

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Herr Prof. Dr. med. J. Neumann)

**Charakterisierung eines transgenen Tiermodells mit
herzspezifischer Überexpression von humanen
Serotoninrezeptoren Typ 4a**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

<Doktor der Medizin (Dr. med.)>

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Anne Böckler

geboren am 13.03.1984 in Halle/Saale.

Gutachter: Herr Prof. Dr. med. J. Neumann
Herr Prof. Dr. med. K. Werdan
Herr Prof. Dr. med. W. Zimmermann

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 08.05.2012

Tag der Verteidigung: 12.02.2013

Referat und bibliographische Angaben

Die vorliegende Arbeit dient der näheren Charakterisierung eines neuen transgenen Tiermodells. Dazu wurde der humane 5-HT_{4a}-Rezeptor in Mäusen, unter Kontrolle der α -Isoform der schweren Kette des Myosins, herzspezifisch überexprimiert. Diese Überexpression führte zu keiner Veränderung der Lebenserwartung, der Herzgröße und der Herzleistung (Gergs et al., 2010).

Die Experimente wurden mit transgenen Tieren (TG) und Wildtypen (WT) im Vergleich durchgeführt. Die kardialen Einflüsse von 5-HT auf die Tiere wurden *in vivo* mittels invasiver Linksherzkathetertechnik untersucht. Dabei wurden Herzfrequenz, systolischer linksventrikulärer Druck, sowie dp/dt_{min} (Druckabfallgeschwindigkeit) und dp/dt_{max} (Druckanstiegsgeschwindigkeit) gemessen. Unter Kontrollbedingungen unterschieden sich die genannten Parameter von TG und WT nicht. Signifikante Unterschiede zwischen WT und TG nach Stimulation mit 5-HT zeigten sich im Anstieg von Herzfrequenz und Druckabfallgeschwindigkeit der TG.

In vitro wurden Frequenz- und Kontraktionskraftmessungen an isolierten rechten und linken Vorhöfen von TG und WT durchgeführt. Ein Anstieg der Herzfrequenz der rechten Vorhöfe sowie der Kontraktionskraft der linken Vorhöfe der TG im Vergleich zu den WT wies auf die erfolgreiche Überexpression der 5-HT_{4a}-Rezeptoren hin. Zu dieser Annahme trägt auch die Abnahme der Effekte von 5-HT in Anwesenheit der spezifischen 5-HT₄-Rezeptor-Antagonisten GR125487 und GR113808 bei. Die linken Vorhöfe der TG zeigten häufiger spontane arrhythmische Kontraktionen als die der WT. Dies unterstützt die Hypothese, 5-HT könne kardiale Arrhythmien auslösen.

Auf Proteinebene führte 5-HT bei den Vorhöfen der TG, jedoch nicht der WT zu einer gesteigerten Phosphorylierung des Ca-regulierenden Proteins Phospholamban (PLB) an den Aminosäuren Serin16 und Threonin17. Dies kann über ein erhöhtes Ca²⁺-Angebot die Relaxationszeit verkürzen und letztlich positiv inotrop wirken.

Böckler, Anne: Charakterisierung eines transgenen Tiermodells mit herzspezifischer Überexpression von humanen Serotoninrezeptoren Typ 4a

Halle (Saale), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Medizinische Fakultät, Dissertation, 76 Seiten, 2012

Inhaltsverzeichnis		Seite
1.	Einleitung	1
1.1	5-HT-Rezeptoren	1
1.2	Die Regulation des menschlichen Herzzyklus	2
1.3	Beeinflussung des menschlichen Herzzyklus durch 5-HT ₄ -Rezeptoren	3
2.	Zielstellung	7
3.	Material und Methoden	7
3.1	5-HT _{4a} -Rezeptor überexprimierende Mäuse	7
3.2.	Behördliche Genehmigungen und Sicherheitsbestimmung	8
3.3	Genotypisierung	9
3.3.1	Isolation der DNA	9
3.3.2	Konzentrationsbestimmung der DNA	9
3.3.3	PCR und Agarosegelelektrophorese	10
3.4	Invasive hämodynamische Messungen	10
3.4.1	Anästhesie der Tiere	10
3.4.2	Präparation	11
3.4.3	Datenerfassung	11
3.4.4	Stimulation mit 5-HT	12
3.5	Kontraktionskraft- und Frequenzmessungen an isolierten Herzvorhöfen	12
3.5.1	Herstellung der Badlösung	12
3.5.2	Messanlage und Kalibrierung	13
3.5.3	Präparation der Vorhöfe	13
3.5.4	Serotonin und 5-HT-Antagonisten	14
3.5.5	Kokain	14
3.5.6	Reserpin	14
3.5.7	IBMX	15
3.5.8	Messprotokolle	15
3.6	Untersuchungen auf Proteinebene	18
3.6.1	Herstellung von Proteinextrakten	18
3.6.2	Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot	19
3.6.3	Immunologischer Nachweis von Serin16- und Threonin17-phosphoryliertem PLB sowie Calsequestrin	19
3.7	Tryptophan-, 5-HT- und Katecholaminbestimmungen mittels HPLC	20
3.8	Statistische Auswertung	21

4.	Ergebnisse	22
4.1	Genotypisierung der Versuchstiere	22
4.2	Hämodynamische Messungen mittels Linksherzkatheter	23
4.3	Kontraktionskraft- und Frequenzmessungen an Herzvorhöfen	26
4.3.1	Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit 5-HT	26
4.3.2	Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit Isoprenalin	29
4.3.3	Vergleich der Wirkung von 5-HT und Isoprenalin	32
4.3.4	Arrhythmien an isolierten Vorhofpräparaten	34
4.3.5	Protokoll 1 – GR125487	36
4.3.6	Protokoll 2 – GR113808	39
4.3.7	Protokoll 3 – Kokain	41
4.3.8	Protokoll 4 – Reserpin	44
4.3.9	Protokoll 5 – IBMX	46
4.4	Phospholamban-Phosphorylierung	48
5.	Diskussion	50
5.1	Derzeitige Modelle zur Untersuchung von kardialen 5-HT ₄ -Rezeptoren	50
5.2	5-HT _{4a} -Rezeptor überexprimierende Mäuse	51
5.3	PLB-Phosphorylierung	54
5.4	Vergleich mit β_1 -Rezeptor überexprimierenden Mäusen	54
5.5	Arrhythmien	55
5.6	5-HT-Rezeptoren und Herzinsuffizienz	57
6.	Zusammenfassung	59
7.	Literaturverzeichnis	60
8.	Anhang	69
8.1	Puffer und Lösungen	69
8.2	Substanzen	72
8.3	Geräte und Bezugsquellen	74
8.4	Primer, PCR-Programm und Antikörper	75
9.	Thesen	76

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-toloniumphosphat
bp	Basenpaare
bpm	Schläge pro Minute
BSA	Albumin aus Rinderserum
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calciumionen
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CICR	Ca ²⁺ -induzierte Ca ²⁺ -Freisetzung
CSQ	Calsequestrin
ctr	Kontrolle
d. h.	das heißt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
evtl.	eventuell
g	Gramm
h	Stunde
IBMX	3-Isobutyl-1-methyl-xanthin
IgG	Immunglobulin der Klasse G
i.p.	intraperitoneal
Iso	Isoprenalin
Kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kDa	Kilo-Dalton
M	molar (Mol/Liter)
mA	Milliampère
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesiumionen

µg	Mikrogramm
MHC	schwere Kette des Myosins
µl	Mikroliter
min	Minute
ml	Milliliter
MLC	leichte Kette des Myosins
mm	Millimeter
mM	Millimolar (Millimol/Liter)
mmol	Millimol
mN	Millinewton
ms	Millisekunden
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
mV	Millivolt
n	Stichprobenumfang
NA	Noradrenalin
NBT	Nitrolblau-Tetrazolium
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar (Nanomol/Liter)
OD	Optische Dichte
P	Phosphor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction
pH	-log [H ⁺]
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase A
PDE	Phosphodiesterase
PLB	Phospholamban
PLC	Phospholipase C
Primer	Oligonukleotid für die Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
RyR	Ryanodin-Rezeptor (Ca ²⁺ -Freisetzungskanal)
s.	siehe
s	Sekunde

SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardabweichung des arithmetischen Mittels
SERCA	Ca-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
SL	Sarkolemma
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N', N'-Tetraethylmethyldiamin
TG	transgene Maus
Tn	Troponin
TnC	Calcium-bindendes Troponin
TnI	Troponin I (Troponin-Inhibitor)
TRD	Triadin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transport-Ribonukleinsäure
u. a.	unter anderem
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	1. Volt 2. Volumen
v. a.	vor allem
vs.	versus
WT	Wildtyp-Maus
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)

1. Einleitung

Serotonin (5-HT) wird vorwiegend in den enterochromaffinen Zellen des Gastrointestinaltrakts gebildet (Verbeuren, 1990, 1992), von diesen freigesetzt und dann von den Blutplättchen aufgenommen. Die maßgebliche Freisetzung von 5-HT erfolgt aus den Plättchen. Allerdings kann 5-HT zusätzlich durch sympathische Nervenendigungen, welche auch im menschlichen Vorhof und Ventrikel vorkommen, freigesetzt werden (Kaumann et al., 2000; Qvigstad et al., 2005a). 5-HT-Rezeptoren kommen im kardiovaskulären System, aber auch im Gastrointestinaltrakt und im Zentralnervensystem vor.

Freigesetztes 5-HT kann verschiedene kardiovaskuläre Effekte hervorrufen. Dazu gehören gesteigerte Plättchenaggregation, Vasokonstriktion oder Vasodilatation, Steigerung von Kontraktilität und Herzfrequenz, erhöhte Neigung zu Arrhythmien (Kaumann, 1994; Kaumann und Levy, 2006), Apoptose von Herzmuskelzellen, sowie Herzklappenfehler und das Karzinoidsyndrom (Robiolo et al., 1995).

Diese zum Teil pathologischen Einflüsse von Serotonin auf das Herz könnten eine bedeutende Rolle bei der Entstehung und Beeinflussung der chronischen Herzinsuffizienz sowie von Arrhythmien (Vorhofflimmern, supraventrikuläre Arrhythmien, Kammerflattern und -flimmern) spielen.

1.1 5-HT-Rezeptoren

Nach heutigem Stand werden 5-HT-Rezeptoren in sieben Gruppen (5-HT₁₋₇-Rezeptoren) eingeteilt. Diese werden jeweils in weitere Subgruppen unterteilt (Kaumann und Levy, 2006). Für zusätzliche genetische Variation sorgt bei einigen Rezeptorgruppen das alternative Spleißen. Die Signaltransduktion erfolgt bei fast allen 5-HT-Rezeptoren über G-Proteine. Lediglich die 5-HT₃-Rezeptoren fungieren als ligandengesteuerte Kationenkanäle und wirken damit ohne Signaltransduktion durch sekundäre Botenstoffe (second messenger).

5-HT₁- und 5-HT₅-Rezeptoren können an das G-Protein G_i gekoppelt werden und inhibieren so die Adenylatcyclase, welche cAMP aus ATP bildet. In Folge dessen sinkt der cAMP-Spiegel. Im Gegensatz dazu steigt der cAMP-Spiegel durch 5-HT₄-, 5-HT₆- und 5-HT₇-Rezeptoren, da die Adenylatcyclase durch G_s-Proteine aktiviert wird (Hoyer et al., 1994, 2002). 5-HT₂-Rezeptoren wiederum stimulieren die Phospholipase C (PLC) über die G-Proteine G_q oder G₁₁.

1.2 Die Regulation des menschlichen Herzzyklus

Im normalen menschlichen Herzzyklus werden im Sinusknoten durch verschiedene Ionenkanäle Aktionspotentiale generiert. Diese werden über das Reizleitungssystem (AV-Knoten, His-Bündel, rechter und linker Tawaraschenkel usw.) auf das Myokard übertragen. Durch die Depolarisation am Sarkolemm (Myozytenzellmembran) kommt es zur Öffnung von spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen und zum Einstrom von Ca^{2+} in das Zytoplasma der Muskelzelle (Bers, 2001; Benitah et al., 2010). Das freigesetzte Ca^{2+} bewirkt die Öffnung von weiteren Ca^{2+} -Freisetzungskanälen am sarkoplasmatischen Retikulum (SR), welche auch Ryanodin-Rezeptoren (RyR) genannt werden (Wagenknecht et al., 1989; Lanner et al., 2010). Dementsprechend strömt Ca^{2+} aus dem SR in das Zytoplasma der Herzmuskelzelle. Dieser Vorgang wird auch als Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung (CICR) bezeichnet (Fabiato und Fabiato, 1975). Die Konzentration des intrazellulären Ca^{2+} steigt dabei von etwa 10^{-7} M auf 10^{-5} M an. Dieser Konzentrationsanstieg bewirkt eine verstärkte Bindung von Ca^{2+} an Troponin C. Durch die darauf folgende Konformationsänderung des Troponin-Moleküls werden Bindungsplätze für die kontraktilen Filamente Aktin und Myosin freigesetzt. Diese beiden kontraktilen Filamente lösen durch Verschiebung gegeneinander eine Verkürzung der Muskelfaser und Kraftentwicklung aus. Im synzytischen Verband der Herzmuskelzellen entsteht so die Kontraktion des Herzmuskeltgewebes (Solaro et al., 1998; Gordon et al., 2000).

Neben Troponin C gehören Troponin I und Troponin T zum Troponinkomplex.

Der RyR ist Teil eines junctionalen Proteinkomplexes im SR, der zudem aus Triadin, Junctin und Calsequestrin besteht. Calsequestrin wird mittels der transmembranären Proteine Junctin und Triadin am RyR verankert (Kirchhefer et al., 2002).

Die Relaxation des Herzmuskels wird durch sinkende zytosolische Ca^{2+} -Konzentrationen getriggert. Die Kalziumionen dissoziieren von Troponin C ab, wodurch die Interaktion zwischen Aktin und Myosin aufgehoben wird. Unter ATP-Verbrauch wird Ca^{2+} entgegen dem Konzentrationsgradienten, durch die am freien SR membranständige Ca^{2+} -ATP-ase (SERCA), in das SR transportiert (MacLennan, 2001; Toyoshima et al., 2007).

Die Relaxationszeit wird durch β -adrenerge Stimulation verkürzt (positiv lusitroper Effekt). Die Bindung von β -Rezeptor-Agonisten am β_1 -Rezeptor bewirkt über stimulierende G_s -Proteine eine Aktivitätssteigerung der Adenylatcyclase.

Folglich wird die Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) gesteigert, welche verschiedene Proteine phosphoryliert. Dazu gehört Phospholamban (PLB), ein Ca^{2+} -regulierendes Protein der SERCA. PLB wird durch die PKA am Serin 16 und durch eine Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II am Threonin 17 phosphoryliert (Übersicht bei Simmermann und Jones, 1998). Durch die Phosphorylierung verliert PLB seinen hemmenden Einfluss auf die SERCA und die Affinität der SERCA zum zytosolischen Ca^{2+} erhöht sich. Es kommt zu einem gesteigerten Transport von zytosolischen Ca^{2+} in das SR. Dort erfolgt die Bindung an Calsequestrin. Auf diese Weise kann bei der nächsten Kontraktion mehr Ca^{2+} aus dem SR freigesetzt werden, was eine Steigerung der Kontraktionskraft bewirkt (positiv inotroper Effekt durch β -adrenerge Stimulation). Entsprechend hemmt dephosphoryliertes PLB die SERCA, so dass der Transport von Ca^{2+} in das SR herabgesetzt ist (Tada et al., 1974).

Außerdem werden weitere regulierende Proteine durch Phosphorylierung in ihrer Aktivität beeinflusst. Im phosphorylierten Zustand hemmt beispielsweise der Troponin-Inhibitor (Tni) das Ca^{2+} -bindende Troponin C (Solaro et al., 1981), wobei die Affinität des Troponin C zu Ca^{2+} herabgesetzt wird. Folglich führt die Phosphorylierung dieses Proteins zu einer Desensitivierung der Myofilamente gegenüber Ca^{2+} und damit zu einer gesteigerten Erschlaffung der Myofibrillen. Im Gegensatz dazu führt die Phosphorylierung der MLC-2 zur Sensitivierung der Myofilamente gegenüber Ca^{2+} (Morano et al., 1988).

1.3 Beeinflussung des menschlichen Herzzyklus durch 5-HT₄-Rezeptoren

Im menschlichen Vorhof und Ventrikel wurden verschiedene Spleißvarianten (5HT_{4a}, 5HT_{4b} bis 5HT_{4i}) des 5HT₄-Rezeptors gefunden (Blondel et al., 1997, 1998; Bach et al., 2001; Brattelid et al., 2004a, b; Gergs et al., 2009), welche sich bis Leucin 358 gleichen und dann mit unterschiedlichen C-Termini enden (Kaumann und Levy, 2006). Nachdem man längere Zeit von einem fehlendem positiv inotropen Effekt von 5-HT auf menschliches Ventrikelmyokard ausging (Jahnel et al., 1992), konnte vor einigen Jahren 5-HT-Rezeptor-mRNA im menschlichen Ventrikel nachgewiesen werden (Bach et al., 2001; Brattelid et al., 2004). Mittels der RT-PCR fand man die mRNA von 5-HT_{4a}-, 5-HT_{4b}- und 5-HT_{4c}- Rezeptoren im menschlichen Ventrikel (Gergs et al., 2009).

Wie schon erwähnt (1.1), ist der 5-HT₄-Rezeptor positiv über G_s-Proteine an die Aktivität der Adenylatcyclase gekoppelt und steigert so die Konzentration von cAMP. Dies bewirkt eine cAMP-abhängige Aktivitätssteigerung der PKA und der damit

verbundenen Phosphorylierung von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen im Sarkolemm der Herzmuskelzellen, wobei die Öffnungswahrscheinlichkeit dieser Kanäle steigt. Durch den damit verbundenen zunehmenden Einstrom von Ca^{2+} in die Myozyten kommt es zu einer Steigerung der Kontraktionskraft (positiv inotroper Effekt) (Kaumann et al., 1991; Sanders und Kaumann, 1992; Pau et al., 2003). Hierbei wird die Ähnlichkeit der 5-HT-Stimulation zur β -adrenergen Stimulation des Herzens sehr deutlich. In Abbildung 1 sind die Zusammenhänge schematisch dargestellt.

Einen zusätzlichen Effekt der gesteigerten PKA-Aktivität stellt die Verkürzung der Relaxationszeit (positiv lusitroper Effekt) durch eine schnellere Senkung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration dar.

Es wird angenommen, dass durch 5-HT über cAMP-Bildung bestimmte durch Hyperpolarisation aktivierbare Kationen-Kanäle (Na^+ , K^+) direkt aktiviert werden. Dabei wird das benötigte halbmaximale Aktivierungs-Potential dieser Kanäle ($V_{1/2}$) positiviert, um sich dem physiologisch vorherrschenden Potential menschlicher Vorhof-Myozyten anzunähern (Pino et al., 1998). Auf diese Weise wird die Amplitude des Schrittmacher-Einstroms I_f gesteigert. Die Amplitudenerhöhung von I_f in menschlichen Vorhofzellen konnte mit spezifischen 5-HT₄-Rezeptor-Antagonisten blockiert werden (Pino et al., 1998). Somit liegt die Vermutung nahe, dass dieser Effekt ebenfalls durch 5-HT₄ Rezeptoren vermittelt sein könnte. Dieser erhöhte Schrittmacher-Einstrom kann die durch 5-HT₄-Rezeptoren vermittelten positiv chronotropen Effekte erklären. Zusammen mit dem I_f könnte der erhöhte Ca^{2+} -Einstrom durch L-Typ Ca^{2+} -Kanäle atriale Arrhythmien auslösen (Kaumann, 1994; Kaumann und Sanders, 1994; Pau et al., 2003).

Der positiv inotrope Effekt von 5-HT in den verschiedenen Spezies wird durch unterschiedliche 5-HT-Rezeptoren vermittelt. Zum Beispiel bedingt 5-HT über 5-HT_{2a}-Rezeptoren den positiv inotropen Effekt am isolierten linken Vorhof der Ratte (Läer et al., 1998) und über 5-HT₃-Rezeptoren jenen am linken Vorhof des Meerschwein (Tramontana et al., 1993). Der positiv inotrope Effekt am isolierten linken Vorhof des Menschen jedoch wird durch 5-HT₄-Rezeptoren vermittelt (Du et al., 1994; Kaumann et al., 1990).

Untersuchungen mittels PCR weisen darauf hin, dass unterschiedliche 5-HT-Rezeptoren im gleichen Gewebe exprimiert werden. In den Herzen von Ratten wurde neben der mRNA von 5-HT_{2a}-Rezeptoren auch die von 5-HT₄-Rezeptoren gefunden. In gesunden Herzen der Ratte wird der positiv inotrope Effekt von 5-HT durch 5-HT_{2a}-Rezeptoren vermittelt (Läer et al., 1998). Jedoch wurden erhöhte Mengen von 5-HT₄-

Rezeptor-mRNA gefunden, nachdem in Ratten durch Ligation einer Koronararterie eine Herzinsuffizienz induziert worden war. Dies lässt die Vermutung aufkommen, dass Pathologien des Herzens die Expression von 5-HT-Rezeptoren beeinflussen können. Durch Versuche mit spezifischen Antagonisten konnte, bei unter Herzinsuffizienz leidenden Tieren, eine 5-HT₄-Rezeptor vermittelte positiv inotrope Wirkung am Ventrikel festgestellt werden. Dieser Effekt wurde durch Phosphodiesterasen reguliert und durch Hemmung dieser verstärkt (Qvigstad et al., 2005a; Afzal et al., 2008).

