, Khilnani AK (2011) Inverse agonism and its therapeutic significance. *Indian J Pharmacol* 43:492–501
- Kim J, Ogai A, Nakatani S, Hashimura K, Kanzaki H, Komamura K, Asakura M, Asanuma H, Kitamura S, Tomoike H, Kitakaze M (2006) Impact of blockade of histamine H<sub>2</sub> receptors on chronic heart failure revealed by retrospective and prospective randomized studies. *Journal of the American College of Cardiology* 48:1378–1384
- Klein I, Levey SG (1971) Activation of myocardial adenyl cyclase by histamine in guinea pig, cat, and human heart. *The Journal of clinical investigation* 50:1012–1015
- Klocker J, Mätzler SA, Huetz G-N, Drasche A, Kolbitsch C, Schwelberger HG (2005) Expression of histamine degrading enzymes in porcine tissues. *Inflammation research* 54 Suppl 1:S54-7
- Kloner RA, Jennings RB (2001a) Consequences of brief ischemia: Stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation* 104:2981–2989
- Kloner RA, Jennings RB (2001b) Consequences of brief ischemia: Stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 2. *Circulation* 104:3158–3167
- Kobayashi T, Inoue I, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Watanabe T (1996) Cloning, RNA expression, and chromosomal location of a mouse histamine H<sub>2</sub> receptor gene. *Genomics* 37:390–394
- Köhler F, Kirchhefer U, Gergs U, Neumann J (2013) Phenotype of mice with cardiac overexpression of histamine H<sub>2</sub>-receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 386:43
- Kranias EG, Hajjar RJ (2017) The Phospholamban Journey 4 Decades After Setting Out for Ithaca. *Circulation research* 120:781–783
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Langendorff O (1895) Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Pflügers Archiv* 61:291–332
- Lawson CS, Coltart DJ, Hearse DJ (1993) "Dose"-dependency and temporal characteristics of protection by ischaemic preconditioning against ischaemia-induced arrhythmias in rat hearts. *Journal of molecular and cellular cardiology* 25:1391–1402
- Levi R, Chenouda AA, Trzeciakowski PJ, Guo GZ, Aaronson ML, Luskind DR, Lee HC, Gay AW, Subramanian AV, McCabe CJ, Alexander CJ (1982) Dysrhythmias caused by histamine release in guinea pig and human hearts. *Klinische Wochenschrift* 60:965–971
- Levi R, Smith NCE (2000) Perspectives in Pharmacology - Histamine H<sub>3</sub>-Receptors: A New Frontier in Myocardial Ischemia. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics : a publ. of the American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* 292:825–830