Bis vor einiger Zeit konnte eine positiv inotrope und lusitrope Wirkung von 5-HT nur auf atrialer Ebene beim Menschen dargestellt werden. Brattelid et al. (2004) zeigten erstmals auch eine positiv inotrope Wirkung von 5-HT am humanen Ventrikelmyokard, welche jedoch nur unter dem nichtselektiven Phosphodiesterasehemmer IBMX nachweisbar war.

Phosphodiesterasen hydrolysieren die second messenger cAMP und cGMP zu AMP und GMP und hemmen damit deren Effekte auf das Myokard. Neuere Ergebnisse zeigen, dass der positiv inotrope Effekt von 5-HT cAMP vermittelt ist und durch Phosphodiesterasen (PDE), hauptsächlich durch die PDE 3 und zusätzlich durch die PDE 4, reguliert wird (Afzal et al., 2008). Durch Experimente mit spezifischen Phosphodiesterasehemmern konnte gezeigt werden, dass die PDE 3 im menschlichen Ventrikelmyokard für ein Abfallen der 5-HT-induzierten Inotropie verantwortlich ist (Galindo-Tovar et al., 2009).

Im Myokard von Mäusen wurden bisher keine funktionellen 5-HT₄-Rezeptoren nachgewiesen. Jedoch konnten jeweils 5-HT₄-Rezeptor-mRNA mittels RT-PCR und 5-HT₄-Rezeptoren mittels Immunhistochemie im Myokard von Mausembryonen nachgewiesen werden, welche wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung spielen. Diese Rezeptoren und die dazugehörige mRNA waren jedoch bereits am ersten Tag *post partum* nicht mehr nachweisbar (Kamel et al., 2007).

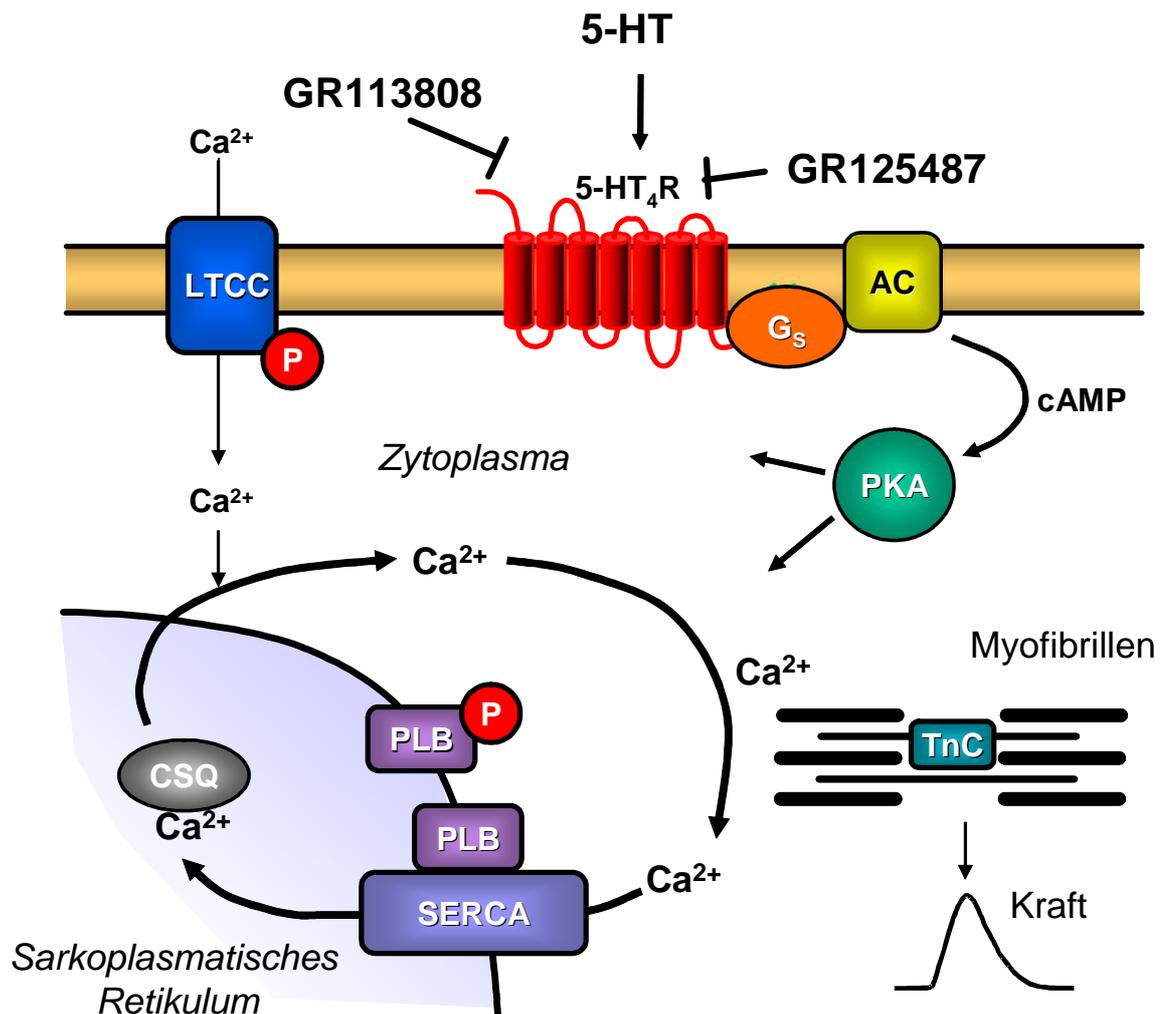


Abb. 1: Beeinflussung des menschlichen Herzzyklus durch Bindung von 5-HT an 5-HT₄-Rezeptoren

Die Bindung von 5-HT an 5-HT₄-Rezeptoren bewirkt durch das stimulierende Protein G_s eine Aktivitätssteigerung der Adenylatcyclase (AC) und damit die vermehrte Bildung von cAMP. Die Konzentrationssteigerung von cAMP führt zur Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA), welche als regulatorisches Enzym in den Herzzyklus eingreift. Die PKA phosphoryliert u.a. L-Typ Ca-Kanäle (LTCC) und erhöht so deren Öffnungswahrscheinlichkeit, wodurch vermehrt Ca²⁺ in den Intrazellulärraum einströmt und damit die Kontraktionskraft zunimmt (positiv inotroper Effekt). Weiterhin wird das regulatorische Protein Phospholamban (PLB) phosphoryliert, welches in diesem Zustand seinen hemmenden Einfluss auf die SERCA verliert. Dadurch kann verstärkt Ca²⁺ durch die SERCA (sarkoendoplasmatisches Retikulum Ca²⁺ATP-ase) in das SR gepumpt werden (beschleunigte Relaxation) und es steht mehr Ca²⁺ für die nächste Kontraktion zur Verfügung (positiv inotroper Effekt).

2. Zielstellung

Serotonin (5-HT) kann arrhythmogen, sowie positiv inotrop, positiv chronotrop, positiv lusitrop und positiv bathmotrop wirken. Diese Effekte werden vor allem über 5-HT₄-Rezeptoren im menschlichen Vorhof und Ventrikel erreicht.

Aufgrund ähnlicher Rezeptorverhältnisse, verglichen mit menschlichem Herzgewebe, wurde bisher häufig das Schwein als Versuchsmodell herangezogen.

Zum besseren Verständnis der Funktion von 5-HT am menschlichen Herz wurde der humane 5-HT_{4a}-Rezeptor spezifisch im Herzgewebe der Maus überexprimiert. 5-HT zeigt am Herz einer Wildtyp-Maus keinerlei Wirkung (siehe Abb. 4.3 und 4.4).

Ein neues Modell zur Untersuchung von humanen 5-HT_{4a}-Rezeptoren soll in dieser Arbeit näher charakterisiert werden.

Es ist das Ziel dieser Arbeit, ein besseres Verständnis über die möglichen Wirkungen von 5-HT auf das Säugetier-Herz zu erlangen und die Effekte von antagonistischen Substanzen (GR125487, GR113808) darzustellen. Um die Unterschiede zu erarbeiten, wurden immer Wildtyp-Versuchstiere parallel zu 5-HT_{4a}-Rezeptor überexprimierenden Tieren untersucht.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit sollen dazu beitragen, den Einfluss von 5-HT auf kardiale Erkrankungen wie der chronischen Herzinsuffizienz oder Arrhythmien besser zu verstehen. Dies könnte auch zur Entwicklung neuer Therapieansätze beitragen.

3. Material und Methoden

3.1 5-HT_{4a}-Rezeptor überexprimierende Mäuse

Für die Experimente wurde eine transgene Mauslinie verwendet. Dazu wurde die α -MHC-5-HT_{4a}-Expressionskassette in befruchtete Eizellen der Mauslinie FVB/N (siehe Abb. 2) injiziert. Die entstandenen 5-HT_{4a}-Rezeptor-transgenen Tiere wurden in einen CD1-Hintergrund eingekreuzt und zeigten eine herzspezifische Überexpression dieses Rezeptors. Diese stand unter Kontrolle des Promotors der α -Isoform der schweren Kette des Myosins (α -MHC) (Gergs et al., 2010). Die Vererbung erfolgt nach Mendel heterozygot.

Jeweils gleichaltrige Wildtyp-Geschwistertiere dienten als Kontrollen. Die Mäuse wogen zwischen 25 g und 35 g und wurden mit handelsüblichem Labortierfutter und Leitungswasser *ad libitum* versorgt. Beide Geschlechter waren etwa gleich häufig vertreten.

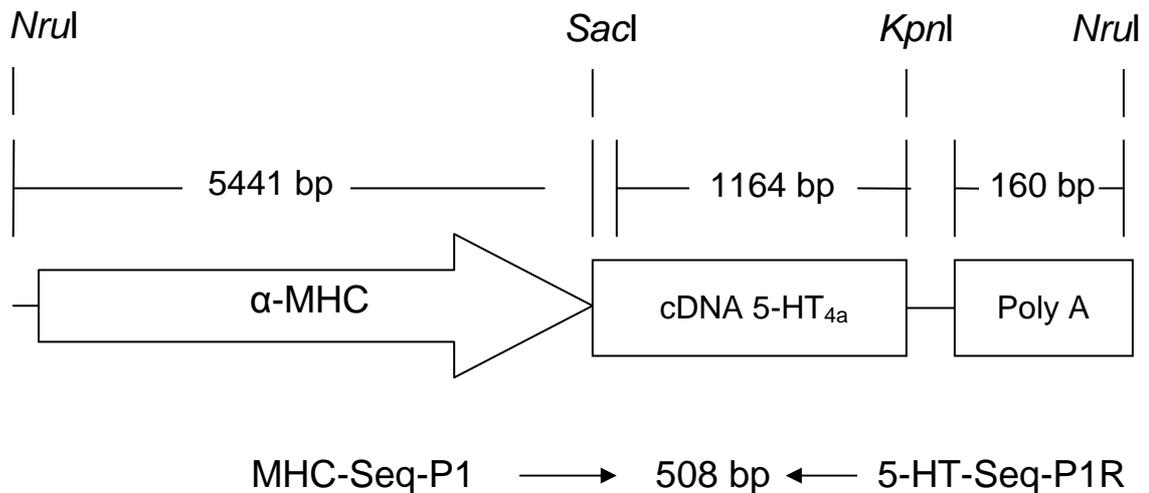


Abb. 2: Schematische Darstellung der α -MHC-5-HT_{4a}-Rezeptor-Expressionskassette

Zur Generierung transgener Mäuse mit einer herzspezifischen Überexpression von humanen 5-HT_{4a}-Rezeptoren wurde die α -MHC-Expressionskassette in befruchtete Eizellen von Mäusen injiziert. Die kodierende Sequenz des humanen Rezeptors wurde zuvor mit Hilfe der Restriktionsendonucleasen *KpnI* und *SacI* geschnitten und in die Expressionskassette eingefügt. Die Transkription der Sequenz stand unter der gewebespezifischen Kontrolle des α -MHC-Promotors der Maus. Das Transgen konnte mittels spezifischer Primer (MHC-Seq-P1: *forward primer*, 5-HT-Seq-P1R: *reverse primer*) in der genomischen DNA der Maus nachgewiesen werden. Das erwartete PCR-Produkt hatte eine Größe von 508 bp.

3.2 Behördliche Genehmigungen und Sicherheitsbestimmungen

Alle notwendigen behördlichen Genehmigungen zur Durchführung der Organentnahme und Tierversuchen lagen vor (Aktenzeichen: 42502-02-691 MLU und 42502-5.14 MLU). Genetische Arbeiten erfolgten gemäß Gentechnikgesetz (GenTG vom 16. Dezember 1993) zur Regelung der Gentechnik unter Beachtung der in § 7 Abs. 1 GenTG formulierten Sicherheitsstufen und -maßnahmen. Die Genehmigung sowie die Anmeldung der Arbeiten mit Gentechnik erfolgte gemäß § 8, § 9, § 11 und § 12 GenTG.

3.3 Genotypisierung der Mäuse

3.3.1 Isolation der DNA

Jeder Maus wurde im Alter von vier Wochen ein etwa 0,5 cm langes Schwanzstück entnommen. Zur sicheren Zuordnung erhielten sie eine Ohrmarkierung. Das Gewebe wurde unter Zugabe von 700 μ l TE- / SDS-Puffer und 30 μ l Proteinase K bei 56 °C ca. zwölf Stunden schüttelnd proteolytisch aufbereitet.

Um die genomische DNA aus dem Lysat zu gewinnen, wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion vorgenommen (Sambrook et al., 1989). Durch diese Vorgehensweise wird erreicht, dass sich die Proteine und Nukleinsäuren durch Phenol und Chloroform trennen lassen, wobei jeweils eine obere wässrige und eine untere organische Phase entstehen. Proteine und andere Verunreinigungen reichern sich in der organischen Phase bzw. der Interphase an.

Nach abgeschlossener enzymatischer Zersetzung des Schwanzstückes mittels Proteinase K wurde das Homogenat mit 700 μ l puffergesättigtem Phenol versetzt und gut vermischt. Durch fünfminütige Zentrifugation bei 14000 rpm entstanden zwei Phasen, deren obere wässrige Phase unter Aussparung der Interphase vorsichtig abgenommen wurde. Anschließend wurden jeweils 350 μ l Phenol und 350 μ l Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (24:1) hinzu gegeben, gemischt, und erneut fünf Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Zu der abgenommenen oberen Phase wurden 70 μ l Natriumacetat (ph=6) und 700 μ l abs. Ethanol gegeben, um die DNA zu fällen und Phenolreste zu beseitigen. Durch zehnmünütige Zentrifugation bei 14000 rpm wurde die DNA sedimentiert. Nach Verwerfung des Überstandes wurde das DNA-Sediment mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und für weitere zehn Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Sediment sorgfältig vom Überstand befreit, bei Raumtemperatur getrocknet, in 50 μ l TE-Puffer aufgenommen, und abschließend für 15 min bei 65 °C inkubiert. Bis zur Weiterverwendung wurden die Proben bei 4 °C gelagert.

3.3.2 Konzentrationsbestimmung der DNA

Die DNA-Konzentration wurde mittels Photometer durch Messung der Extinktion bei 260 nm (E_{260}) bestimmt. Die optische Dichte (OD) mit dem Wert 1,0, bei einer Schichtdicke von 1 cm, entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von

50 µg/ml. Nach der Formel $E_{260} \times 50 \text{ µg/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor} = X \text{ µg/ml}$ kann man den DNA-Gehalt berechnen.

Außerdem wurde die optische Dichte bei 280 nm gemessen. Der Quotient (Warburg-Quotient) aus der OD bei 260 nm und der OD bei 280 nm verweist auf den Reinheitsgrad des DNA-Produktes.

3.3.3 PCR und Agarosegelelektrophorese

Der Reaktionsansatz pro Probe enthielt 1x PCR-Puffer mit 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP-Mix, jeweils 1 µM *forward*- und *reverse*-Primer und 2,5 U Taq DNA-Polymerase (siehe Anhang). Dieser wurde mit DEPC-Wasser auf 50 µl Gesamtmenge aufgefüllt. Die PCR wurde in einem Eppendorf PCR-Gerät durchgeführt. Das PCR-Produkt hatte eine Größe von 508 bp.

Die Auftrennung des PCR-Produktes erfolgte im Agarosegel (1%), wobei die Proben zuvor mit jeweils 8 µl Ladepuffer versehen wurden. Das Gel lief bei 80 mV etwa 45 Minuten und das Ergebnis der Genotypisierung konnte anhand einer Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht beurteilt werden. (siehe Abb. 3, Zusammensetzung des Puffers: siehe Anhang).

3.4 Invasive hämodynamische Messungen

Die invasive hämodynamische Messung der linksventrikulären Funktion ermöglicht *in vivo* die Erfassung physiologischer Parameter wie Herzfrequenz, systolischen, diastolischen und mittleren linksventrikulären Druck (LVD), sowie daraus abgeleitete Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten (dp/dt_{\max} bzw. dp/dt_{\min}).

3.4.1 Anästhesie der Tiere

Im Vorfeld der Anästhesie war ein Nüchternzustand der Maus nicht erforderlich. Aufgrund hoher Stoffwechselraten und niedriger Glycogenspeicher ist dieser sogar nachteilig (Rao und Verkmann, 2000).

Die Anästhesie erfolgte mit 15 µl/g Körpergewicht Tribromethanol (Sigma Steinheim, BRD) intraperitoneal.

Zur Herstellung der Tribromethanol-Lösung wurden 2 g Tribromethanol in 2,5 ml t-Amylalkohol (Sigma) bei 30°C gelöst und mit auf 60°C erwärmtem, bidestilliertem Wasser auf 80 ml aufgefüllt. Anschließend wurde der enthaltene t-Amylalkohol bei 60°C unter zentrifugieren verdunstet und die Lösung erneut mit DEPC-Wasser auf 80 ml aufgefüllt.

3.4.2 Präparation

Das weitere Vorgehen erfolgte auf einer temperierten (37°C) Wärmeplatte. Nachdem die vollständige Narkose der Maus durch fehlende Reaktion auf Schmerzreize festgestellt worden war, wurde das Tier auf den Rücken gelegt und mit leicht überstreckten Kopf an allen vier Extremitäten fixiert. Das Fell wurde an der ventralen Halsseite und im oberen Thoraxbereich entfernt und zunächst die *Arteria carotis communis dextra* freigelegt. Anschließend wurden drei Ligaturen mit chirurgischem Nahtmaterial angelegt, wobei die kraniale vollständig und die kaudale unvollständig abgebunden wurde. Die mittlere Ligatur blieb vorerst offen. Durch einen Längsschnitt zwischen kranialer und mittlerer Ligatur wurde die Arterie eröffnet und ein Katheter zur Druckmessung in das Gefäß eingeführt (Gergs et al., 2010). Dieser wurde durch die mittlere Ligatur fixiert. Anschließend wurde die kaudale Ligatur gelockert, der Katheter vorgeschoben und durch erneutes Schließen der kaudalen Ligatur fixiert.

Unter Kontrolle der Messwerte wurde der Katheter vorsichtig über den *Truncus brachiocephalicus* in die *Aorta ascendens* geschoben. Dort wurde zunächst der systemische Blutdruck gemessen. Anschließend wurde der Katheter über den *Bulbus aortae* in die linke Herzkammer geschoben, wo er bis zum Ende des Versuchs verweilte.

3.4.3 Datenerfassung

Die Messwerte wurden mit dem PowerLab-System (AdInstruments) und der Software Chart 5 erfasst. Der Katheter war mit einem flüssigkeitsgefüllten Drucksensor verbunden, welcher Druckänderungen über einen Verstärker zum analog/digital-Umwandler mit einer Frequenz von 1 kHz weiterleitete. Die Daten konnten mit der Chart-Software aufgezeichnet und ausgewertet werden. Die Frequenz, Kontraktions- und Erschlaffungsgeschwindigkeit, sowie mittlerer, systolischer und diastolischer linksventrikulärer Druck wurden aufgezeichnet.

Der Katheter wurde mit heparinierter physiologischer Kochsalzlösung gefüllt (150 IE Heparin/ml 0,9 % NaCl-Lösung). Sein äußerer Durchmesser betrug 0,61 mm und sein Innendurchmesser 0,28 mm.

3.4.4 Stimulation mit 5-HT

Nach Erfassung der Basalparameter in Aorta und linkem Ventrikel, wurde ein zweiter Katheter zur Infusion von 1 ml Serotonin-Lösung (0,1 mM) gelegt. Dazu wurde die *Vena jugularis sinistra* freigelegt und der Katheter nach Fixierung im Gefäß in die *Vena subclavia sinistra* geschoben. Hier wurde das Serotonin mit einer Kolbenspritzenpumpe durch den Katheter langsam injiziert.

Zur Erfassung der Messwerte wurde etwa 30 s nach Ende der Injektion ein Zeitraum von 5 s gewählt, dessen Daten als Mittelwert zusammengefasst wurden.

3.5 Kontraktionskraft- und Frequenzmessungen an isolierten Herzvorhöfen

Die Kontraktionskraftmessungen wurden an elektrisch gereizten linken Vorhöfen sowie an spontan schlagenden rechten Vorhöfen von 5-HT_{4a}-Rezeptor überexprimierenden Tieren und WT-Tieren durchgeführt (Gergs et al., 2008). Die Ergebnisse wurden computergestützt mittels nichtlinearer Regression ausgewertet (Prism4; GraphPad Software, San Diego, USA).

3.5.1 Herstellung der Badlösung

Vor jedem Versuch wurde das Organbad neu hergestellt, indem 4 % Stamm I-, 3,8 % Stamm II- und 2 % Stamm III-Lösung mit Aqua bidest. aufgefüllt wurden (siehe 8.1). Nach etwa 30 Minuten Begasung mit Carbogen (95% O₂ und 5% CO₂) wurden 0,08 % Kalziumchlorid-Lösung (33,2 g CaCl₂/100 ml H₂O), 0,28 mM Ascorbinsäure und 0,05 mM Natrium-EDTA hinzugefügt. Während des gesamten Versuchs wurde die Lösung mit Carbogen begast und konstant auf 37 °C temperiert. Die Endkonzentration von CaCl₂ betrug 1,8 mM (Gergs et al., 2009).

3.5.2 Messanlage und Kalibrierung

Die Messanlage bestand aus vier beheizbaren Organbädern mit einem Volumen von 10 ml, in denen die Vorhöfe vertikal an zwei starren Metalldrähten in der Tyrode-Lösung aufgehängt werden konnten. Am oberen Metalldraht befand sich ein Kraftmesser, welcher die Kontraktionskraft über einen Verstärker auf einen Schreiber weiterleitete. Die Geschwindigkeit des Schreibers war einstellbar.

In jedem Glasgefäß befanden sich zwei Reizelektroden, zwischen denen die Vorhöfe platziert wurden. Die linken Vorhöfe wurden mit 1 Hz und einer Pulsdauer von 5 ms elektrisch stimuliert. Die Spannung lag etwa 20 % über der Reizschwelle. Die rechten Vorhöfe mussten nicht gereizt werden und schlugen mit Sinusknotenfrequenz.

Zu Beginn wurde der Nullpunkt des Schreibers festgelegt. Ein 500 mg schwerer Drahring wurde zur Korrelation der wirkenden Zugkraft von 500 mg auf den Kraftmesser zum Ausschlag des Schreibers verwendet. Dabei wurde auf verschiedene Empfindlichkeiten des Kraftmessers kalibriert.

Die Kalibrierung auf diesen Drahring ermöglichte die Einstellung der Zugspannung auf die Vorhöfe und die Kontrolle dieser anhand des Schreiberausschlages.

3.5.3 Präparation der Vorhöfe

Etwa eine halbe Stunde vor Versuchsbeginn wurden jeder Maus 500 IE Heparin i.p. (Biochrom AG) gespritzt.

Die Tiere wurden mit 5 µl/g Körpergewicht Urethan i.p. betäubt. Die beginnende Narkose zeigte sich mit der Abschwächung des Stellreflexes. Erst mit dem Ausbleiben des Zehenreflexes wurde mit der Präparation begonnen. Zu Beginn erfolgte die Eröffnung von Teilen des Abdomens und des gesamten Thorax. Es erfolgte rechts und links lateral des Sternums ein Schnitt durch die Rippenbögen, um das Sternum nach cranial zu klappen und Herz mit Mediastinum freizulegen. Anschließend wurde das Herz mit Teilen der Lungenlappen großzügig herausgeschnitten und sofort in kalter Badlösung (siehe 3.4.1) gelagert, um mit der Präparation beginnen zu können.

Nach vorsichtigem Entfernen der anhaftenden Lungenteile und des Binde-, und Fettgewebes wurden nacheinander linker und rechter Vorhof präpariert. Besondere Aufmerksamkeit musste auf die Schonung des Sinusknotens im rechten Vorhof gerichtet werden. Während der gesamten Präparation sollten Herzkontraktionen sichtbar sein, was bei allen Versuchsherzen gelang. Beide Vorhöfe wurden mit kleinen Metallhaken an Drahtstangen vertikal aufgehängt und anhand der Kalibrierung unter

Zugspannung gesetzt. Meist erfolgte nach einigen Minuten eine Nachspannung. Das Organbad wurde während des gesamten Versuchs auf 37°C temperiert und kontinuierlich mit Carbogen begast.

Nach etwa 30 Minuten Adaptationszeit und dreimaligem Spülen der Vorhöfe mit frischer Tyrode-Lösung begannen die Versuche entsprechend der Protokolle (siehe 3.4.8) mit Konzentrations-Wirkungs-Kurven (KWK) für Serotonin.

3.5.4 Serotonin und 5-HT-Antagonisten

Das biogene Amin Serotonin (5-Hydroxytryptamin) wurde im bidestillierten Wasser gelöst.

GR125487 (1-[2-[(Methylsulfonyl) amino] ethyl] -4-piperdiny]methyl-5-fluoro-2-methoxy-1H-indol-3-carboxylat) ist ein inverser Agonist und GR113808 ([1-[2-Methylsulfonyl)amino]ethyl]-4-pipernidyl]methyl 1-methyl-1H-indol-3-carboxylat) ein selektiver Antagonisten an 5-HT₄-Rezeptoren. Beide Substanzen wurden in DMSO (9%) gelöst. DMSO (Verdünnung 1:1000) selbst zeigte keinen Effekt auf die Vorhöfe.

3.5.5 Kokain

Kokain wirkt als indirektes Sympathomimetikum, indem es die Noradrenalinpumpe an der präsynaptischen Membran von Neuronen hemmt (Schwartz et al., 2010). Es erhöht damit die Katecholaminkonzentration an den Rezeptoren und bewirkt durch ZNS-Stimulation einen Rausch, Euphorie und Wohlbefinden, aber auch Tremor, Krämpfe und Bewusstseinsstörungen. Am kardiovaskulären System kann es zu Blutdrucksteigerung, Tachykardien und Herzrhythmusstörungen kommen. Durch Vasokonstriktion kann eine Angina-Pectoris-Symptomatik bis zum akuten Koronarsyndrom auftreten (Lange et al., 2001).

3.5.6 Reserpin

Reserpin ist ein schwach basisches, stark lipophiles Alkaloid, welches eine hohe Affinität zu Transportproteinen (Carrier) an der Membran noradrenerger Nervenendigungen hat (Mandela et al., 2010). Es kommt zur Wiederaufnahmehemmung von Noradrenalin und Dopamin. Die sich infolgedessen im

synaptischen Spalt befindenden Katecholamine werden durch die Monoaminoxidase-A desaminiert und damit inaktiviert. Zudem wird weniger Dopamin, welches zur Synthese von Noradrenalin benötigt wird, in die Speichergranula aufgenommen. Damit führt Reserpin zu einer Inaktivierung des Sympathikus mit einhergehender Blutdrucksenkung, Bradykardie, Diarrhoe und Neigung zu Depressionen. Die Substanz wurde in 0,9% NaCl-Lösung gelöst und den Tieren 16 Stunden vor Versuchbeginn intraperitoneal gespritzt.

3.5.7 IBMX

IBMX (3-Isobutyl-1-methyl-xanthin) ist ein nicht selektiver Phosphodiesterasehemmer (PDE-Hemmer). Phosphodiesterasen hydrolysieren cAMP und cGMP, wobei deren Effekte gehemmt werden. PDE-Hemmer verlängern damit die Halbwertszeit von cAMP und cGMP und wirken unter anderem positiv inotrop und vasodilatierend (Bender und Beavo, 2006). Die Substanz wurde in DMSO (9%) gelöst.

3.5.8 Messprotokolle

Im Folgenden werden Reihenfolge und Konzentration der Substanzen aufgeführt, welche in die Organbäder der Herzvorhöfe gegeben worden sind.

Tab. 1: Protokoll 1

Reihenfolge und Konzentrationen der für die Kontraktionskraftexperimente an Vorhöfen eingesetzten Substanzen. Zu Beginn wurde eine 5-HT-Konzentrations-Wirkungskurve (KWK) erhoben. Nach Ausspülen von 5-HT, folgten die Inkubation mit GR125487 (10 nM) über 30 min und eine weitere 5-HT-KWK. Nach gründlichem Ausspülen wurde abschließend eine Isoprenalin-KWK etabliert.

Substanz	Konzentrationen
Serotonin-KWK	1 nM, 3 nM, 0,01 µM, 0,03 µM, 0,1 µM bis 10 µM
Spülen (3x)	
GR125487	10 nM, 30 min Einwirkzeit
Serotonin-KWK	1 nM, 3 nM, 0,01 µM, 0,03 µM, 0,1 µM bis 10 µM
Spülen (3x)	
Isoprenalin-KWK	1 nM, 3 nM, 0,01 µM, 0,03 µM, 0,1 µM bis 10 µM

Tab. 2: Protokoll 2

Reihenfolge und Konzentrationen der für die Kontraktionskraftexperimente an Vorhöfen eingesetzten Substanzen. Zu Beginn wurde eine 5-HT-Konzentrations-Wirkungskurve (KWK) erhoben. Nach Ausspülen von 5-HT, folgten die Inkubation mit dem 5-HT₄-Rezeptor-Antagonist GR113808 (10 nM) über 30 min und eine weitere 5-HT-KWK. Nach gründlichem Ausspülen wurde abschließend eine Isoprenalin-KWK etabliert.

Substanz	Konzentrationen
Serotonin-KWK	1 nM, 3 nM, 0,01 µM, 0,03 µM, 0,1 µM bis 10 µM
Spülen (3x)	
GR113808	10 nM, 30 min Einwirkzeit
Serotonin-KWK	1 nM, 3 nM, 0,01 µM, 0,03 µM, 0,1 µM bis 10 µM
Spülen (3x)	
Isoprenalin-KWK	1 nM, 3 nM, 0,01 µM, 0,03 µM, 0,1 µM bis 10 µM

Tab. 3: Protokoll 3

Reihenfolge und Konzentrationen der für die Kontraktionskraftexperimente an Vorhöfen eingesetzten Substanzen. Zu Beginn wurde eine 5-HT-Konzentrations-Wirkungskurve (KWK) erhoben. Nach Ausspülen von 5-HT, folgten die Inkubation mit Kokain (30 µM) über 30 min und eine weitere 5-HT-KWK. Nach gründlichem Ausspülen wurde abschließend eine Isoprenalin-KWK etabliert.

Substanz	Konzentrationen
Serotonin-KWK	1 nM, 3 nM, 0,01 µM, 0,03 µM, 0,1 µM bis 10 µM
Spülen (3x)	
Kokain	30 µM, 30 min Einwirkzeit
Serotonin-KWK	1 nM, 3 nM, 0,01 µM, 0,03 µM, 0,1 µM bis 10 µM
Spülen (3x)	
Isoprenalin-KWK	1 nM, 3 nM, 0,01 µM, 0,03 µM, 0,1 µM bis 10 µM

Tab. 4: Protokoll 4

Reihenfolge und Konzentrationen der für die Kontraktionskraftexperimente an Vorhöfen eingesetzten Substanzen. Zu Beginn wurde die ausreichende Reserpinisierung der Versuchstiere mit 10 μM Tyramin getestet. Es folgte eine 5-HT-Konzentrations-Wirkungskurve (KWK). Nach gründlichem Ausspülen wurde abschließend eine Isoprenalin-KWK erhoben.

Substanz	Konzentrationen
Tyramin	10 μM , 10 min Einwirkzeit
Spülen (3x)	
Serotonin-KWK	1 nM, 3 nM, 0,01 μM , 0,03 μM , 0,1 μM bis 10 μM
Spülen (3x)	
Isoprenalin-KWK	1 nM, 3 nM, 0,01 μM , 0,03 μM , 0,1 μM bis 10 μM

Den Versuchstieren wurde 16 Stunden vor Versuchsbeginn 0,5 mg/kg Körpergewicht Reserpin i.p. (O'Laery et al., 2007) gespritzt. Die ausreichende Reserpinisierung wurde mit Tyramin (indirektes Sympathomimetikum) getestet. Bei Ausbleibender Wirkung von Tyramin auf die Vorhöfe, konnte von einer adäquaten Reserpinisierung ausgegangen werden, da Reserpin die Speichergranula bereits geleert hatte.

Tab. 5: Protokoll 5

Reihenfolge und Konzentrationen der für die Kontraktionskraftexperimente an Vorhöfen eingesetzten Substanzen. Zu Beginn wurde eine 5-HT-Konzentrations-Wirkungskurve (KWK) erhoben. Nach Ausspülen von 5-HT, folgten die Inkubation mit dem nichtselektiven Phosphodiesterasehemmer IBMX (30 μM) über 5 min und eine weitere 5-HT-KWK. Nach gründlichem Ausspülen wurde abschließend eine Isoprenalin-KWK etabliert.

Substanz	Konzentrationen
Serotonin-KWK	1 nM, 3 nM, 0,01 μM , 0,03 μM , 0,1 μM bis 10 μM
Spülen (3x)	
IBMX	3 μM , 5 min Einwirkzeit
Serotonin-KWK	1 nM, 3 nM, 0,01 μM , 0,03 μM , 0,1 μM bis 10 μM
Spülen (3x)	
Isoprenalin-KWK	1 nM, 3 nM, 0,01 μM , 0,03 μM , 0,1 μM bis 10 μM

Jeder Versuch begann mit einer Konzentrations-Wirkungskurve von Serotonin. Die folgenden Schritte variierten jeweils in den fünf verschiedenen Protokollen. Somit konnten alle Konzentrations-Wirkungskurven von Serotonin, die zu Versuchsbeginn stattfanden, zusammengefasst werden.

Die Protokolle wurden gleichermaßen an rechten und linken Vorhöfen transgener Tiere sowie Wildtyp-Vorhöfen durchgeführt.

Die Konzentration von IBMX ergab sich aus Vorexperimenten, bei denen diese Mindestkonzentration einen positiv inotropen bzw. chronotropen Effekt an rechten und linken Vorhöfen auslöste.

Abschließend wurde mit jedem Vorhof eine Isoprenalin-KWK durchgeführt.

Nach jedem Versuch wurden die Vorhöfe entweder mit 10 μM Serotonin bzw. Isoprenalin behandelt oder unbehandelt zur Kontrolle bei -80°C eingefroren. Die übrigen Ventrikel wurden ebenfalls für biochemische Untersuchungen bei -80°C eingefroren.

3.6 Untersuchungen auf Proteinebene

Die eingefrorenen Präparate (s.o.) wurden für Western-Blot-Analysen verwendet. In Abhängigkeit von der Behandlung sollte eine Serin-16-, und Threonin-17-Phosphorylierung des Phospholambans nachgewiesen werden. Der Nachweis von Calsequestrin diente als Beladungskontrolle für die Gelelektrophorese.

3.6.1 Herstellung von Proteinextrakten

Die bei -80°C gelagerten Vorhöfe wurden in ein vorgekühltes Teflon-Gefäß überführt und 1 min im Mikrodismembrator mit der Wolfram-Karbit-Kugel bei 2400 rpm pulverisiert. In ein Reaktionsgefäß überführt, wurde eine Spatelspitze des Pulvers mit 100 μl 10 mM NaHCO_3 und 21,3 μl SDS (20%) versetzt und gut vermischt. Nach 3 x 15 s Ultraschall-Homogenisation auf Eis wurde das Gemisch 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um unlösliche Bestandteile zu entfernen, wurde der Ansatz anschließend 30 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Danach konnte der Überstand mit den gelösten Proteinen abgenommen werden.

Der Proteingehalt des Homogenats wurde nach Lowry et al. (1951) bestimmt, wobei Protein aus Rinderserum als Standard verwendet wurde. Die Photometrie erfolgte als

Dreifach-Bestimmung. Die Homogenate wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

3.6.2 Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot

Die Homogenate wurden mit 10 mM NaHCO_3 und 20% SDS auf die gleiche Proteinkonzentration eingestellt und mit Probenpuffer nach Lämmli (1970) im Verhältnis 1:1 versetzt. Es wurden pro Spur 100 μg Protein sowie pro Gel ein Molekulargewichtsstandard aufgetragen, welcher zuvor bei 95°C 15 Minuten denaturiert worden war. Der Standard bestand aus Lipoxidase (96 kDa), Rinderserumalbumin (67 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Chymotrypsinogen (25 kDa), sowie Ribonuclease (14 kDa) und Cytochrom C (12,5 kDa). Die Gelelektrophorese wurde in Polyacrylamidgelen durchgeführt, wobei das Sammelgel 4 % (Lämmli, 1970) und das Trenngel 10 % Polyacrylamid enthielt (Porzio und Pearson, 1977).

Die Gelelektrophorese erfolgte in einer vertikalen Elektrophoresekammer (Hoefer SE 600) in gekühltem Elektrophoresepuffer bei 4°C stromkonstant mit 40 mA. Wenn die Farbfront den unteren Gelrand erreicht hatte, konnte die Elektrophorese nach etwa 240 Minuten beendet werden.

Die geleelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden im elektrischen Feld auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Der Transfer erfolgte stromkonstant mit 4,5 Ah bei 4°C in einem Puffersystem aus 40 mM Na_2HPO_4 und 7,9 mM NaH_2PO_4 . Durch eine Färbung der Membran mit Ponceau-Rot wurde der Erfolg des Transfers kontrolliert. Anschließend wurde sie getrocknet und bis zur Weiterverwendung bei 4°C trocken gelagert.

3.6.3 Immunologischer Nachweis von Serin-16- und Threonin-17-phosphoryliertem Phospholamban sowie Calsequestrin

Zum immunologischen Nachweis von Serin-16P-PLB und Threonin-17P-PLB wurden die mit Ponceau-Rot gefärbten Membranen entsprechend der Laufhöhe der gesuchten Proteine in Querstreifen geschnitten und diese in Plexiglaskammern überführt. Die Ponceau-Färbung wurde zwei Mal 15 min in TBST-Puffer ausgewaschen, um anschließend die unspezifischen Bindungsstellen durch eine 60-minütige Inkubation

mit 2 % BSA in TBST-Puffer (Puffer A) zu blockieren. Zum Nachweis von Calsequestrin wurde die Membran jedoch mit 5 % Milchpulver in TBST-Puffer geblockt. Es wurden folgende Antikörper verwendet: polyklonaler Anti-Calsequestrin des Kaninchens, polyklonaler Anti-Ser16P-PLB sowie Anti-Thr17P-PLB (siehe 8.4).

Nach dem Blockieren der Membran schloss sich die Inkubation mit 1:1000 in Puffer A verdünnten Anti-Ser16P-PLB bzw. Anti-Thr17P-PLB über Nacht bei 4°C an. Der Calsequestrin-Antikörper wurde jedoch im Verhältnis 1:10000 in 5 % Milchpulver in TBST-Puffer (Puffer B) verdünnt. Anschließend wurden die Membranen dreimalig für zehn Minuten in TBST gewaschen. Nun folgte eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur mit 1:1000 in Puffer B verdünntem anti-rabbit-IgG. Dieser Kaninchen-Antikörper war an eine alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt. Nach erneutem Waschen für drei Mal zehn Minuten in TBST, wurden die Membranstreifen zwei Mal zwei Minuten in AP-Puffer inkubiert.

Zur semiquantitativen Analyse wurde eine Farbreaktion mittels NBT/BCIP verwendet. Hierbei wurden 33 µl BCIP, 66 µl NBT und 10 ml AP-Puffer auf die Membranstreifen gegeben. Die Einwirkzeit betrug einige Sekunden, bis die Banden sichtbar wurden.

3.7 Tryptophan-, Serotonin- und Katecholaminbestimmungen mittels HPLC

Tryptophan-, Serotonin-, Adrenalin- und Noradrenalin Spiegel wurden mittels *high-performance liquid chromatography* (HPLC) mit fluorometrischer Messung (Daul et al., 1995) im Plasma sowie im Herzgewebe von reserpinisierten und Kontrolltieren gemessen.

Es wurden etwa 400 bis 500 µl Blut der Versuchstiere in einen Microtainer (BD microtainer K2E, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, BRD) entnommen und sofort für zehn Minuten bei 6000 rpm zentrifugiert. Das Plasma wurde entweder sofort weiter verwendet oder bei -80° C gelagert und innerhalb von drei Tagen bearbeitet.

Das Gewebe wurde durch die Entnahme des Herzens von narkotisierten Mäusen gewonnen, von denen die Hälfte 16 h vor Versuchsbeginn mit Reserpin i.p. behandelt wurde. Um die Koronararterien von Blut zu befreien, wurden die Herzen 20 min in einer Langendorffapparatur perfundiert. Danach wurden sie im flüssigen Stickstoff gefroren und bei -80°C bis zur Weiterbehandlung gelagert.

Zur Messung des Substanzgehaltes im Gewebe wurden 100 mg gefrorenes Herzgewebe bei 0°C in 0,4 M HClO₄ mit 0,1% Ascorbinsäure, 0,1% Cystein, 3 mM Glutathion und 2 mM EDTA homogenisiert. Nach Zentrifugation (5 min, 6000 rpm, 0°C)

wurden 20 µl des Überstandes mit 3 µl NaOH (2,5 M) neutralisiert und sofort in die HPLC-Säule überführt.

Die Auftrennung durch HPLC wurde in einer Eurosphere 100-5C8 Säule (250 x 4,4 mm i.d. Knauer, BRD) bei 30°C durchgeführt.

3.8. Statistische Auswertung

Die im Rahmen der Arbeit gemessenen Daten sind als Mittelwerte mit zugehörigen Standardfehlern (SEM) angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mittels t-Test ermittelt. Im Fall der Messungen an den Herzvorhöfen wurden jeweils die Kontraktionskraft des linken Vorhofes und die Frequenz des rechten Vorhofes mittels Varianzanalyse ANOVA mit folgender Fehlertestung nach Bonferroni statistisch ausgewertet. Die Auswertung der Arrhythmien erfolgte mittels χ^2 -Test. Ein p-Wert kleiner oder gleich 0,05 wurde als signifikant angesehen. Die Anzahl der Einzelversuche wurde mit n angegeben.