- Liu X, Callaerts-Vegh Z, Evans KLJ, Bond RA (2002) Chronic infusion of beta-adrenoceptor antagonist and inverse agonists decreases elevated protein kinase A activity in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of human beta 2-adrenoceptor. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 40:448–455
- Luo T, Chen B, Zhao Z, He N, Zeng Z, Wu B, Fukushima Y, Dai M, Huang Q, Xu D, Bin J, Kitakaze M, Liao Y (2013) Histamine H2 receptor activation exacerbates myocardial ischemia/reperfusion injury by disturbing mitochondrial and endothelial function. *Basic research in cardiology* 108:342–356
- MacLennan DH, Kranias EG (2003) Phospholamban: A crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:566–577
- Maintz L, Novak N (2007) Histamine and histamine intolerance. *The American journal of clinical nutrition* 85:1185–1196
- Maintz L, Bieber T, Novak N (2006) Medizin - Die verschiedenen Gesichter der Histaminintoleranz. *Deutsches Ärzteblatt* 103:3027–3033
- Maltsev VA, Lakatta EG (2008) Dynamic interactions of an intracellular Ca<sup>2+</sup> clock and membrane ion channel clock underlie robust initiation and regulation of cardiac pacemaker function. *Cardiovascular Research* 77:274–284
- Marks AR (2013) Calcium cycling proteins and heart failure: Mechanisms and therapeutics. *The Journal of clinical investigation* 123:46–52
- Maslinski C, Fogel AW (1991) Catabolism of Histamine. In: *Histamine and Histamine Antagonists*. Springer Berlin Heidelberg, pp 165–189
- Matsuda N, Jesmin S, Takahashi Y, Hatta E, Kobayashi M, Matsuyama K, Kawakami N, Sakuma I, Gando S, Fukui H, Hattori Y, Levi R (2004) Histamine H1 and H2 receptor gene and protein levels are differentially expressed in the hearts of rodents and humans. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 309:786–795
- McDonough JL, Labugger R, Pickett W, Tse MY, MacKenzie S, Pang SC, Atar D, Ropchan G, van Eyk JE (2001) Cardiac troponin I is modified in the myocardium of bypass patients. *Circulation* 103:58–64
- Meister J, Gergs U, Neumann J (2014) Effects of dimaprit in H2 histamine-receptor overexpressing mice. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 387:1:67
- Mikhail P, Verma S, Fedak PWM, Weisel RD, Li R-K (2003) Does ischemic preconditioning afford clinically relevant cardioprotection? *Am J Cardiovasc Drugs* 3:1–11
- Milano CA, Allen LF, Rockman HA, Dolber PC, McMinn TR, Chien KR, Johnson TD, Bond RA, Lefkowitz RJ (1994) Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the beta 2-adrenergic receptor. *Science* 264:582–586
- Monczor F, Fernandez N, Legnazzi BL, Riveiro ME, Baldi A, Shayo C, Davio C (2003) Tiotidine, a histamine H2 receptor inverse agonist that binds with high affinity to an inactive G-protein-coupled form of the receptor. Experimental support for the cubic ternary complex model. *Molecular pharmacology* 64:512–520
- Moss J, Rosow CE (1983) Histamine release by narcotics and muscle relaxants in humans. *Anesthesiology* 59:330–339
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA (1986) Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74:1124–1136
- Ning XH, Xu CS, Song YC, Childs KF, Xiao Y, Bolling SF, Lupinetti FM, Portman MA (1998) Temperature threshold and modulation of energy metabolism in the cardioplegic arrested rabbit heart. *Cryobiology* 36:2–11
- Novartis Foundation; ebrary, Inc (2006) Heart failure: Molecules, mechanisms and therapeutic targets. *Novartis Foundation symposium*, vol 274. John Wiley, Chichester
- Owen DAA (1977) Histamine receptors in the cardiovascular system. *General Pharmacology: The Vascular System* 8:141–156
- Patella V, Marinò I, Lampärter B, Arbustini E, Adt M, Marone G (1995) Human heart mast cells. Isolation, purification, ultrastructure, and immunologic characterization. *J Immunol* 154:2855–2865
- Porzio MA, Pearson AM (1977) Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* 490:27–34

- Preuss H, Ghorai P, Kraus A, Dove S, Buschauer A, Seifert R (2007) Cellular and Molecular - Mutations of Cys-17 and Ala-271 in the Human Histamine H2 Receptor Determine the Species Selectivity of Guanidine-Type Agonists and Increase Constitutive Activity. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics : a publ. of the American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* 321:975–982
- Rangachari PK (1992) Histamine: Mercurial messenger in the gut. *The American journal of physiology* 262:G1-13
- Reinhardt D, Schmidt U, Brodde OE, Schümann HJ (1977) H1 - and H2-receptor mediated responses to histamine on contractility and cyclic AMP of atrial and papillary muscles from guinea-pig hearts. *Agents and actions* 7:1–12
- Sattler J, Häfner D, Klotter HJ, Lorenz W, Wagner PK (1988) Food-induced histaminosis as an epidemiological problem: Plasma histamine elevation and haemodynamic alterations after oral histamine administration and blockade of diamine oxidase (DAO). *Agents and actions* 23:361–365
- Schneider EH, Neumann D., Seifert R. (2014) Modulation of behavior by the histaminergic system: lessons from H(1)R-and H(2)R-deficient mice. *Neurosci Biobehav Rev*:252–266
- Segal J, Schwalb H, Shmorak V, Uretzky G (1990) Effect of anesthesia on cardiac function and response in the perfused rat heart. *Journal of molecular and cellular cardiology* 22:1317–1324
- Senges J, Randolph U, Katus H (1977) Ventricular arrhythmias in cardiac anaphylaxis. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 300:115–121
- Singh S, Johnson PI, Javed A, Gray TS, Lonchyna VA, Wurster RD (1999) Monoamine- and histamine-synthesizing enzymes and neurotransmitters within neurons of adult human cardiac ganglia. *Circulation* 99:411–419
- Solaro RJ, Moir AJ, Perry SV (1976) Phosphorylation of troponin I and the inotropic effect of adrenaline in the perfused rabbit heart. *Nature* 262:615–617
- Takahama H, Asanuma H, Sanada S, Fujita M, Sasaki H, Wakeno M, Kim J, Asakura M, Takashima S, Minamino T, Komamura K, Sugimachi M, Kitakaze M (2010) A histamine H2 receptor blocker ameliorates development of heart failure in dogs independently of  $\beta$ -adrenergic receptor blockade. *Basic research in cardiology* 105:787–794
- Takeuchi K, Kajimura M, Kodaira M, Lin S, Hanai H, Kaneko E (1999) Up-regulation of H2 receptor and adenylate cyclase in rabbit parietal cells during prolonged treatment with H2-receptor antagonists. *Digestive diseases and sciences* 44:1703–1709
- Thoren FB, Aurelius J, Martner A (2011) Antitumor properties of histamine in vivo. *Nat Med* 17:537
- Trzeciakowski PJ, Levi R (1982) Reduction of ventricular fibrillation threshold by histamine: Resolution into separate H1- and H2-mediated components. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 223:774–783
- Trzeciakowski PJ, Levi R (1981) Cardiac histamine: A mediator in search of a function. *Trends in Pharmacological Sciences* 2:14–17
- Tsutsumi H, Oshima K, Mohara J, Takeyoshi I, Aizaki M, Tokumine M, Matsumoto K, Morishita Y (2001) Cardiac transplantation following a 24-h preservation using a perfusion apparatus. *J Surg Res* 96:260–267
- Vafiadaki E, Arvanitis DA, Sanoudou D, Kranias EG (2013) Identification of a protein phosphatase-1/phospholamban complex that is regulated by cAMP-dependent phosphorylation. *PLoS ONE* 8:e80867
- van de Voorde J, Leusen I (1984) Effect of histamine on aorta preparations of different species. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie* 268:95–105
- Watanabe T, Yanai K (2001) Studies on functional roles of the histaminergic neuron system by using pharmacological agents, knockout mice and positron emission tomography. *The Tohoku journal of experimental medicine* 195:197–217
- Watanabe T, Taguchi Y, Maeyama K, Wada H (1991) Formation of Histamine: Histidine Decarboxylase. In: *Histamine and Histamine Antagonists*. Springer Berlin Heidelberg, pp 145–163

- Wellner-Kienitz M-C, Bender K, Meyer T, Pott L (2013) Coupling to Gs and Gq/11 of histamine H2 receptors heterologously expressed in adult rat atrial myocytes. *Molecular cell research* 1642:67–78
- Weston MC, Peachell PT (1998) Reviews - Regulation of human mast cell and basophil function by cAMP. *General pharmacology* 31:715–720
- White VM (1990) The role of histamine in allergic diseases. *The Journal of allergy and clinical immunology* 86:599–605
- Williams TM, Waksman R, Silva K de, Jacques A, Mahmoudi M (2015) Ischemic preconditioning—an unfulfilled promise. *Cardiovasc Revasc Med* 16:101–108
- Windhaus A, Voigt W (1907) Synthesen des Imidazolyläthylamins. *Deutsche Chemische Gesellschaft*:3691
- Wolff AA, Levi R (1986) Histamine and cardiac arrhythmias. *Circulation research* 58:1–16
- Xin L, Gellner B, Ribeiro RVP, Ruggeri GM, Banner D, Meineri M, Rao V, Zu J, Badiwala MV (2017) A New Multi-Mode Perfusion System for Ex Vivo Heart Perfusion Study. *J Med Syst* 42:25
- Yilmaz R, Yuksekbaz O, Erkol Z, Bulut ER, Arslan MN (2009) Postmortem findings after anaphylactic reactions to drugs in Turkey. *Am J Forensic Med Pathol* 30:346–349
- Yoshikawa T, Naganuma F, Iida T, Nakamura T, Harada R, Mohsen AS, Kasajima A, Sasano H, Yanai K (2013) Molecular mechanism of histamine clearance by primary human astrocytes. *Glia* 61:905–916
- Zeng Z, Shen L, Li X, Luo T, Wei X, Zhang J, Cao S, Huang X, Fukushima Y, Bin J, Kitakaze M, Xu D, Liao Y (2014) Disruption of histamine H2 receptor slows heart failure progression through reducing myocardial apoptosis and fibrosis. *Clinical science* 127:435–448
- Zhang J, Cai W-K, Zhang Z, Wang P, Lin X-Q, Feng J, Fu S-C, He G-H (2018) Cardioprotective effect of histamine H2 antagonists in congestive heart failure: A systematic review and meta-analysis. *Medicine* 97:409
- Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Mann DL, Tomaselli GF, Braunwald E (eds) (2018) *Braunwald's heart disease: A textbook of cardiovascular medicine*, 11. edition. Elsevier 403-589