4. Ergebnisse

4.1. Genotypisierung der Versuchstiere

Zur Überprüfung einer erfolgreichen Integration des 5-HT_{4a}-Rezeptor-Transgens in die Maus-DNA, wurde aus Schwanzbiopsien der Tiere die genomische DNA isoliert (siehe 3.2.1.) und eine PCR durchgeführt. Das PCR-Programm und die verwendeten Primer sind in 3.3.3 und in 8.3 aufgeführt.

Im Vorfeld wurde die Qualität der extrahierten DNA überprüft. Hierfür wurde die optische Dichte (OD) bei jeweils 260 nm und 280 nm gemessen und der Quotient aus beiden Werten gebildet.

Die Abbildung 3 zeigt die im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte.

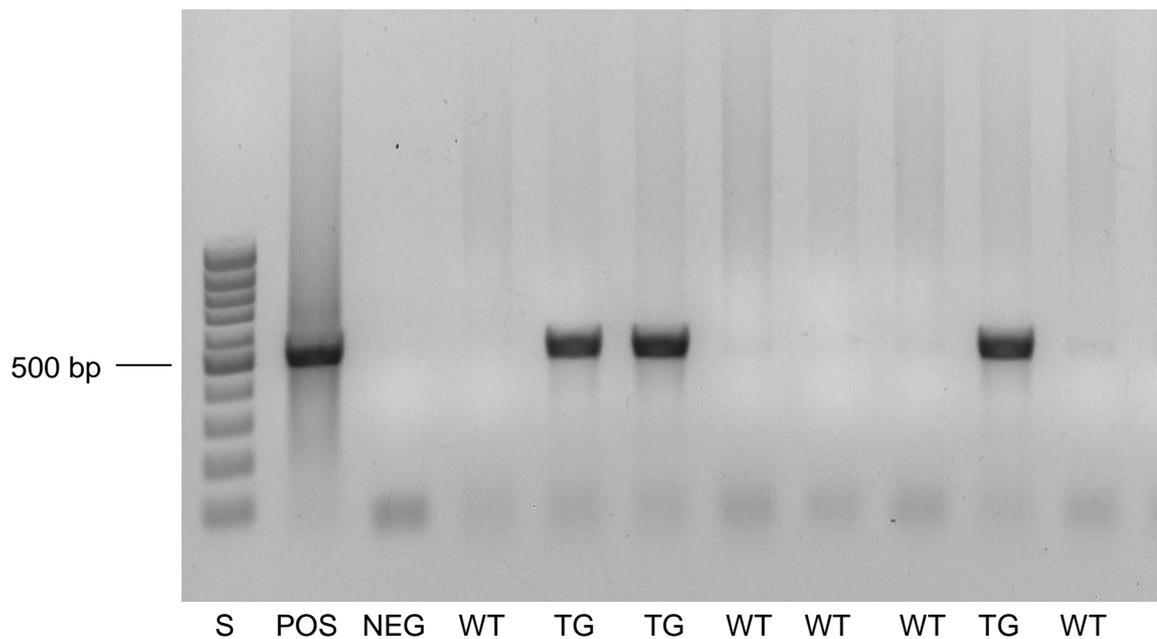


Abb. 3: Genotypisierung durch PCR

Abgebildet sind die mittels Gelelektrophorese aufgetrennten PCR-Produkte. Die amplifizierte DNA-Sequenz hat eine Größe von 508 bp. S, 100 bp-DNA-Leiter als Standard; POS, Positivprobe; NEG, Negativprobe; WT, Wildtyp; TG, transgenes Tier

4.2. Hämodynamische Messungen mittels Linksherzkatheter

Um den Einfluss des 5-HT auf die Funktion des Herzens *in vivo* zu beurteilen und weitere Aufschlüsse über die Auswirkung der herzspezifischen 5HT_{4a}-Rezeptor-Überexpression zu erhalten, wurden verschiedene Herzparameter mittels invasiver Kathedertechnik (siehe 3.4) gemessen. Es wurden 5HT_{4a}-Rezeptor überexprimierende Tiere (TG, n=9) mit Wildtyp-Tieren (WT, n=9) verglichen, wobei beiden Gruppen jeweils 1 ml einer 1 mM 5-HT-Lösung über den zentralen Katheter injiziert wurde.

Unter Kontrollbedingungen unterschieden sich die Herzfrequenzen von WT (454 ± 38 bpm) und 5HT_{4a}-Rezeptor überexprimierenden Tieren (461 ± 25 bpm) nicht (Abbildung 4 a). Die maximale Stimulation durch Serotonin führte bei den TG zu keiner Zunahme der Herzfrequenz (505 ± 17 bpm, $p > 0,05$ vs. Kontrollwert). Dies war ebenso bei den WT zu beobachten (479 ± 37 bpm, $p > 0,05$ vs. Kontrollwert).

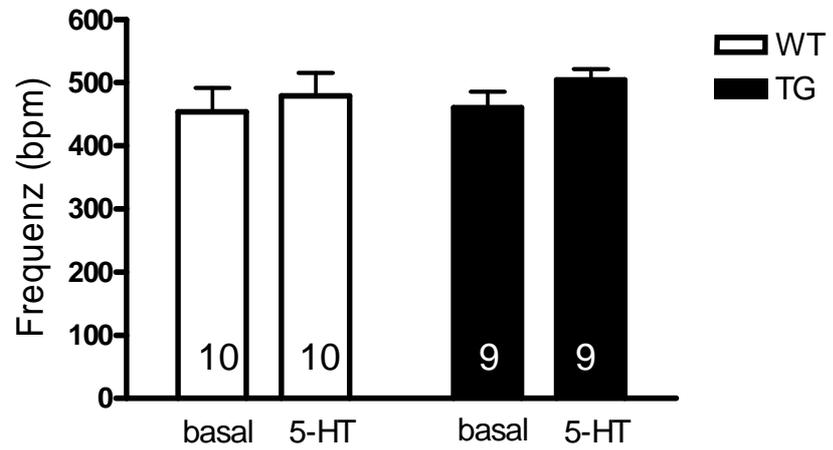
Ohne Stimulation mit 5-HT waren die Kontrollwerte des LVD von TG und WT nahezu identisch (LVD; WT: $109,1 \pm 6,9$ mmHg; TG: $102,4 \pm 5,9$ mmHg; Abb. 4 b).

Die Parameter dp/dt_{min} und dp/dt_{max} stellen die minimalen bzw. maximalen Werte der 1. Ableitung der Druckkurve über die Zeit dar. Sie beschreiben die maximale Druckabfallgeschwindigkeit bzw. die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit. Unter Kontrollbedingungen waren sowohl beim Kontraktilitätsparameter (dp/dt_{max}) als auch beim Relaxationsparameter (dp/dt_{min}) keine Unterschiede zwischen WT und TG zu erkennen (dp/dt_{max} ; WT: 6310 ± 957 mmHg/s; TG: 7077 ± 1168 mmHg/s; dp/dt_{min} ; WT: -4972 ± 548 mmHg/s; TG: -4731 ± 607 mmHg/s; Abb. 4 c+d).

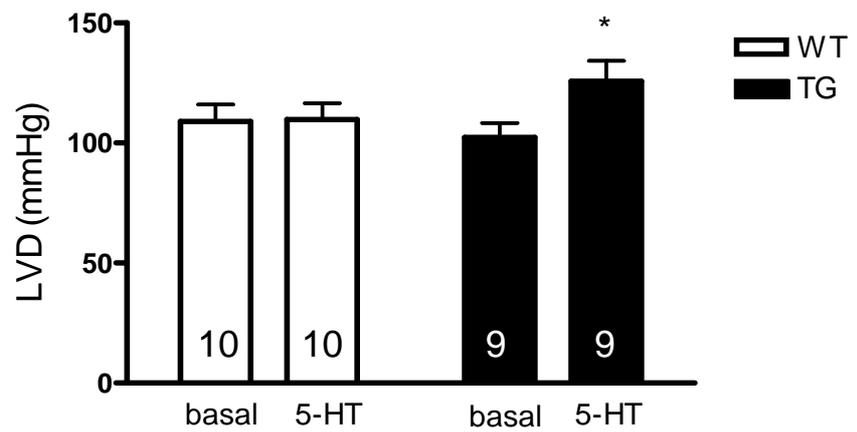
Nach maximaler Stimulation mit Serotonin änderten sich der systolische LVD sowie die maximale Druckanstiegs- bzw. Druckabfallgeschwindigkeit der WT erwartungsgemäß nicht (systolischer LVD: $110 \pm 6,6$ mmHg; dp/dt_{min} : -4798 ± 574 mmHg/s; dp/dt_{max} : 6487 ± 1037 mmHg/s; Abb. 4 b-d). Jedoch zeigten die TG deutliche Unterschiede in der Druckanstiegs- bzw. der Druckabfallgeschwindigkeit im Vergleich zu den Kontrollbedingungen und im Vergleich zu den durch 5-HT stimulierten Wildtypen (Abb. 4 c + d). Die Druckanstiegsgeschwindigkeit dp/dt_{max} der TG beschleunigte sich unter 5-HT-Einwirkung um etwa 16 % - von 7077 ± 1168 mmHg/s auf 8211 ± 1419 mmHg/s. Die maximale Stimulation der TG durch 5-HT führte zugleich zu einer Zunahme der Druckabfallgeschwindigkeit dp/dt_{min} um etwa 18 % (dp/dt_{min} Kontrolle: -4731 ± 607 mmHg/s; dp/dt_{min} 5-HT: -6075 ± 900 mmHg/s; siehe Abb. 4 d). Der systolische LVD transgener Tiere stieg unter 5-HT-Stimulation auf $125,8 \pm 8,6$ mmHg ($p < 0,05$; TG, 5-HT vs. basal; siehe Abb. 4 b). Im Vergleich zum Kontrollwert stieg der systolische LVD der TG unter maximaler Stimulation durch Serotonin um $23 \pm 4,5$ %. Im Gegensatz dazu

blieb der systolische LVD der WT nach Gabe von Serotonin mit einem Anstieg von $1,3 \pm 2,3 \%$ im Vergleich zu den Kontrollbedingungen gleich (siehe Abb. 4 b).

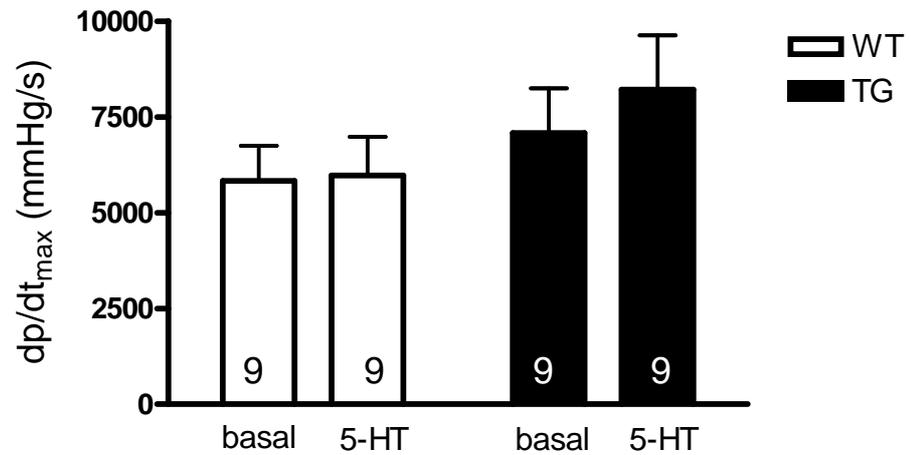
a



b



C



d

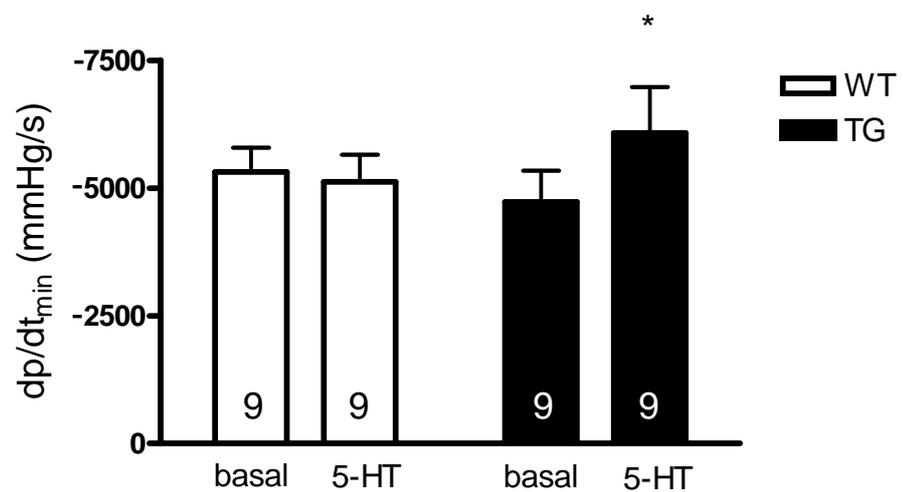


Abb. 4 a, b, c, d:
Hämodynamische Parameter unter basalen Bedingungen und unter maximaler Stimulation mit 5-HT

Dargestellt sind die Ergebnisse der invasiven Hämodynamik bei TG- und WT-Mäusen unter basalen Bedingungen (basal) und unter maximaler Stimulation mit 5-HT (5-HT). (a) Herzfrequenz in Schlägen pro Minute (bpm), (b) systolischer linksventrikulärer Druck in mmHg, (c) maximale Geschwindigkeit des Druckanstiegs (dp/dt_{max}) in mmHg/s sowie die maximale Geschwindigkeit des Druckabfalls (dp/dt_{min}) in mmHg/s (d). Die Zahlen in den Säulen geben die Anzahl der pro Gruppe untersuchten Tiere an.
* $p < 0,05$ vs. basal

4.3. Kontraktionskraft- und Frequenzmessungen an Herzvorhöfen

4.3.1. Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit Serotonin

Wie bereits in 3.4.2. beschrieben, wurden die Vorhöfe sorgfältig präpariert und im auf 37°C erwärmten Organbad an Metallhaken zwischen zwei Drähten eingespannt. Die vom Kraftaufnehmer gemessenen Frequenzen und Kontraktionskräfte der Vorhöfe wurden vom Schreiber auf Millimeterpapier aufgezeichnet.

Es wurden Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit 5-HT von 1 nM bis 10 µM durchgeführt.

Alle Vorhöfe reagierten mit Kontraktionskraft- und Frequenzanstiegen adäquat auf eine β-adrenerge Stimulation mit Isoprenalin (siehe 4.3.2).

Die Ausgangswerte der linken Vorhöfe von WT ($4,9 \pm 0,4$ mN, n=26) und TG ($4,7 \pm 0,3$ mN, n=26) unterschieden sich nicht, wohl aber die der rechten Vorhöfe. So war die Ausgangsfrequenz transgener Tiere (448 ± 17 bpm, n=28) signifikant höher ($p < 0,05$) als die der WT (378 ± 10 bpm, n=23).

Die Vorhöfe der transgenen Tiere zeigten im Gegensatz zu denen der WT einen ausgeprägt positiv inotropen und chronotropen Effekt auf 5-HT. Bereits ab einer Konzentration von 10 nM Serotonin im Organbad stieg die Kontraktionskraft der linken Vorhöfe transgener Tiere bezogen auf den Ausgangswert signifikant an ($8,3 \pm 0,6$ mN vs. $4,7 \pm 0,3$ mN, $p < 0,05$, siehe Abb. 5). Ebenso stellt sich ab einer 5-HT-Konzentration von 10 nM im Organbad erstmalig ein signifikanter Frequenzanstieg der 5-HT_{4a}-Rezeptor-überexprimierenden rechten Vorhöfe (523 ± 14 bpm vs. 448 ± 17 bpm, $p < 0,05$, siehe Abb. 6) bezüglich des Ausgangswertes dar.

Auch im Vergleich mit WT-Vorhöfen war ab einer 5-HT-Konzentration von 10 nM ein signifikanter Anstieg der Kontraktionskraft linker Vorhöfe von TG-Tieren messbar (WT: $4,6 \pm 0,4$ vs. TG: $8,3 \pm 0,6$ mN, $p < 0,05$). Die $-\log EC_{50}$ -Werte der TG von linken (7,96) und rechten Vorhöfen (7,87) unterscheiden sich nicht ($p > 0,05$).

Die Abbildungen 5 und 6 zeigen jeweils die 5-HT-Konzentrations-Wirkungs-Kurven der rechten und linken Vorhöfe von WT und TG.

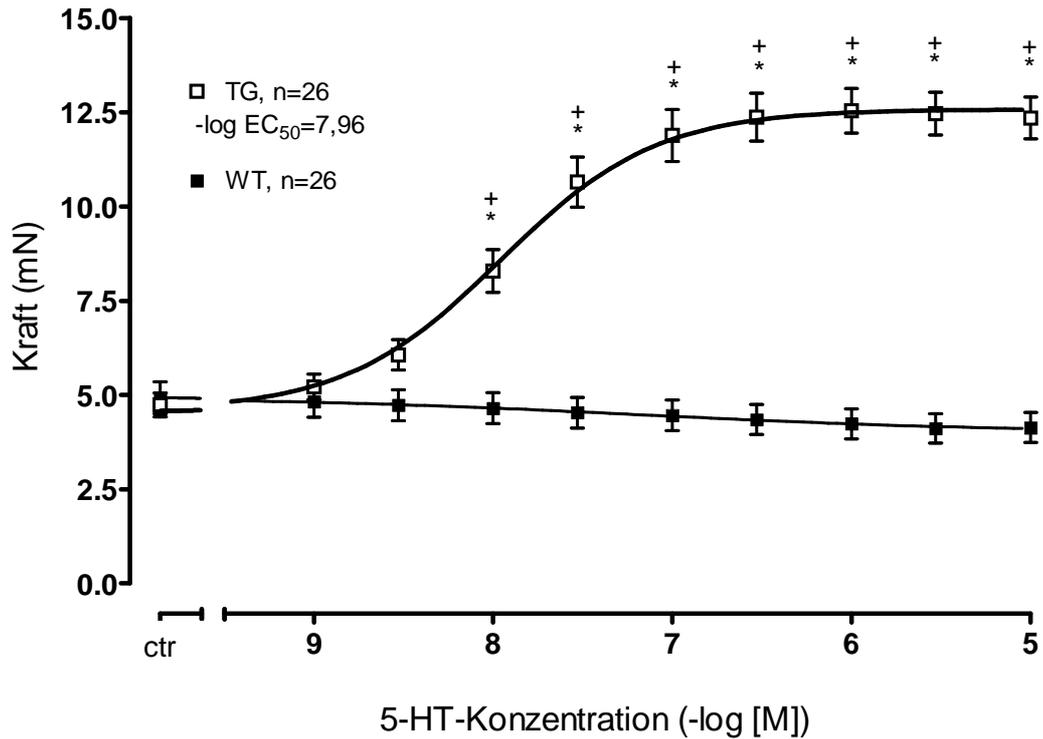


Abb. 5:
Kontraktionskraftmessungen an linken Vorhöfen von TG- und WT-Tieren unter Stimulation mit 5-HT

Die Darstellung zeigt die Konzentrations-Wirkungs-Kurven der elektrisch gereizten linken Vorhöfe von TG und WT. Es sind die Kontraktionskräfte in mN und die $-\log EC_{50}$ -Werte angegeben. Es wurden 5-HT-Konzentrationen von 1 nM bis 10 μ M verwendet. * $p < 0,05$ vs. Kontrollwert (ctr); + $p < 0,05$ vs. WT

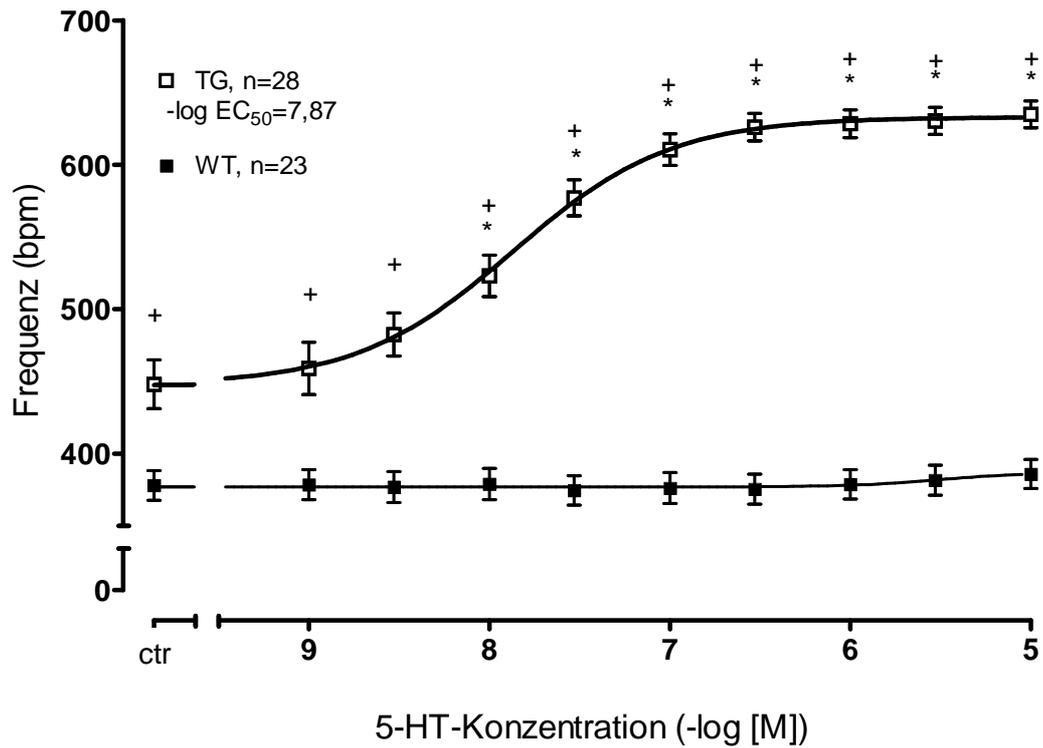


Abb. 6:
Frequenzmessungen an rechten Vorhöfen von TG- und WT-Tieren unter Stimulation mit 5-HT

Die Darstellung zeigt die Konzentrations-Wirkungs-Kurven der spontan schlagenden rechten Vorhöfe von TG und WT. Dargestellt sind die Frequenzen in bpm und die $-\log EC_{50}$ -Werte. Es wurden 5-HT-Konzentrationen von 1 nM bis 10 μ M verwendet. * $p < 0,05$ vs. Kontrollwert (ctr); + $p < 0,05$ vs. WT

4.3.2 Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit Isoprenalin

Am Ende jedes Versuches wurde eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve mit dem β -Adrenozeptor-Agonisten Isoprenalin (Iso) von 1 nM bis 10 μ M durchgeführt. Dies diente auch zur Qualitätskontrolle der Präparate. Ein eindeutiger Effekt des Isoprenalins wies auf eine hohe Qualität der Präparate hin. Nach Auswertung aller Kurven zeigte sich, dass sich die Iso-Effekte unabhängig von den vorher verwendeten Substanzen sehr ähnelten. Ferner gab es keine Abweichungen der Kontrollwerte von Kontraktionskraft und Frequenz ohne Isoprenalin und den Werten unter maximaler Stimulation mit Isoprenalin. Aufgrund dieser großen Übereinstimmungen wurden die einzelnen Konzentrations-Wirkungs-Kurven für Isoprenalin zusammengefasst und im Folgenden wird das Gesamtergebnis präsentiert. Dies beinhaltet 37 linke Vorhöfe transgener Tiere sowie 34 linke Vorhöfe von Wildtypen und 27 rechte Vorhöfe transgener Tiere bzw. 24 von Wildtypen.