## 8. Thesen

- 1.) Das transgene Tiermodell einer Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-Überexpression konnte erfolgreich generiert werden.
- 2.) Es konnten keine makroskopischen Unterschiede zwischen Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-transgenen Tieren und Wildtyp-Herzen festgestellt werden.
- 3.) Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor transgene Mäuse unterschieden sich basal in mehreren Parametern der Herzmechanik von Wildtypen, und zwar in der Kontraktionskraft, der Herzfrequenz, der Anspannung- bzw. Erschlaffungszeit, sowie der Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit.
- 4.) Die basal erhöhte Herzfrequenz von Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-transgenen Mäusen konnte durch Histamin nicht weiter gesteigert werden.
- 5.) Die Kontraktionskraft der Herzen von Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-transgenen Mäusen konnte durch Isoprenalin und Histamin weiter gesteigert werden.
- 6.) Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-überexprimierende Herzen zeigten basal vermehrt Arrhythmien.
- 7.) Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-überexprimierende Herzen waren anfälliger für Reperfusionsarrhythmien.
- 8.) Eine Aktivierung des Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptors hat vergleichbare Effekte auf die Phosphorylierung von Phospholamban und PP1-Inhibitor 1 wie die Aktivierung von  $\beta$ -Rezeptoren und wirkt somit positiv inotrop.
- 9.) Der Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor besitzt möglicherweise therapeutisches Potenzial bei der Behandlung von Kardiopathien, unabhängig von  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren.
- 10.) Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-Mutationen könnten Veränderungen der basalen Herzfunktion bedingen.

## 9. Anlagen

### Puffer und Lösungen

Die verwendeten Chemikalien wurden in pro analysi-Qualität oder im bestmöglichen, kommerziell erhältlichen Reinheitsgrad verwendet. Das für Puffer und Lösungen verwendete Wasser wurde als Reinstwasser aus einer Wasseraufbereitungsanlage gewonnen. Alle Materialien wurden durch das Institut für Pharmakologie und Toxikologie bereitgestellt.

### Langendorff-Versuche

#### Tyrode-Lösung

##### Stamm I

NaCl	17,5 % (g/V)
KCl	1,005 % (g/V),
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,56 % (g/V)

##### Stamm II

NaHCO <sub>3</sub>	5,00 % (g/V)
--------------------	--------------

##### Stamm III

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,29 % (g/V)
NaCl	119,8 mM
KCl	5,4 mM
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	1,1 mM
NaHCO <sub>3</sub>	22,6 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,42 mM
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	1,8 mM
Glucose	5,05 mM
Ascorbinsäure	0,28 mM
Na-EDTA	0,05 mM

pH 7,4

#### Narkose:

Stammlösung: Pentobarbital 0,5g/10ml physiologische Kochsalzlösung

Heparin 1000 IE intraperitoneal

## Molekularbiologische Versuche

### Genotypisierung der Versuchstiere

Protokoll:

Lösung 1:

1M NaOH                    250 µl

10 mM EDTA pH 8.0    100 µl

ddH<sub>2</sub>O                    10 ml

→ Davon 250 µl je Probe, über Nacht bei 55°C schüttelnd inkubieren

Lösung 2:

Tris-HCl                    0,23g/50 ml

→ 250 µl je Probe zum Neutralisieren

PCR-Mastermix: (Mengenangabe pro PCR-Reaktion)

dd H<sub>2</sub>O                    8 µl

2-Fach Super Master Mix

(Biotool)                    10 µl

Reverse Primer

hH2R-SEQ-P1R            0,5 µl

(5'-AGCAGGTCAGTGATAGCCAA-3')

Forward Primer

MHC-SEQ-P1              0,5 µl

(5'-ACCCTTACCCACATAGACC-3')

DNA                        1 µl

2-Fach Super Master Mix (Biotool) Komponenten

B46015/8/9: 2 x PCR Super Master Mix (Dye Plus)

100 U/ml Taq DNA polymerase, 0,5 mM dNTPs, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, Stabilisatoren, Farbstoff

Agarosegel

Agarose 1 %, 1x TAE-Puffer, SafeRed Farbstoff

50x TAE-Puffer

Tris Base                    1,99 M

Eisessig                    0,99 M

EDTA                        59,5 mM

## GeneRuler

100 bp DNA Ladder

### PCR-Programm

Denaturierung	94°C	5 Minuten	1 Zyklus
Denaturierung	94°C	20 Sekunden	30 Zyklen
Annealing	60°C	30 Sekunden	
Elongation	72°C	1 Minute	
Elongation	72°C	5 Minuten	1 Zyklus
Lagerung	4°C		

## Biochemische Versuche

### Homogenisierung

Homogenisationspuffer:

NaHCO<sub>3</sub>/SDS                    3 Teile NaHCO<sub>3</sub> 10 mM

1 Teil SDS 20% (Endkonzentration: 5% SDS)

*pH ca. 7,4 (wird nicht eingestellt)*

LOWRY Protokoll:

Proteinstandard 1 mg Albumin/ml entmineralisiertes Wasser 1:100 verdünnt

Stammlösung A: 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 0,1 M NaOH

Stammlösung B: 1% K-Na-Tartrat 4H<sub>2</sub>O

Stammlösung C: 0,5% CuSO<sub>4</sub>

Lösung D:

49 ml Lösung A

0,5 ml Lösung B

0,5 ml Lösung C

Lösung E: Folin-Ciocalteu (1 Teil Folin, 2 Teile entmineralisiertes Wasser)

### SDS-Page und Western Blot

2x Probenpuffer:

Tris-Base                    0,25 M

SDS                            8%,

Glycerol                    40%

Bromphenolblau            0,004%

*pH 6,8*

Die Proben wurden entsprechend ihres spezifischen Proteingehaltes und der gewünschten Endkonzentration, mit Probenpuffer und NaHCO<sub>3</sub>/SDS aufgearbeitet.

Porzio-Trenngel 10%

37,5 ml Porziopuffer

24,5 ml Rotiphorese® Gel 30

6,25 ml Glycerin

6,385 ml H<sub>2</sub>O dest

65 µl TEMED

300 µl 10% APS

Sammelgel 4%

4,7 ml Sammelgelpuffer

2,55 ml Rotiphorese® Gel 30

11,8 ml H<sub>2</sub>O dest

12 µl TEMED

190 µl 10% APS

Porziopuffer

Tris-Base                    0,2 M

(2x) Glycin                0,6 M

EDTA                        0,12 mM

SDS                         0,2%

Glycin                      10%

Polyacrylamid            0,4%

*pH 8,8*

Sammelgelpuffer

Tris-Base                    0,5 M

(4x) SDS                    0,4%

*pH 8*

APS (10%)

Ammoniumpersulfat *gelöst in Aqua destillata*

#### Elektrophoresepuffer

Tris-Base 0,4 M

(10x) Glycin 1,2 M

SDS 0,4%

pH 8,8; gelöst in 1l Aqua destillata

Der Elektrophoresepuffer wurde in einer 1:10 Verdünnung verwendet.