Wie in Abbildung 7 dargestellt, gab es einige Unterschiede zwischen linken Vorhöfen von TG und WT. Die Kontrollwerte lagen bei $2,2 \pm 0,2$ mN (WT) bzw. $2,5 \pm 0,2$ mN (TG). Die Maximalwerte betragen bei 10 μ M Isoprenalin $11,9 \pm 0,5$ mN (WT) und $12,35 \pm 0,5$ mN (TG). Die $-\log EC_{50}$ -Werte unterschieden sich mit 7,6 (TG) und 7,8 (WT) nicht ($p > 0,05$).

Beim Vergleich der rechten Vorhöfe von transgenen Tieren und Wildtypen zeigte sich ein ähnliches Bild (siehe Abbildung 8). Die Kontrollwerte lagen unter basalen Bedingungen bei 363 ± 10 bpm (WT) und 398 ± 18 bpm (TG). Die transgenen Tiere erreichten unter 10 μ M Isoprenalin einen Maximalwert von 615 ± 14 bpm und die Wildtypen erreichten eine Maximalfrequenz von 622 ± 11 bpm. Die $-\log EC_{50}$ -Werte der rechten Vorhöfe lagen bei 8,77 (WT) und 8,43 (TG) ($p < 0,05$). Die rechten Vorhöfe der WT reagierten empfindlicher auf Isoprenalin als jene der TG.

Zudem reagierten die rechten Vorhöfe von WT und TG empfindlicher als die linken Vorhöfe auf Isoprenalin ($-\log EC_{50}$: RA: WT: 8,77; TG: 8,43. LA: WT 7,8, TG 7,6; $p < 0,05$).

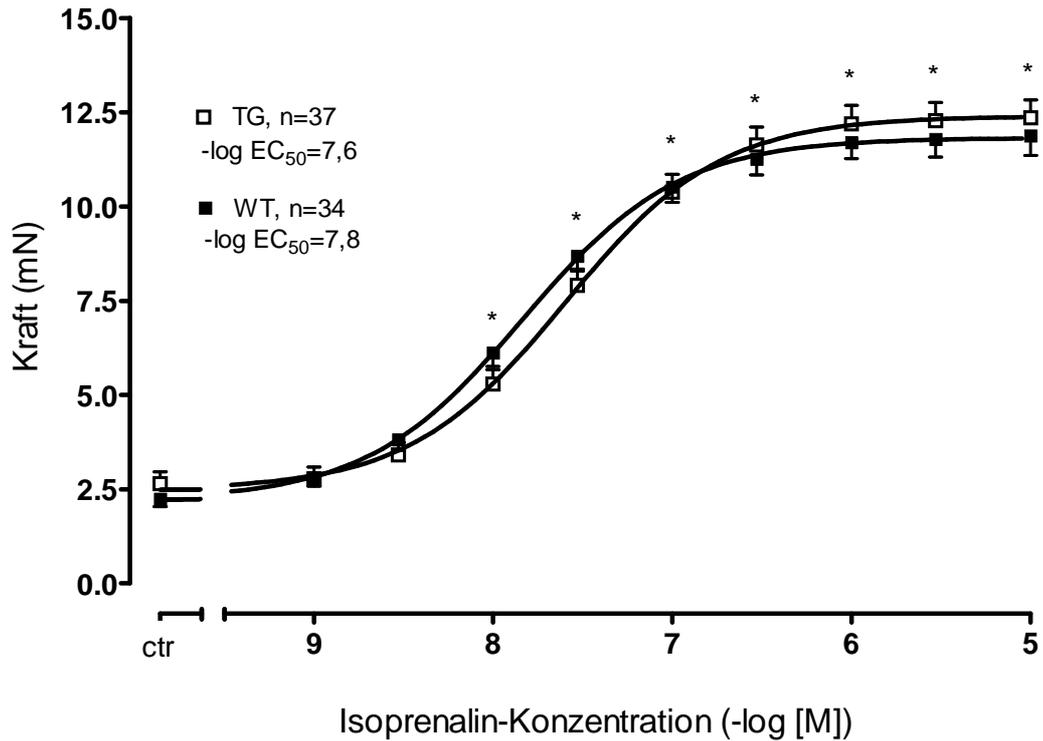


Abb. 7:
Konzentrations-Wirkungskurven von Isoprenalin an linken Vorhöfen von WT und TG

Dargestellt sind die Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit Isoprenalin an elektrisch gereizten linken Vorhöfen von WT und TG. Es sind die Kontraktionskräfte in mN und die $-\log EC_{50}$ -Werte angegeben. Es wurden Isoprenalin-Konzentrationen von 1 nM bis 10 μ M verwendet. * $p < 0,05$ vs. Kontrollwert (ctr)

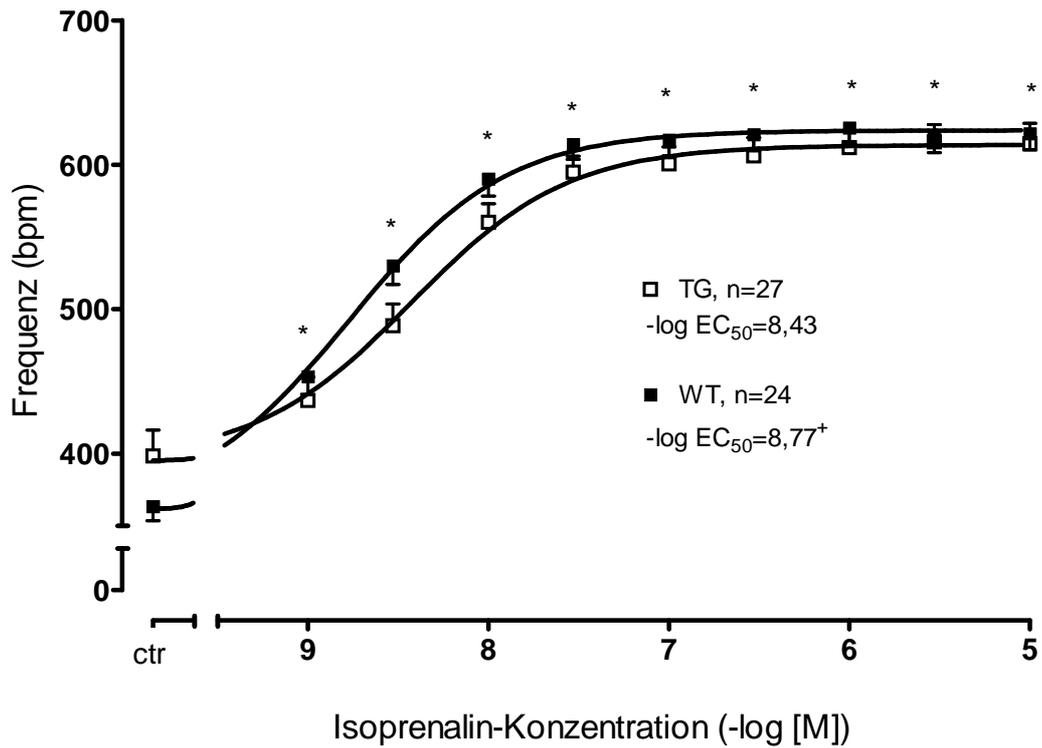


Abb. 8:
Konzentrations-Wirkungskurven von Isoprenalin an rechten Vorhöfen von WT und TG

Dargestellt sind die Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit Isoprenalin an spontan schlagenden rechten Vorhöfen von WT und TG. Es werden die Frequenzen in bpm und die -log EC₅₀-Werte angegeben. Es wurden Isoprenalin-Konzentrationen von 1 nM bis 10 μM verwendet. * p < 0,05 vs. Kontrollwert (ctr), + p < 0,05 vs. TG

4.3.3 Vergleich der Wirkung von 5-HT und Isoprenalin

Die Tabelle 6 zeigt jeweils die Kontroll- und Maximalwerte von rechten und linken Vorhöfen der Konzentrations-Wirkungs-Kurven von 5-HT sowie Isoprenalin. Der Effekt von Serotonin auf die Vorhöfe transgener Tiere ist mit dem von Isoprenalin auf die Vorhöfe von Wildtyp- und transgenen Tiere vergleichbar (siehe Abb. 9 und 10). Jedoch waren die Ausgangswerte der mit Serotonin behandelten linken Vorhöfe von WT und TG größer als die Ausgangswerte vor der Gabe von Isoprenalin. Dies lässt sich u.a. darauf zurückführen, dass die Konzentrations-Wirkungs-Kurve mit Isoprenalin immer den abschließenden Protokollpunkt darstellte. Die 5-HT-KWK wurde jedoch immer zu Beginn des jeweiligen Protokolls durchgeführt. Somit hingen die Vorhöfe bis zur abschließenden KWK mit Isoprenalin mindestens drei Stunden im Organbad. Dabei ließ die Vorspannung der Präparate langsam nach und die Kontraktionskraft unter basalen Bedingungen war verringert. Weiterhin unterschieden sich die $-\log EC$ -Werte zwischen Isoprenalin- und Serotonin-KWK (LA: Iso: 7,61, 5-HT: 7,96; RA: Iso: 8,43, 5-HT: 7,87, $p < 0,05$, siehe Abb. 9 und 10) der linken und rechten Vorhöfen. Bereits in 4.3.2 wurde die empfindlichere Reaktion der RA auf Iso gezeigt. Im Gegensatz dazu gab es keinen Unterschied zwischen RA und LA der TG nach Stimulation mit 5-HT.

Tab. 6:

Darstellung der Kontroll- und Maximalwerte von linken und rechten Vorhöfen von WT und TG der Serotonin- und Isoprenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven

Dargestellt sind die Kontroll- sowie die Maximalwerte (**fett**) der rechten (RA) und linken Vorhöfe (LA) von TG und WT. Die Kontraktionskraft der LA ist in mN und die Frequenz der RA in bpm angegeben. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle; + $p < 0,05$, TG vs. WT

	LA (mN)		RA (bpm)	
	WT	TG	WT	TG
Kontrolle (5-HT)	4,9 ± 0,4	4,7 ± 0,3	378 ± 10	448 ± 17 ⁺
5-Hat	4,1 ± 0,4	12,3 ± 0,5^{**}	386 ± 10	635 ± 9^{**}
Kontrolle (Iso)	2,2 ± 0,2	2,5 ± 0,2	363 ± 10	398 ± 18
Iso	11,9 ± 0,5[*]	12,4 ± 0,5[*]	622 ± 11[*]	615 ± 14[*]

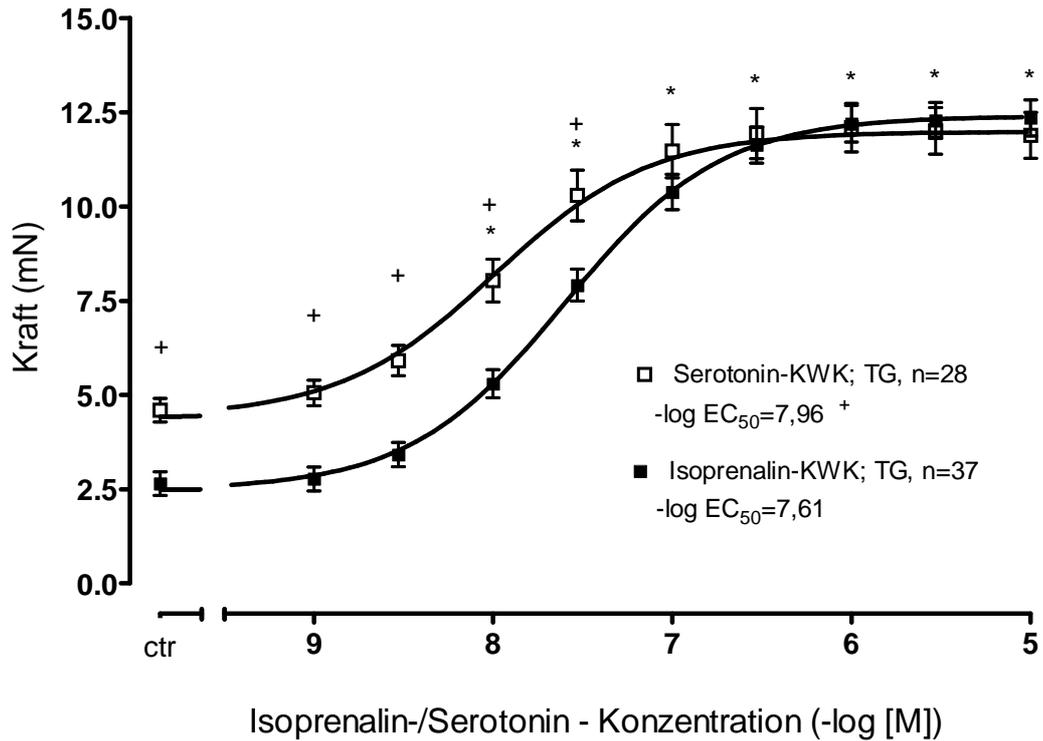


Abb. 9:
Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Isoprenalin und 5-HT an linken Vorhöfen von TG

Dargestellt sind die Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit Isoprenalin und 5-HT an elektrisch gereizten linken Vorhöfen von TG. Es sind die Kontraktionskraft in mN und die $-\log EC_{50}$ -Werte angegeben. Es wurden Isoprenalin- und 5-HT-Konzentrationen von 1 nM bis 10 μ M verwendet. * $p < 0,05$ vs. Kontrollwert (ctr); + $p < 0,05$ vs. Isoprenalin-KWK

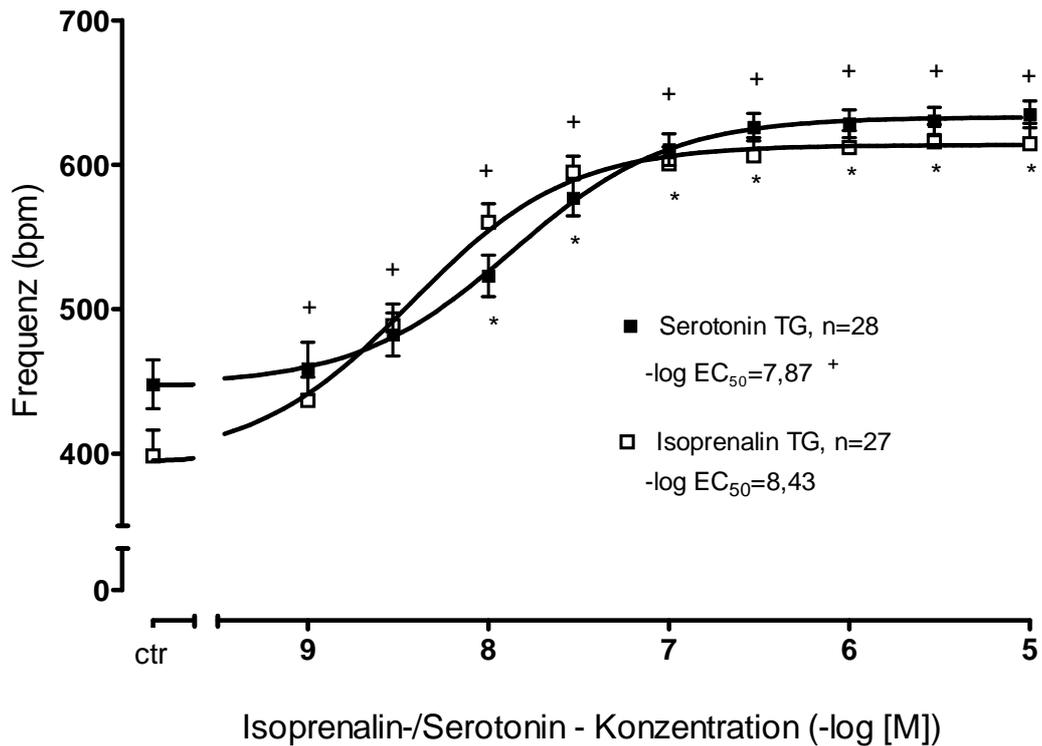


Abb. 10:
Konzentrations-Wirkungskurven von Isoprenalin und 5-HT an rechten Vorhöfen von TG

Dargestellt sind die Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit Isoprenalin und 5-HT an spontan schlagenden rechten Vorhöfen von TG. Es sind die Frequenzen in bpm und die $-\log EC_{50}$ -Werte angegeben. Es wurden Isoprenalin- und 5-HT-Konzentrationen von 1 nM bis 10 μ M verwendet. * $p < 0,05$ vs. Kontrollwert (ctr). + $p < 0,05$ vs. Isoprenalin-KWK

4.3.4 Arrhythmien an isolierten Vorhofpräparaten

Kaumann und Sanders (1994) haben gezeigt, dass 5-HT via 5-HT₄-Rezeptoren in menschlichen Vorhofpräparaten Arrhythmien auslösen kann. Deshalb wurde die Häufigkeit von Arrhythmien in isolierten linken und rechten Vorhofpräparaten von WT und TG untersucht.

Während der Versuche zeigten die TG häufiger Arrhythmien als die WT. Unter Basalbedingungen zeigten besonders die linken Vorhöfe transgener Tiere arrhythmische Kontraktionen (siehe Abb. 11). Um dies statistisch bewerten zu können, wurde der χ^2 -Test angewendet. Dabei wiesen die linken Vorhöfe der TG signifikant häufiger arrhythmische Kontraktionen auf als die linken Vorhöfe der WT ($p < 0,05$, χ^2 -Test). Die rechten Vorhöfe der TG kontrahierten ebenfalls häufiger arrhythmisch als die der WT, jedoch war der Unterschied nicht signifikant ($p < 0,0526$, χ^2 -Test; siehe Tab. 7).

Tab. 7:
Auswertung der Arrhythmien

Gezeigt sind die Häufigkeiten von Arrhythmien unter basalen Bedingungen bei linken Vorhöfen (LA) und rechten, spontan schlagenden Vorhöfen (RA) von WT und TG. Die Auswertung erfolgte mittels χ^2 -Test.

	LA		RA	
	WT	TG	WT	TG
mit Arrhythmien	1	19	7	15
ohne Arrhythmien	39	21	32	25
Summe	40	40	39	40
χ^2 -Test (WT vs. TG)	p < 0,0001		p < 0,0526	

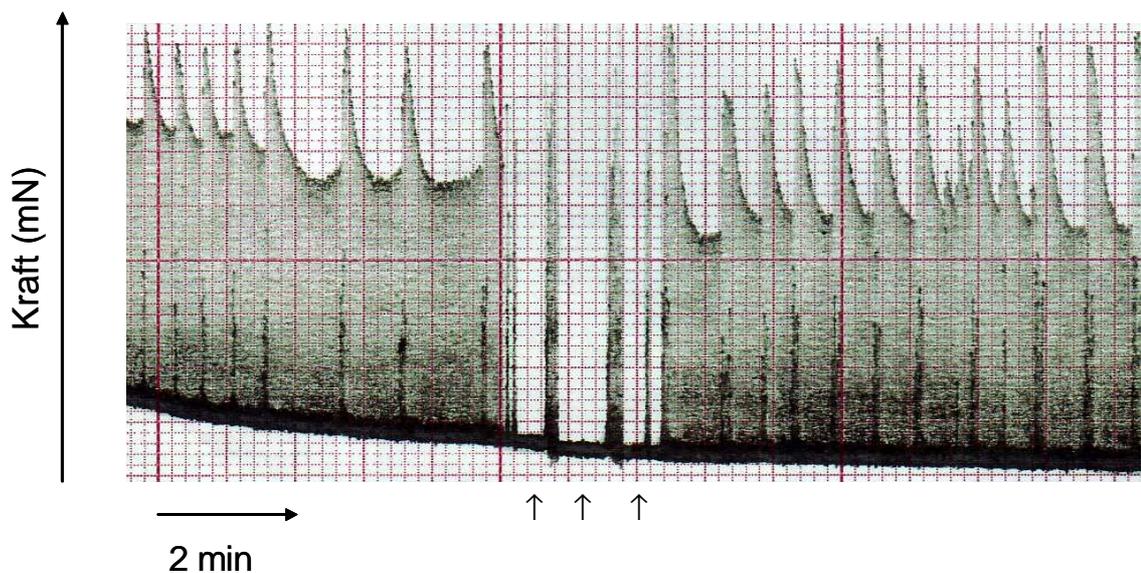


Abb. 11:
Linker Vorhof TG – Beispiel für arrhythmische Kontraktionen

Dargestellt ist die aufgezeichnete Kontraktionskraft eines elektrisch gereizten linken Vorhofs von TG. Trotz zwischenzeitlich ausgeschalteter elektrischer Reizung (↑), zeigte der Vorhof weiterhin arrhythmische Kontraktionen. Entstanden ist diese Aufzeichnung etwa 20 min nach Versuchsbeginn und ohne jegliche Vorbehandlung des Vorhofs.

4.3.5 Protokoll 1 – GR125487

Im Anschluss an die erste Konzentrations-Wirkung-Kurve von 5-HT (siehe 4.3.1) wurden die Vorhöfe in 10 nM des inversen 5-HT_{4a}-Rezeptor-Agonisten GR125487 über 30 min inkubiert. Darauf folgte die zweite 5-HT-KWK. Es konnte eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve im Vergleich zur ersten 5-HT-KWK gezeigt werden.

Dies zeigten auch die $-\log EC_{50}$ -Werte der 5-HT-Kurven (TG, LA: 7,86 ohne vs. 5,66 mit GR125487; TG, RA: 7,78 ohne vs. 5,15 mit GR125487; $p < 0,05$; Abb. 12 und 13).

Weiterhin unterschieden sich die Ausgangswerte der 5-HT-KWK unter basalen Bedingungen und jener unter GR125487 (basal: $5,6 \pm 0,8$ mN; 458 ± 25 bpm; GR125487: $2,6 \pm 0,4$ mN; 325 ± 33 bpm; $p < 0,05$). Im Fall der rechten Vorhöfe war dieser Unterschied signifikant ($p < 0,05$).

Die maximale Kontraktionskraft bzw. die maximale Frequenz der linken und rechten transgenen Vorhöfe (LA: $12,2 \pm 1,5$ mN; RA: 625 ± 11 bpm) konnten ohne Vorbehandlung mit GR125487 schon bei einer Konzentration von $0,3 \mu\text{M}$ 5-HT gemessen werden. Dagegen schienen die Maximalwerte bei linken sowie rechten Vorhöfen, nach Vorbehandlung mit GR125487, bei der höchsten Konzentration von $10 \mu\text{M}$ 5-HT noch nicht erreicht (LA: $11,5 \pm 0,8$ mN; RA: 589 ± 9 bpm; siehe Abb. 12 und 13). Die Frequenz der rechten Vorhöfe transgener Tiere erreichte ein Maximum von 639 ± 8 bpm ohne Antagonist und 589 ± 9 bpm unter $10 \mu\text{M}$ GR125487. Die LA erreichten Maximalwerte von $12,1 \pm 1,1$ mN bzw. $11,5 \pm 0,8$ mN (ohne bzw. mit GR125487).

Die Vorhöfe der Wildtypen reagierten nicht auf GR125487. Die Werte nach Einwirken von $10 \mu\text{M}$ GR125487 betragen $1,8 \pm 0,3$ mN (LA) und 363 ± 16 bpm (RA). Ein Anstieg von Frequenz oder Kontraktionskraft der WT unter der zweiten 5-HT-KWK war nicht zu beobachten. In den Abbildungen 12 und 13 sind daher nur die Ergebnisse der TG-Vorhöfe dargestellt.

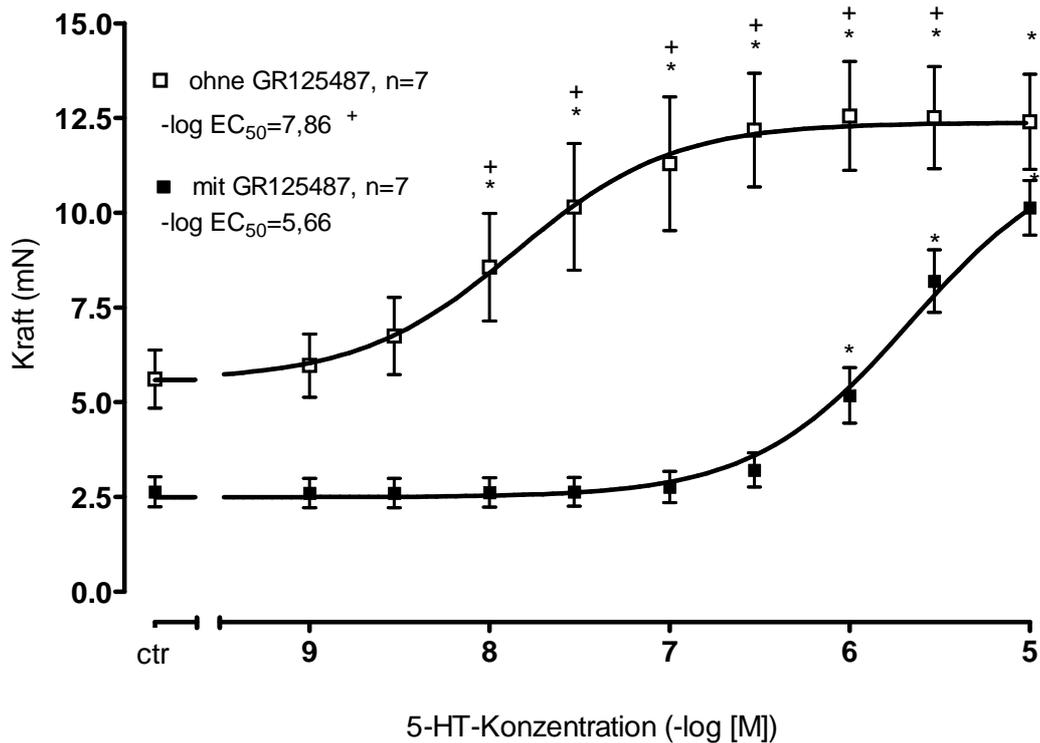


Abb. 12:
Konzentrations-Wirkungs-Kurven von 5-HT mit / ohne GR125487 an linken Vorhöfen von TG

Dargestellt sind die Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit 5-HT an elektrisch gereizten linken Vorhöfen von TG. Zu Beginn erfolgte eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve (KWK) mit 5-HT ohne GR125487 als Kontrolle. Anschließend wurde das 5-HT ausgespült. Nach 30-minütiger Einwirkzeit von 10 nM GR125487 wurde eine weitere KWK mit 5-HT durchgeführt. Es sind die Kontraktionskräfte in mN und die $-\log EC_{50}$ -Werte angegeben. Es wurden 5-HT-Konzentrationen von 1 nM bis 10 μ M verwendet.
* $p < 0,05$ vs. Kontrollwert (ctr); + $p < 0,05$ vs. mit GR125487

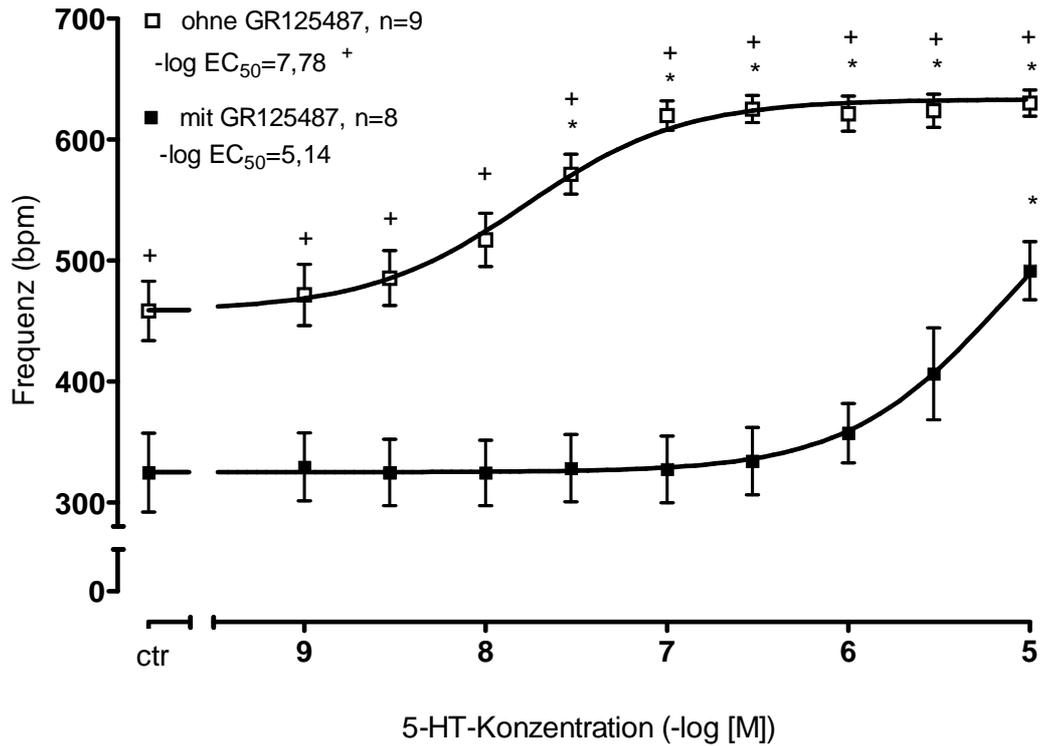


Abb. 13:
Konzentrations-Wirkungs-Kurven von 5-HT mit / ohne GR125487 an rechten Vorhöfen von TG

Dargestellt sind Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit 5-HT an spontan schlagenden rechten Vorhöfen von TG. Zu Beginn erfolgte eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve (KWK) mit 5-HT ohne GR125487 als Kontrolle. Das 5-HT wurde ausgespült und nach 30-minütiger Einwirkzeit von 10 nM GR125487 wurde eine weitere KWK mit 5-HT durchgeführt. Es sind die Frequenzen in bpm und die $-\log EC_{50}$ -Werte angegeben. Es wurden 5-HT-Konzentrationen von 1 nM bis 10 μ M verwendet. * $p < 0,05$ vs. Kontrollwert (ctr); + $p < 0,05$ vs. mit GR125487

4.3.6 Protokoll 2 – GR113808

Im zweiten Protokoll wurden die Vorhöfe nach der ersten 5-HT-KWK in 10 nM des kompetitiven 5-HT₄-Rezeptor-Antagonisten GR113808 über 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte die zweite 5-HT-KWK.

Die Ergebnisse ähneln in vielen Punkten denen aus dem ersten Protokoll. Ohne GR113808 betrug der EC₅₀-Wert transgener linker Vorhöfe 12 nM (n=8) wobei dieser unter Einfluss von GR113808 auf 3,9 µM (n=8) anstieg. Die EC₅₀-Werte transgener rechter Vorhöfe betrugen 12 nM (ohne GR113808, n=7) und 2,6 µM (mit GR113808, n=6; p<0,05 vs. ohne GR113808).

In den Abbildungen 14 und 15 sind die Rechtsverschiebungen der Kurven für 5-HT unter Vorbehandlung mit GR113808 gegenüber den unbehandelten Kontrollen dargestellt (-log EC₅₀-Werte signifikant unterschiedlich).

Die Ausgangswerte von Frequenz und Kontraktionskraft transgener Tiere unter Einfluss des kompetitiven Antagonisten GR113808 (352 ± 25 bpm bzw. 1,8 ± 0,34 mN) verringerten sich im Vergleich zu jenen aus der ersten 5-HT-KWK (405 ± 35 bpm; 4,0 ± 0,5 mN), allerdings ohne Signifikanz aufzuweisen. GR113808 führte jedoch zu keinen Veränderungen der Maximalwerte unter Stimulation mit 5-HT (ohne GR113808: 602 ± 31 bpm; 10,4 ± 0,6 mN; mit GR113808: 566 ± 30 bpm; 9,5 ± 0,7 mN).

Der 5-HT₄-Rezeptor Antagonist GR113808 selbst zeigte keinen Effekt auf die Wildtypen. Ebenso hatte 5-HT unter GR113808 keinen Einfluss auf die Vorhöfe der WT.

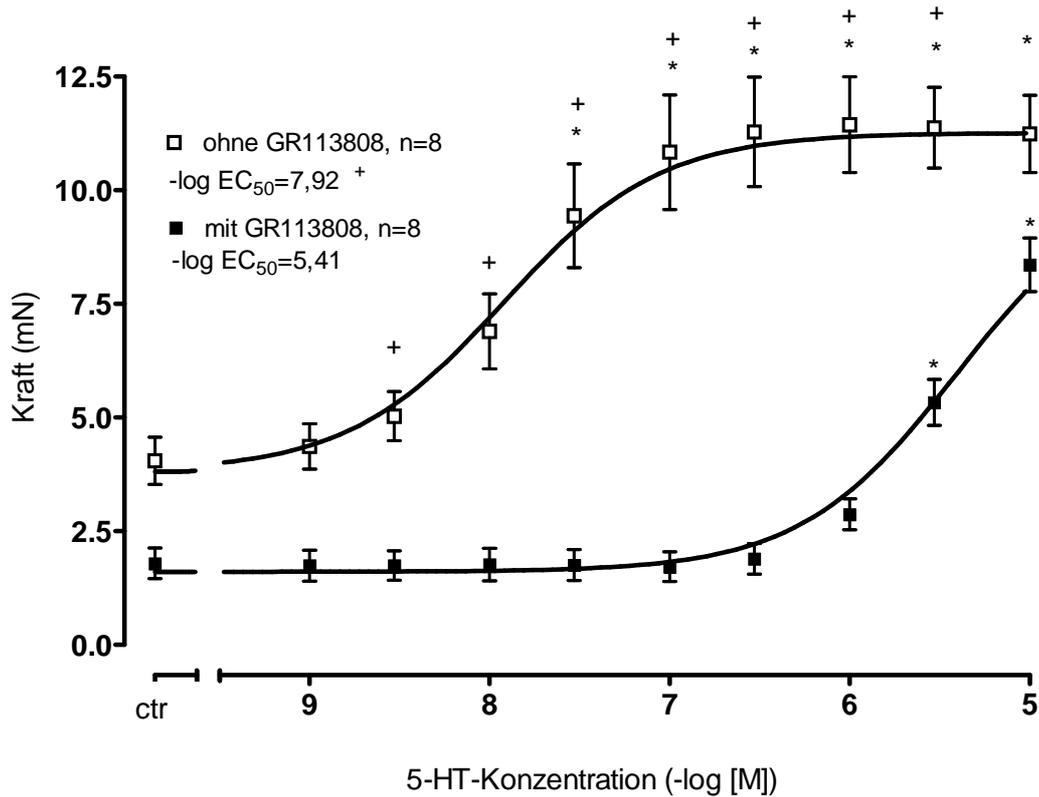


Abb. 14:
Konzentrations-Wirkungs-Kurven von 5-HT mit / ohne GR113808 an linken Vorhöfen von TG

Dargestellt sind die Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit 5-HT an elektrisch gereizten linken Vorhöfen von TG. Zu Beginn erfolgte eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve (KWK) mit 5-HT ohne GR113808 als Kontrolle. 5-HT wurde ausgespült und nach 30-minütiger Einwirkzeit von 10 nM GR113808 wurde eine weitere KWK mit 5-HT durchgeführt. Die Kontraktionskraft ist in mN angegeben. Es wurden 5-HT-Konzentrationen von 1 nM bis 10 μ M verwendet. * $p < 0,05$ vs. Kontrollwert (ctr); + $p < 0,05$ vs. mit GR113808.

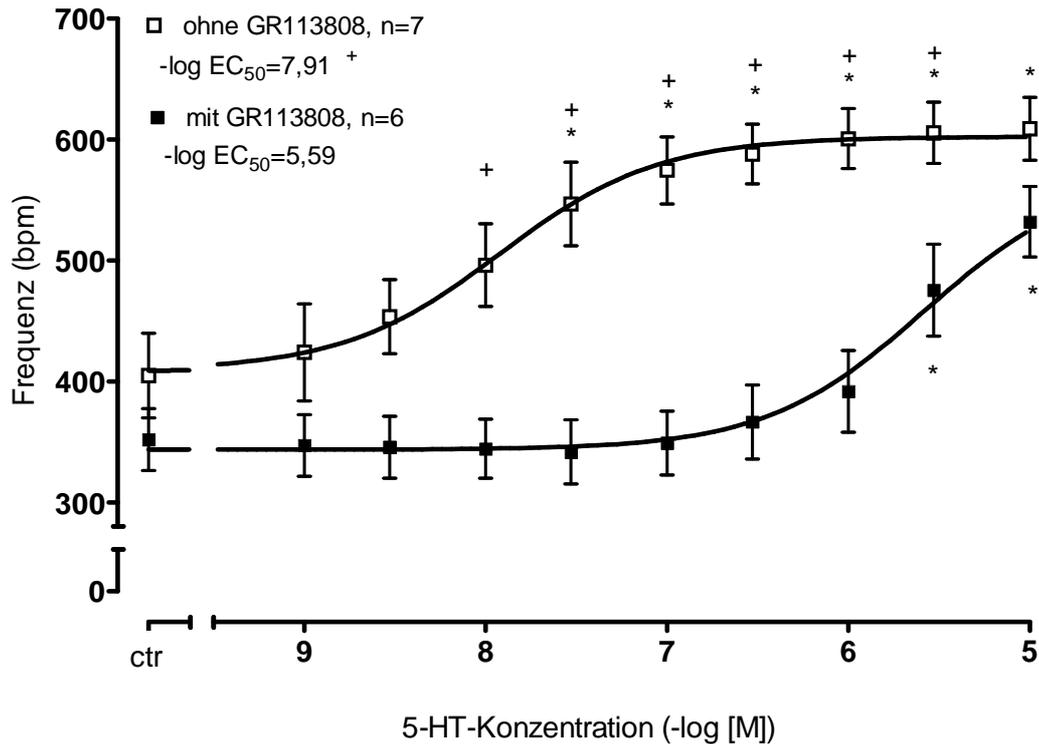


Abb. 15:
Konzentrations-Wirkungs-Kurven von 5-HT mit / ohne GR113808 an rechten Vorhöfen von TG

Dargestellt sind die Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit 5-HT an spontan schlagenden rechten Vorhöfen von TG. Zu Beginn erfolgte eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve (KWK) mit 5-HT ohne GR113808 als Kontrolle. Anschließend wurde 5-HT ausgespült und nach 30-minütiger Einwirkzeit von 10 nM GR113808 wurde eine weitere KWK mit 5-HT durchgeführt. Es werden die Frequenz in bpm und die $-\log EC_{50}$ -Werte angegeben. Es wurden 5-HT-Konzentrationen von 1 nM bis 10 μ M verwendet. * $p < 0,05$ vs. Kontrollwert (ctr); + $p < 0,05$ vs. mit GR113808

4.3.7 Protokoll 3 – Kokain

Im Anschluss an die erste Serotonin-Konzentrations-Wirkungs-Kurve wurden die Vorhöfe mit 30 μ M Kokain inkubiert. Nach 30 min Einwirkzeit erfolgte erneut eine Serotonin-KWK. Falls die Wiederaufnahme von 5-HT in das Vorhofgewebe eine funktionelle Bedeutung hätte, sollte die Zugabe eines selektiven 5-HT-Wiederaufnahme-Hemmers wie Kokain zu einer Linksverschiebung der 5-HT-KWK führen. Wie in den Abbildungen 16 und 17 ersichtlich, zeigte sich jedoch im Fall der linken Vorhöfe kein kokainbedingter Unterschied in der Wirkung von 5-HT. Die Gabe von Kokain beeinflusste die Wirkung von 5-HT auf die LA der TG nicht. Die $-\log EC_{50}$ -Werte der 5-HT-KWK linker transgener Vorhöfe betragen ohne vorherige

Kokaingabe 8,1 und unter Kokaineinfluss 7,97 ($p > 0,05$). Anders verhielt es sich mit den rechten Vorhöfen: Jedoch betrug die $-\log EC_{50}$ der 5-HT-KWK ohne Kokain 7,97 und 7,76 mit Kokain ($p < 0,05$). Die rechten Vorhöfe reagierten empfindlicher auf 5-HT ohne Zugabe von Kokain.