#### Proteinstandard

##### Blotting-Puffer (Transferpuffer)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 40 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7,9 mM

*pH 8; gelöst in 5l Aqua destillata*

#### Ponceau-Rot

Ponceau S 0,2%

Trichloressigsäure 2%

#### **Immunologischer Proteinnachweis**

##### TBST

Tris-Base 10 mM

NaCl 150 mM

Tween 20 0,1% (V/V)

pH 7,4

#### Milchpulver-Blockierungspuffer

Magermilchpulver (5% W/V) *in TBST gelöst*

#### BSA-Blockierungspuffer

Rinderserum-Albumin (2% W/V) *in TBST gelöst*

#### AP-Puffer

Triethanolamin 100 mM

NaCl 100 mM

MgCl<sub>2</sub> 5 mM

pH 9,4

## ECF-Substrat-Lösung

ECF-Substrat 36 mg in ECF dilution buffer 60 ml gelöst

### Verwendete Antikörper:

1. Antikörper (Anti-)	Größe kDa	Verdünnung	Medium	2. Antikörper (Medium)
CSQ	54/55	1:1000	Milchpulver 5% in TBST	Anti-mouse-IgG (5% Milchpulver in TBST)
SER16	<12 (gekocht)	1:5000	BSA 2% In TBST	Anti-rabbit-IgG (5% Milchpulver in TBST)
THR17	<12 (gekocht)	1:5000	BSA 2% In TBST	Anti-rabbit-IgG (5% Milchpulver in TBST)
P-TNI	30 (gekocht)	1:1000	BSA 2% In TBST	Anti-rabbit-IgG (2% BSA in TBST)
Phospho-DARPP-32	30 (gekocht)	1:500	BSA 2% In TBST	Anti-rabbit-IgG (2% BSA in TBST)
PLB-A1	<12 (gekocht)	1:5000	BSA 2% In TBST	Anti-mouse-IgG (5% Milchpulver in TBST)

### Substanzen

Agarose, Typ SeaKem	FMC bioproducts, Philadelphia, USA
Ammoniumpersulfat 10% (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
L (+) - Ascorbinsäure	Merck, Darmstadt
Bovine Serum Albumine	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
CaCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
Cimetidin	Sigma-Aldrich, Steinheim
CuSO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
DNA-Ladder GeneRuler™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
dNTP MBI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ECF dilution buffer	GE Healthcare, Berlin
ECF Substrat	GE Healthcare, Berlin
Eisessig	Merck, Darmstadt
Essigsäure 100 %	Merck, Darmstadt
Ethanol 100 % C.	Roth GmbH, Karlsruhe
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	Merck, Darmstadt
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerol	Roth, Karlsruhe
HCl	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Heparin	Biochrom AG, Berlin
Histamin	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Isoprenalin	Sigma-Aldrich, Steinheim
KCl	Roth, Karlsruhe
K <sup>+</sup> -Na <sup>+</sup> -Tartrat	Sigma-Aldrich, Steinheim

Magermilchpulver	TSI GmbH, Zeven
MgCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Na <sub>2</sub> -EDTA	C. Roth GmbH, Karlsruhe
NaHCO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Pentobarbital	Spofa, Prag, Tschechien
Polyacrylamid	Roth, Karlsruhe
Ponceau S-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Red-Safe-Farbstoff	iNTRON, Seongnam, South Korea
Super-PCR-Mastermix	Biotoool GmbH, Oberasbach
N,N,N',N'-Tetramethyl- ethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Triethanolamin	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Tween 20	Merck, Darmstadt
<b>Geräte, Zubehör und Software</b>	
AlphaDigiDoc RT 312nm/254nm	Sigma-Aldrich, Steinheim
Biophotometer	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Elektrophorese-Einheit SE 600	Hoefer, San Francisco, USA
Elektrophoresekammer Typ Horizon 58	Life Technologies, Gaithersburg, USA
Filtersystem	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Peristaltikpumpe	Ismatec, Cole-Parmer GmbH, Wertheim
Flussmessgerät	Transonic Systems Inc., Ithaca, USA
Glasware	Schott AG, Mainz
Gefäße 1 ml, 2 ml	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Heizgerät Lauda Alpha	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen
Injektionszubehör	B.Braun AG, Melsungen
Langendorff Datenerfassung PowerLab	ADInstruments, Oxford, UK
Microsoft Excel	Microsoft Cooperation, Redmont, USA
Mikrodismembrator S	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen

Mikroskop	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
PCR Gerät: Mastercycler gradient	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
pH-Meter	WTW GmbH, STH 600, Weilheim
Präparationsbesteck Aesculap	B.Braun AG, Melsungen
Prism 5	GraphPad Software, San Diego, USA
Rütteltisch: Kreisrüttler 3015	GFL GmbH, Hannover
Spritzanlage Injekt®	B.Braun AG, Melsungen
Stromstärkegeber Standard Powerpack p25	Biometra GmbH, Göttingen
ThermoMixer® F	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Transfer-Einheit TE 62	Hoefer, San Francisco, USA
Typhoon 9410 Variable Mode Imager	Amersham Biosciences, Freiburg
UV-Betrachter	PEQLAB GmbH, Erlangen
Vortex Shaker Eppendorf Mixer 5432	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Waage Typ AT261 DeltaRange	Mettler Instruments GmbH, Gießen
Waage Typ XS205 Teldeo Dualrange	Mettler Instruments GmbH, Gießen
Zentrifuge Modell 5415 C	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

### **Publikationen**

Gergs U, Griethe K, Mißlinger N, Neumann J (2017) Transgenic mice as model to study the role of the human H<sub>2</sub> receptor in the heart. *Inflamm Res* 66 (Suppl 1): S43

Gergs U., Bernhardt G., Buchwalow I.B., Edler H., Fröba J., Kirchhefer U., Köhler F., Mißlinger N., Wache H., Neumann J.: Initial characterization of transgenic mice overexpressing human histamine H<sub>2</sub> receptors (Eingereicht)

### **Posterbeitrag**

Mißlinger N, Gergs U, Neumann J (2017) Ischemia und reperfusion in the mouse heart overexpressing the H<sub>2</sub>-receptor. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 390 (Suppl 1): S33

## **10. Selbstständigkeitserklärung**

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

(2) Erklärung zum Wahrheitsgehalt der Angaben

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

Halle (Saale), Februar 2019

Natascha Mißlinger

### **11. Eidesstattliche Erklärung**

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

Halle (Saale), Dezember 2019

Natascha Mißlinger

## 12. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Natascha Katharina Mißlinger
Geburtsdatum	19.06.1993
Eltern	Karin und Klaus Mißlinger
Anschrift	Leibnizstraße 16 39104 Magdeburg

### Schulische Laufbahn

1999-2003	Grundschule Sankt-Peter-und-Paul in Landshut
2003-2011	Hans-Carossa-Gymnasium Landshut; Erlangen der Allgemeinen Hochschulreife
2011-2012	Berufsschule II in Landshut, Ausbildung zur ZFA (nicht abgeschlossen)

### Studium

WS 2012/13	Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2015	Erstes Staatsexamen der Zahnmedizin („Physikum“)
2015	Studentische Hilfskraft im Institut für Anatomie der Universität Halle-Wittenberg
Seit 2016	Aufnahme einer experimentellen Doktorarbeit mit dem Thema „Charakterisierung isoliert perfundierter Herzen von Histamin-H <sub>2</sub> -Rezeptor überexprimierenden Mäusen.“ am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Halle-Wittenberg
2017	Zweites Staatsexamen der Zahnmedizin und Approbation als Zahnarzt
Seit 2018	Promotionsstudium an der Universität Halle-Wittenberg

### Berufliche Tätigkeit

Seit 01.05.2018	Assistenz Zahnärztin in der Praxis Raedler in Magdeburg
-----------------	---

### **13. Danksagung**

Meinem Doktorvater, Herrn **Professor Dr. med. Joachim Neumann** (Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Halle-Wittenberg) danke ich außerordentlich für die Überlassung dieses interessanten Themas, sein unermüdliches Engagement in allen theoretischen und praktischen Belangen sowie die konstruktive Begleitung bis zur Fertigstellung der Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Halle-Wittenberg. Vor allem bedanke ich mich bei meinen direkten Betreuern, Herrn **Dr. Ulrich Gergs**, Frau **Sonja Reber**, Herrn **Dr. Hartmut Wache** und selbstverständlich Frau **Stephanie Simmroth**.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn **Professor Dr. med. Roland Seifert** (Institut für Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover) für die Bereitstellung der humanen cDNA zur Generierung des hier verwendeten Mausmodells.

Meiner **Familie** danke ich ganz besonders herzlich für jegliche Unterstützung.

All meinen **Freunden** sei an dieser Stelle herzlichst gedankt.