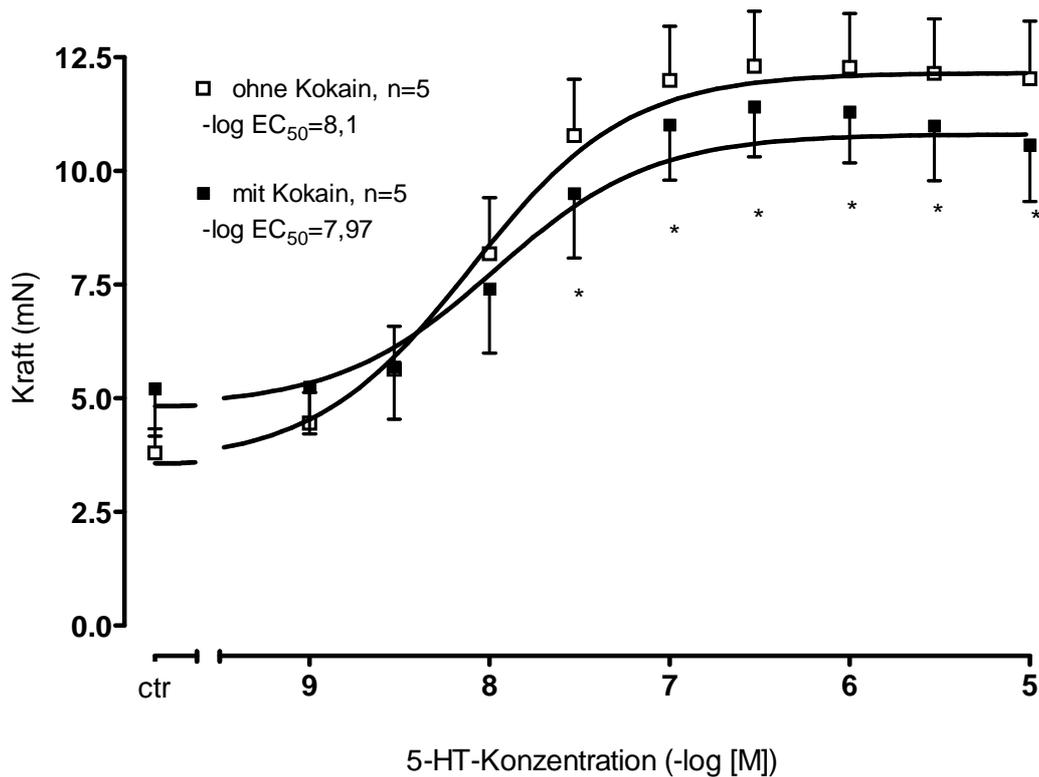


Abb. 16:
Konzentrations-Wirkungskurve von 5-HT mit / ohne Kokain an linken Vorhöfen von TG

Dargestellt sind die Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit 5-HT an elektrisch gereizten linken Vorhöfen von TG. Zu Beginn erfolgte eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve (KWK) mit 5-HT als Kontrolle. 5-HT wurde ausgespült und nach 30-minütiger Einwirkzeit von 30 μ M Kokain wurde eine weitere KWK mit 5-HT durchgeführt. Es werden die Kontraktionskraft in mN und die $-\log EC_{50}$ -Werte angegeben. Die 5-HT-Konzentrationen reichten von 1 nM bis 10 μ M. * $p < 0,05$ vs. Kontrollwert (ctr).

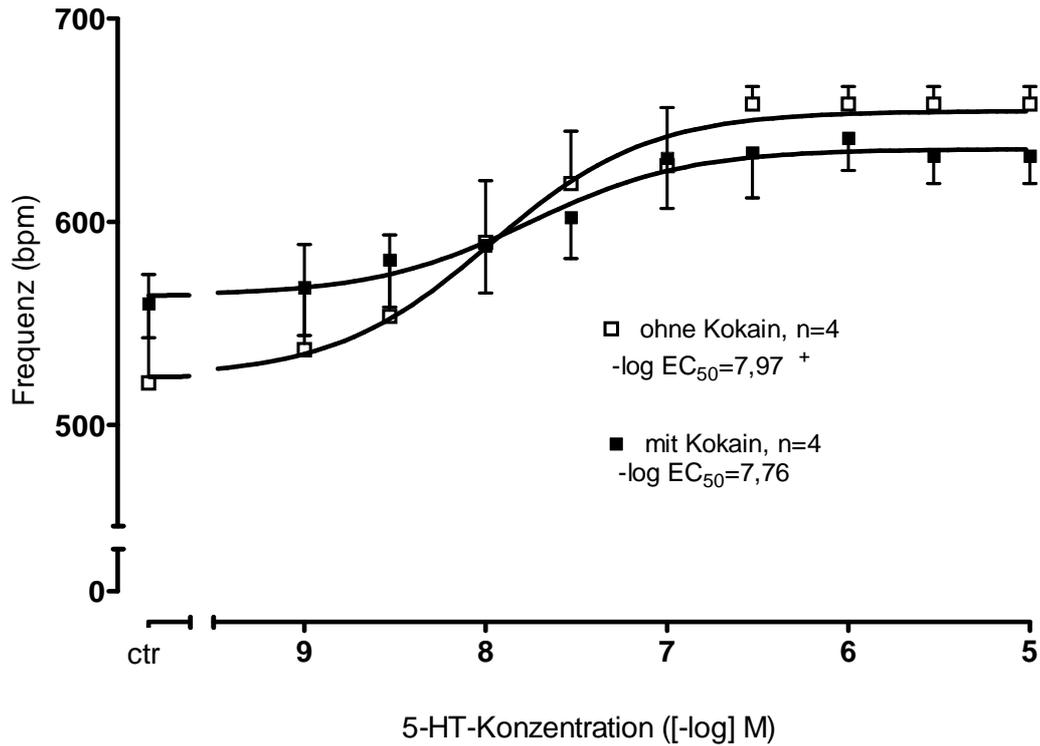


Abb. 17:

Konzentrations-Wirkungs-Kurve von 5-HT mit / ohne Kokain an rechten Vorhöfen von TG

Dargestellt sind die Konzentrations-Wirkungs-Kurven von 5-HT an spontan schlagenden rechten Vorhöfen von TG. Zu Beginn erfolgte eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve (KWK) mit 5-HT als Kontrolle. 5-HT wurde ausgespült und nach 30-minütiger Einwirkzeit von 30 μ M Kokain wurde eine weitere KWK mit 5-HT durchgeführt. Es werden die Frequenzen in bpm und die $-\log EC_{50}$ -Werte angegeben. Die 5-HT-Konzentrationen reichten von 1 nM bis 10 μ M. Kontrollwert (ctr); ⁺ $p < 0,05$ vs. mit Kokain

4.3.8 Protokoll 4 – Reserpin

Um den Einfluss von möglicherweise endogen freigesetzten Katecholaminen auf die Wirkungsweise von 5-HT zu untersuchen, wurden je 5 WT und TG mit Reserpin i. p. vorbehandelt. Hierbei handelt es sich um ein Verfahren, um endogene Katecholaminspeicher in Versuchstieren zu entleeren.

Wie bereits in 3.4.8 beschrieben, wurde den Versuchstieren 16 Stunden vor Versuchsbeginn 0,5 mg Reserpin i.p. /kg Körpergewicht (O’Leary et al., 2007) gespritzt, um die endogenen Katecholaminspeicher zu leeren. Durch die gleichzeitig gehemmte Wiederaufnahme der Katecholamine stehen diese bei Sympathikusaktivierung nicht mehr für eine Freisetzung zur Verfügung. Im Versuchsverlauf wurde abermals eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve mit 5-HT durchgeführt, womit untersucht werden sollte, ob endogen freigesetzte Katecholamine einen Einfluss auf die Vorhöfe haben und somit die Wirkung des 5-HT beeinflussen.

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven unterschieden sich nicht von den in 4.2.1 beschriebenen Kurven. Die linken Vorhöfe transgener Tiere wiesen einen $-\log EC_{50}$ -Wert von 7,9 und die rechten von 8,2 auf.

Der Erfolg der Reserpinisierung wurde mittels 10 mM Tyramin an den Vorhofpräparaten getestet. Ein Anstieg von Frequenz bzw. Kontraktionskraft hätte auf eine unzureichende Reserpinisierung hingewiesen (siehe Abb. 18).

Ferner wurden die Katecholaminspiegel in zuvor über 10 mit Kochsalzlösung perfundierten Herzen reserpinisierter und unbehandelter Versuchstiere mittels HPLC gemessen (siehe Abb. 19 a und b). Die Katecholaminspiegel waren im reserpinisierten Herzgewebe von WT und TG im Vergleich zum unbehandelten Gewebe reduziert. Das Ventrikelgewebe von unbehandelten TG enthielt 2600 pg/mg ww Tryptophan (TRP), 254 pg/mg ww 5-HT, 566 pg/mg ww Noradrenalin (NA) und 44 pg/mg ww Adrenalin (A). Die Vorbehandlung durch Reserpin reduzierte den Tryptophangehalt auf 2250 pg/mg ww (-13,5%) und Serotonin auf 44 pg (-82,7%). Der Adrenalin- und Noradrenalinegehalt betrug beim reserpinisierten TG nur noch nicht quantifizierbare Spuren (A) bzw. 1,2 pg/mg ww (-99,8 %, NA). Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 19 a und b dargestellt.

Vergleichbare Ergebnisse zeigte die Katecholaminquantifizierung von unbehandelten und reserpinisierten WT (ohne Abb.).

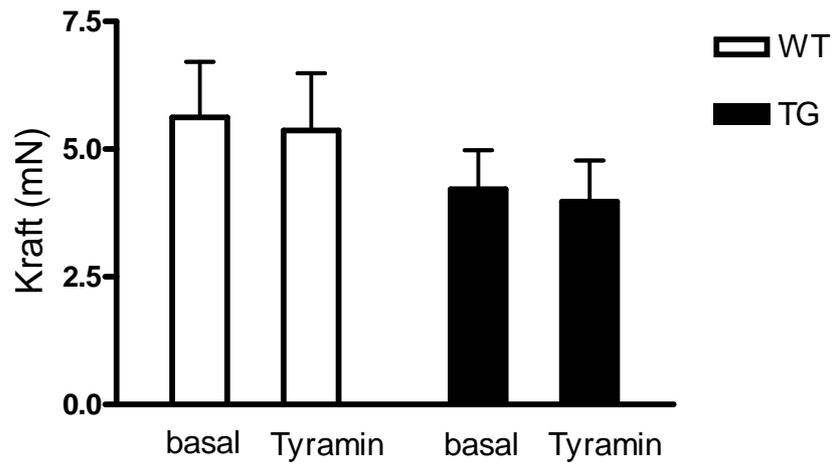
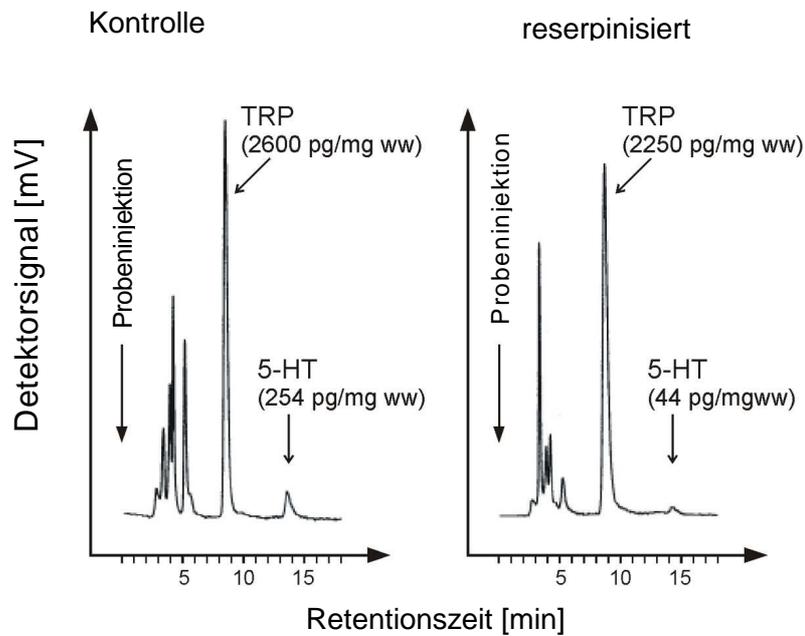


Abb. 18:
Kontraktionskraftmessungen an linken Vorhöfen reserpinisierter Tiere mit Tyramin

Es wurden Messungen der Kontraktionskraft in mN an elektrisch gereizten linken Vorhöfen vorgenommen. Die Versuchstiere wurden 16 h vor Versuchsbeginn mit 0,5 mg/ kg Körpergewicht Reserpin i.p. behandelt. Die Qualität der Reserpinisierung wurde mit 10 μ M Tyramin überprüft. Bei unbehandelten Tieren würde man eine deutliche Steigerung der Kontraktionskraft finden.

a



b

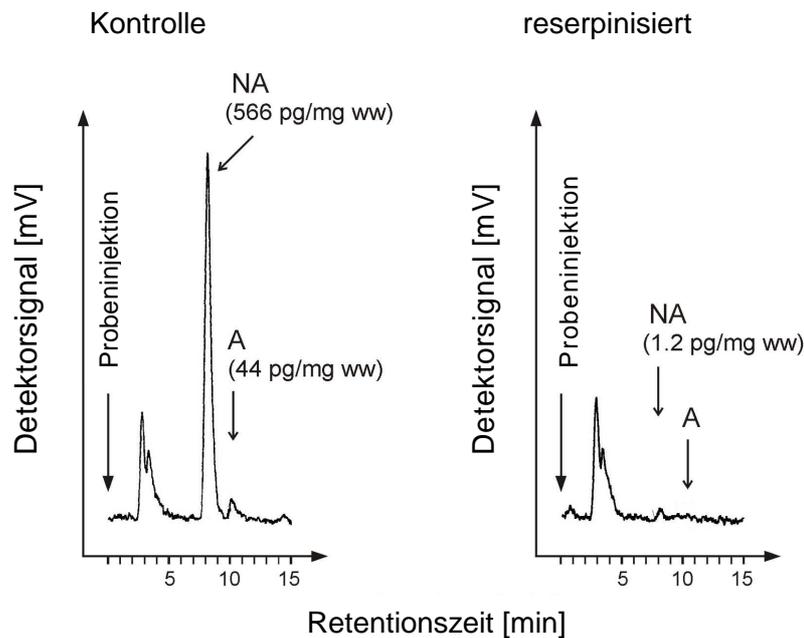


Abb. 19 a und b:

Messung von Adrenalin (A), Noradrenalin (NA), Tryptophan (TRP) und 5-HT in blutfreien Ventrikeln von zuvor reserpinisierten Versuchstieren und Kontrolltieren mittels HPLC

Es wurden die Konzentrationen von A und NA sowie TRP und 5-HT in pg / mg ww mittels HPLC ermittelt. 16 h vor Versuchsbeginn wurde einem Teil der Versuchstiere 0,5 mg Reserpin i.p. /kg Körpergewicht gespritzt. Die Messungen erfolgten an blutfreien Ventrikelgeweben.

Die Abbildung a zeigt die Konzentrationen von TRP und 5-HT und die Abbildung b jene von A und NA im Ventrikelgewebe. Es sind jeweils die Ergebnisse der Versuchstiere unter Reserpinbehandlung sowie die Ergebnisse unter Kontrollbedingungen dargestellt.

4.3.9 Protokoll 5 – IBMX

Um weitere Informationen über die Wirkung des Serotonins auf humane 5-HT₄-Rezeptoren zu erhalten, wurde die KWK von 5-HT unter Basalbedingungen mit jener unter Phosphodiesterase-Hemmung mit 1-Methyl-3-isobutylxanthin (IBMX) verglichen (siehe Abb. 20 und 21).

Dazu erfolgte im zweiten Schritt, nach der ausgewaschenen 5-HT-KWK, die Inkubation der Vorhöfe mit 3 µM des Phosphodiesterase-Hemmers IBMX über fünf Minuten gefolgt von einer zweiten 5-HT-KWK.

Die $-\log EC_{50}$ -Werte der 5-HT-KWK der LA lagen bei 8,08 unter Basalbedingungen und unter IBMX-Einfluss bei 8,3 ($p < 0,05$). Die $-\log EC_{50}$ -Werte der RA betragen unter IBMX 8,06 und unter Basalbedingungen 7,87 ($p < 0,05$).

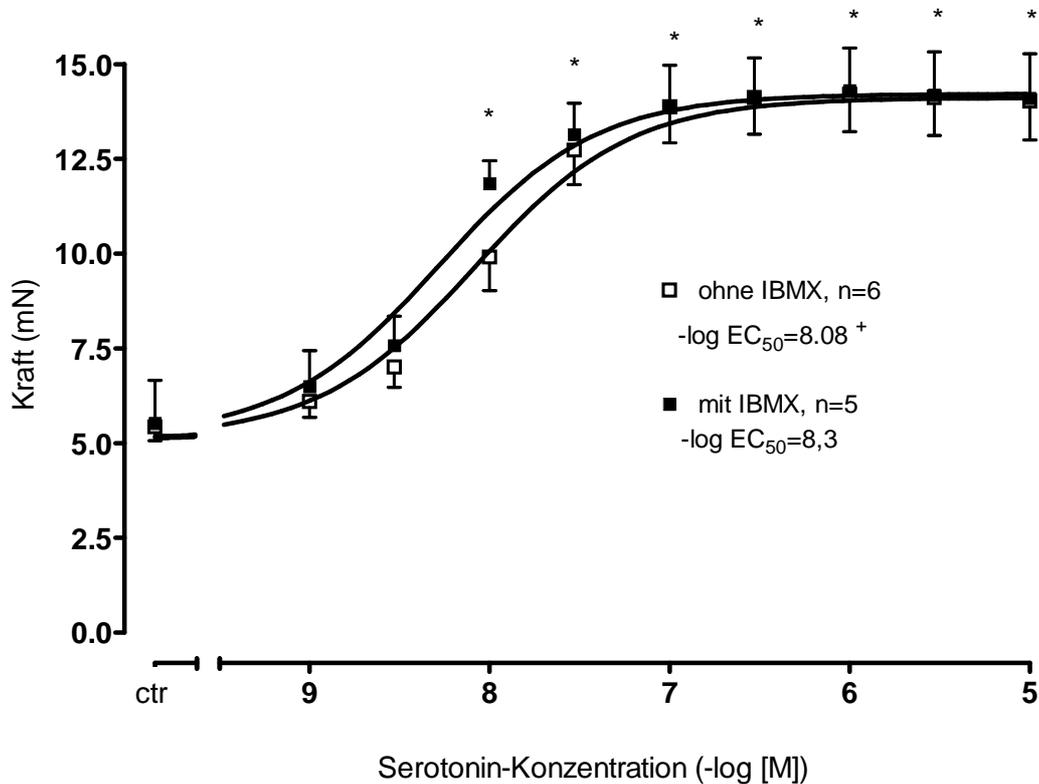


Abb. 20:
Konzentrations-Wirkungskurven mit 5-HT mit / ohne IBMX an linken Vorhöfen von TG

Dargestellt sind die Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit 5-HT an elektrisch gereizten linken Vorhöfen von TG. Zu Beginn wurde eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve (KWK) mit 5-HT zur Kontrolle durchgeführt. Danach folgte, nach 5-minütiger Einwirkzeit von 3 μ M IBMX, eine weitere KWK mit 5-HT. Es werden die Kontraktionskraft in mN und die $-\log EC_{50}$ -Werte angegeben. Es wurden 5-HT-Konzentrationen von 1 nM bis 10 μ M verwendet. * $p < 0,05$ vs. Kontrollwert (ctr); + $p < 0,05$ vs. mit IBMX

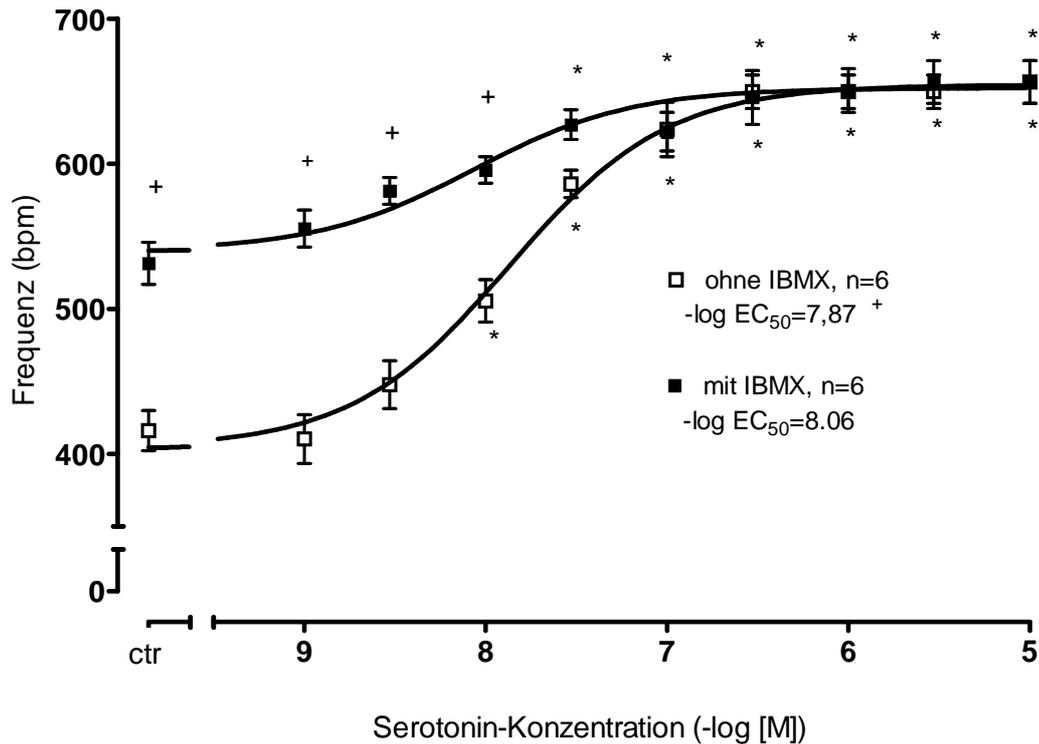


Abb. 21:

Konzentrations-Wirkungskurven mit 5-HT mit / ohne IBMX an rechten Vorhöfen von TG

Dargestellt sind die Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit 5-HT an spontan schlagenden rechten Vorhöfen von TG. Zu Beginn wurde eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve (KWK) mit 5-HT zur Kontrolle durchgeführt. Danach folgte, nach 5-minütiger Einwirkzeit von 3 μ M IBMX, eine weitere KWK mit 5-HT. Es werden die Frequenz in bpm und die $-\log EC_{50}$ -Werte angegeben. Es wurden 5-HT-Konzentrationen von 1 nM bis 10 μ M verwendet. * $p < 0,05$ vs. Kontrollwert (ctr), + $p < 0,05$ vs. mit IBMX

4.4 Phospholamban-Phosphorylierung

Um weitere Informationen über den Einfluss der Überexpression von 5-HT_{4a}-Rezeptoren auf die Versuchstiere zu erhalten, wurde die Phosphorylierung von Phospholamban (PLB) untersucht. Das Protein PLB besitzt mit Serin-16 (PLB-PS16) und Threonin-17 (PLB-PT17) zwei Phosphorylierungsstellen. Der Nachweis von Calsequestrin diente als Beladungskontrolle für die Gelelektrophorese.

Der positiv inotrope Effekt dieses Tiermodells wird wahrscheinlich durch erhöhte cAMP-Spiegel und einer damit verbundenen gesteigerten Aktivität der PKA induziert. Ein entscheidender Mechanismus hierbei stellt die Phosphorylierung des Phospholambans dar, welches als regulierendes Protein der SERCA fungiert. Es

wurde geprüft, ob die gesteigerte Inotropie mit einer vermehrten Phosphorylierung des PLB korrelierte.

Am Ende der Kontraktionskraftexperimente wurden 10 μM 5-HT auf einen Teil der rechten sowie linken Vorhöfe von WT und TG gegeben, der andere Teil wurde als Kontrolle untersucht. Diese Konzentration wurde gewählt, da sie in den Konzentrations-Wirkungs-Kurven (Abb. 5 und 6) die Kontraktionskraft der TG maximal steigerte. Die Inkubationszeit wurde mit 5 min so gewählt, dass sich die maximale Kraft entwickeln konnte. Sofort nach Erreichen der Maximalkraft bzw. -frequenz wurden die Vorhöfe in flüssigem Stickstoff gefroren, um den Zustand der Phosphorylierung zu konservieren. Im Folgenden wurden die Proben so aufgearbeitet, dass eine Dephosphorylierung nicht auftrat (Hemmung aller Proteinphosphatasen durch SDS). Die cAMP-abhängige PLB-Phosphorylierung an Serin16 war wie die PLB-Phosphorylierung an Threonin17 erhöht (Abb. 22). Dies unterstützt die Vermutung, dass der überexprimierte 5-HT_{4a}-Rezeptor die gleiche Kaskade wie der endogene Rezeptor des menschlichen Herzens nutzt. Im Einklang mit der fehlenden Kontraktionskraftänderung der WT steigerte sich hier auch der Phosphorylierungszustand von PLB nicht (Abb. 22).

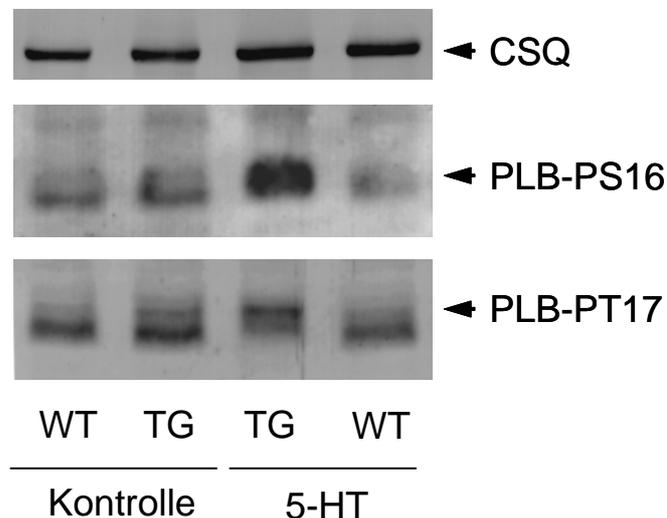


Abb. 22:
Proteinexpression von Calsequestrin und Phosphorylierung von PLB an Serin16 sowie Threonin17

Dargestellt sind die Proteinexpression von Calsequestrin (CSQ) und die Phospholambanphosphorylierung an Serin16 (PLB-PS16) sowie Threonin17 (PLB-PT17). Die Homogenate linker Vorhöfe von WT und TG wurden entweder mit 10 μM 5-HT behandelt oder unter Kontrollbedingungen in die Untersuchungen einbezogen.

5. Diskussion

Im menschlichen Herz kann 5-HT an 5-HT₄-Rezeptoren binden und über G_s-Proteine die Adenylatzyklase aktivieren sowie über G_{βγ}-Proteine einen L-Typ Ca²⁺-Kanal öffnen (Pindon et al., 2002). Grundsätzlich wirkt 5-HT über 5-HT₄-Rezeptoren im Herz positiv inotrop und chronotrop. Ferner kann 5-HT die atriale Relaxationszeit verkürzen und Vorhofflimmern auslösen oder verstärken (Kaumann und Sanders, 1994). Durch erhöhte Plasmaspiegel von 5-HT werden endogene 5-HT-Rezeptoren stimuliert und direkte und indirekte Effekte hervorgerufen. Beispiele bei denen die 5-HT-Plasmaspiegel erhöht sind, stellen Verschluss der Koronararterien, chronischer Hypertonus, Herzinsuffizienz, hohes Lebensalter und Karzinoidtumore dar (Übersicht von Kaumann und Levy, 2006). Durch die erhöhten Plasmakonzentrationen von 5-HT können Arrhythmien verursacht oder verschlimmert werden und Herzklappenerkrankungen auftreten (Robiolo et al., 1995). Wie einleitend beschrieben, nutzen 5-HT₄-Rezeptoren zumindest teilweise gleiche Signalwege wie β-Rezeptoren. Über das G-Protein G_s wird die Adenylatcyclase aktiviert und vermehrt cAMP gebildet. Dies führt zu einer Aktivitätssteigerung der Proteinkinase A und zur Phosphorylierung verschiedener regulierender Proteine (z. B. Phospholamban, Troponin-Inhibitor und Ryanodin-Rezeptoren). Ziel dieser Arbeit war es, ein neues transgenes Tiermodell mit herzspezifischer Überexpression des humanen 5-HT₄-Rezeptors zu charakterisieren.

5.1 Derzeitige Modelle zur Untersuchung von kardialen 5-HT₄-Rezeptoren

Bisher gab es kein vollkommen geeignetes Tiermodell, um humane atriale 5-HT₄-Rezeptoren zu untersuchen. Oft wurde das Schwein als Modell für humane 5-HT₄-Rezeptoren verwendet, da diese Spezies über eine ähnliche Verteilung von 5-HT-Rezeptoren verfügt. Jedoch bestehen Unterschiede in der Sequenz zwischen humanen und vom Schwein stammenden Rezeptoren, so dass dieses Modell nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragen werden kann (Kaumann, 1990). Einen weiteren Nachteil stellen die im Vergleich zu Mäusen hohen Kosten von Schweinen als Versuchstiere dar.

Wir und auch andere Arbeitsgruppen (Kaumann und Sanders, 1994) versuchten auf Grund dessen humanes Gewebe von rechten und linken Vorhöfen, welches nach Einwilligung während Operationen entnommen wird, zu verwenden. Jedoch ist menschliches Herzgewebe nicht immer verfügbar.

Für Versuche am spontan schlagenden Herz mit intaktem Sinusknoten stehen natürlich weniger menschliche Herzen zur Verfügung und es ist folglich schwieriger, derartige Präparate zur Untersuchung heranzuziehen.

5.2 5-HT_{4a}-Rezeptor überexprimierende Mäuse

Um die oben genannte Problematik zu umgehen, haben wir ein transgenes Tiermodell mit herzspezifischer Überexpression des humanen 5-HT₄-Rezeptors erzeugt und wollten vor allem dessen atrialen Phänotyp näher charakterisieren. Humane 5-HT_{4a}-Rezeptoren wurden unter Kontrolle des α -MHC-Promotors in den Herzen transgener Mäuse exprimiert. Zwar besitzt der Promotor schon während der Embryogenese eine geringe transkriptionelle Aktivität, jedoch ist diese auf die Vorhöfe beschränkt. *Post partum* steigert sich die Aktivität des α -MHC-Promotors hingegen um ein Vielfaches und verlagert sich auch auf die Ventrikel (Gulick et al., 1991; Ng et al., 1991). Somit wird gewährleistet, dass das Transgen wahrscheinlich keinen Einfluss auf die embryonale Entwicklung der Ventrikel nehmen kann.

Wir haben den 5-HT_{4a}-Rezeptor aus folgenden Gründen ausgewählt. Zum einen wurde er als Erster kloniert und ist damit gut untersucht. Zum anderen ist er neben dem 5HT_{4b}-Rezeptor die am häufigsten vorkommende Isoform des 5-HT₄-Rezeptors im menschlichen Herzen (Blondel et al., 1997, 1998). Er wird neben dem 5-HT_{4b}-Rezeptor auch in anderen Geweben wie Gehirn, Herz, Ösophagus, Dünn- und Dickdarm exprimiert (Bach et al., 2001). Beide Subtypen des 5-HT₄-Rezeptors weisen vergleichbare Bindungseigenschaften von 5-HT-Agonisten und -Antagonisten auf, und beide aktivieren nach 5-HT-Bindung ähnlich stark die Adenylatcyclase (Blondel et al., 1998; Bach et al., 2001). Jedoch zeigte sich im insuffizienten menschlichen Herz, im Vergleich zum gesunden Herz, eine vierfache Erhöhung der ventrikulären 5-HT_{4b}-Rezeptor mRNA (Brattelid et al., 2004b).

Verschiedene Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen auf aktive 5-HT_{4a}-Rezeptoren im Herzgewebe transgener Mäuse und somit auf eine erfolgreiche Etablierung des transgenen Tiermodells hin. So bewirkte 5-HT eine Steigerung der Kontraktionskraft der linken Vorhöfe (siehe Abb. 5), vergleichbar der einer β -adrenergen Stimulation (siehe Tab. 6). An WT-Vorhöfen zeigte 5-HT keine Wirkung. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Vermutung, dass die positiv inotrope Wirkung von 5-HT auf Präparate der TG tatsächlich via 5-HT₄-Rezeptoren vermittelt wird.

Die rechten Vorhöfe der TG zeigten durch die Frequenzerhöhung (siehe Abb. 6) ebenfalls eine deutliche Reaktion auf 5-HT. Weiterhin stützt folgender Fakt die Annahme: Sowohl die positiv inotropen als auch chronotropen Effekte von 5-HT an TG-Vorhöfen ließen sich durch zwei spezifische 5-HT₄-Rezeptor Antagonisten blockieren. Da die Vorbehandlung der Versuchstiere mit Reserpin keine Änderung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit 5-HT bewirkte, können durch 5-HT freigesetzte endogene Katecholamine als Ursache für die positiv inotropen und chronotropen Effekte ausgeschlossen werden. Unter Kontrollbedingungen zeigten die rechten Vorhöfe der TG eine signifikant höhere Frequenz als die der WT. Eine Ursache hierfür könnte in einer erhöhten endogenen Herzfrequenz liegen. Dies konnte jedoch bereits durch die Untersuchung mittels transthorakaler Echokardiographie von anästhesierten WT- und TG-Tieren ausgeschlossen werden (Gergs et al., 2010). Möglicherweise stimuliert bei der Präparation aus den Thrombozyten freigesetztes 5-HT die myokardialen 5-HT_{4a}-Rezeptoren. Um dies zu verifizieren, müssen weitere Untersuchungen folgen.

In einer 2004 erschienenen Studie konnten Effekte von 5-HT₄-Rezeptoren durch 5-HT-Bindung im Ventrikelgewebe von herzinsuffizienten Patienten sowie im Ventrikelmyokard des Schweines nachgewiesen werden (Brattelid und Qvigstad, 2004). Dabei führte 5-HT zu einer erhöhten Kontraktionskraft, einer schnelleren Relaxationsgeschwindigkeit und einer gesteigerten Neigung zu Arrhythmien. Diese Ergebnisse konnten nach vorheriger Gabe des unspezifischen Phosphodiesterase-Hemmers IBMX erzielt werden. Die Ursachen der bis dahin fehlenden Antwort des Ventrikelmyokards auf 5-HT könnten demnach in einer geringen 5-HT₄-Rezeptordichte und einer raschen Hydrolyisierung von cAMP durch die PDE liegen (Kaumann und Levy, 2006). IBMX bewirkt in dieser Arbeit keine weitere Zunahme der maximalen Kontraktionskraft und der Herzfrequenz von linken bzw. rechten TG-Vorhöfen, wie es theoretisch hätte erwartet werden können. Das Maximum der Parameter scheint bereits durch die 5-HT Stimulation erreicht und eine weitere Steigerung kaum möglich. Jedoch regieren die linken und rechten Vorhöfe der TG jeweils empfindlicher (siehe Abbildung 20 und 21) auf 5-HT nach Vorbehandlung mit IBMX. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Brattelid et al., 2004, Qvigstad et al., 2005a), die eine Verstärkung der 5-HT Wirkung durch IBMX (Linksverschiebung der 5-HT-KWK) beschrieben hatten.

Leider ist bis jetzt noch keine genaue Angabe zur Rezeptordichte der 5-HT_{4a}-Rezeptoren (z.B. durch Bindungsversuche) im Myokard der TG-Mäuse möglich. Aufgrund der ausgeprägten Effekte von 5-HT kann vermutet werden, dass die 5-HT_{4a}-Rezeptordichte im menschlichen Vorhof (etwa 4 fmol/mg, Kaumann et al., 1996) und in

den Vorhöfen von Schweinen (etwa 3 fmol/mg Protein, Kaumann et al., 1995) geringer als bei den transgenen Mäusen ist.

Die WT-Vorhöfe zeigten nach zuvor gegebenen IBMX (3 μ M) ebenfalls keine Reaktion auf zugegebenes 5-HT (ohne Abbildung). Die Zugabe von IBMX selbst bewirkte bei den linken Vorhöfen von TG keine Steigerung der Kontraktionskraft, jedoch eine Frequenzsteigerung der rechten TG-Vorhöfe. Damit scheinen die Sinusknoten sensibler auf einen c-AMP-Anstieg durch IBMX zu reagieren. Da allerdings die rechten WT-Vorhöfe nicht auf IBMX reagierten, könnte dies eine vermeintlich höhere Sensibilität der rechten Vorhöfe von TG auf IBMX bedeuten. Wahrscheinlicher jedoch entstanden die höheren Frequenzen aus der zuvor durchgeführten 5-HT-KWK. Dies muss in nachfolgenden Arbeiten weiter untersucht werden.

Von klinischer Relevanz erscheint, dass 5-HT-Agonisten und PDE-Hemmer sehr vorsichtig in Kombination eingesetzt werden sollten, um arrhythmogene Effekte zu vermeiden.

Der Katecholamin-Wiederaufnahmehemmer Kokain vermochte die Wirkung von 5-HT über 5-HT₄-Rezeptoren auf die TG nicht ändern. Die rechten Vorhöfe der TG reagierten sogar empfindlicher auf 5-HT ohne den Einfluss von Kokain. Dies sollte jedoch bei geringer Anzahl der Versuche erneut verifiziert werden.

Auch unter Einfluss von Kokain reagierten die WT-Vorhöfe nicht auf 5-HT (ohne Abbildung). Damit konnten weder durch die Hemmung der PDE durch IBMX, noch durch Wiederaufnahmehemmung von 5-HT funktionelle 5-HT₄-Rezeptoren in den WT-Vorhöfen dargestellt werden.

Vergleicht man die Ergebnisse der invasiven hämodynamischen Untersuchungen an den Versuchstieren mit den Kontraktionskraft- und Frequenzmessungen an den Herzvorhöfen, ist der Effekt von 5-HT auf die 5-HT₄-Rezeptoren *in vitro* eindeutiger und ausgeprägter (siehe 4.2). Eine Erklärung hierfür könnte in der isolierten Untersuchung der Vorhofpräparate *in vitro* liegen. *In vivo* können verschiedene physiologische Mechanismen den Organismus beeinflussen. 5-HT bewirkt *in vivo* zusätzlich eine Vasokonstriktion (auch der Koronararterien, Hoyer et al., 1994) und eine Steigerung der Thrombozytenaggregation (Takano, 1995). Neben zahlreichen zentralnervösen Funktionen wie Lernen, Gedächtnis, Schlaf, Essverhalten und Stimmungslage, spielt 5-HT auch bei der Tonusregulation der glatten Muskulatur des Gastrointestinaltraktes und bei der Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde eine wichtige Rolle (Wilkinson und Dourish, 1991; Popova et al., 2006). Die beeinflussenden Faktoren von

5-HT *in vivo* können bei der Untersuchung der Herzvorhöfe *in vitro* vernachlässigt werden.

5.3 PLB-Phosphorylierung

Die Stimulation von 5-HT₄-Rezeptoren im menschlichen Herz führt zu einer gesteigerten Aktivität der Adenylatcyclase und damit zu erhöhten cAMP-Spiegeln im Myokard. In Folge der erhöhten cAMP-Spiegel werden cAMP-abhängige Proteinkinasen aktiviert, wodurch regulierende Proteine wie PLB und TnI phosphoryliert werden (Kaumann und Levy, 2006; Gergs et al., 2009). Damit übereinstimmend, wurde eine 5-HT induzierte Phosphorylierung des Phospholambans am Serin-16 und Threonin-17 in den transgenen Vorhöfen gefunden. Diese konnte nicht in den WT-Vorhöfen nachgewiesen werden. Genau jene Phosphorylierung wird meist herangezogen, um die positiv inotrope und relaxierende Wirkung unter β -adrenerger Stimulation zu erklären (Simmerman und Jones, 1998; MacLennan und Kranias, 2003). Durch die PLB-Phosphorylierung wird während der Diastole mehr Ca²⁺ durch die SERCA in das SR transportiert. Dadurch verkürzt sich die Relaxationszeit und es kann in der folgenden Systole mehr Ca²⁺ freigesetzt und damit die Kontraktionskraft gesteigert werden.

5.4 Vergleich mit β_1 -Adrenozeptor-überexprimierenden Mäusen

Die Stimulation von kardialen 5-HT-Rezeptoren führt zu erhöhten cAMP-Spiegeln und zur Aktivierung der damit verbundenen Signalkaskade. Wie unter Stimulation von β_1 -Adrenozeptoren werden die Folgen wie Tachykardien, erhöhte Neigung zu Arrhythmien sowie positive Inotropie und damit verbundener gesteigerter Sauerstoffverbrauch des Myokards häufig als nachteilig für das Herz bewertet. Dementsprechend leiden β_1 -Adrenozeptor-überexprimierende Mäuse unter Herzhypertrophie, Herzinsuffizienz und Myokardfibrosen verbunden mit einer erhöhten Mortalität (Engelhardt et al., 1999, 2001). Jedoch zeigt unser Modell keinerlei Anzeichen für eine Herzhypertrophie. Das relative Herzgewicht war nicht erhöht und die Myokardpräparate zeigten keine histologischen Auffälligkeiten (ohne Abbildung, Gergs et al., 2010). Dieses Ergebnis überrascht etwas, da β_1 -Adrenozeptoren und 5-HT₄-Rezeptoren wenigstens teilweise den gleichen *second messenger* cAMP und die damit induzierte Signalkaskade über die cAMP-abhängige Proteinkinase A nutzen. Es ist nicht bekannt,

warum sich die Phänotypen der transgenen Mäuse, trotz der Ähnlichkeiten in der Signaltransduktion, derart unterscheiden. Eine Erklärung könnten andere zusätzlich bzw. alternativ genutzte Signalwege von 5-HT₄-Rezeptoren darstellen. Zum Beispiel können 5-HT₄-Rezeptoren via G_{βγ} direkt an L-Typ Ca²⁺-Kanäle und andere Ionen-Kanäle koppeln und so deren Öffnungswahrscheinlichkeit erhöhen (Cardenas et al., 1997; Bickmeyer et al., 2002; Pindon et al., 2002;). Ferner können sie das G-Protein G₁₃ (Ponimaskin et al., 2002) sowie AKAP100 (Niu et al., 2001) aktivieren und die Aktivität von Phosphodiesterasen und damit den cAMP-Spiegel senken. Weiterhin könnten die freien endogenen 5-HT-Spiegel zu gering sein, um eine chronische Stimulation der 5-HT₄-Rezeptoren hervorzurufen. Es müssen weitere Experimente folgen, um diesen Aspekt genauer zu untersuchen.

Die maximalen positiv inotropen und chronotropen Effekte von 5-HT und Isoprenalin auf die TG waren vergleichbar (Tab. 6).

Zudem unterschieden sich die -log EC₅₀ der RA. Die RA der TG und der WT reagierten sensibler auf die Stimulation der β-Adrenozeptoren mit Isoprenalin als auf Stimulation der 5-HT_{4a}-Rezeptoren. Verantwortlich hierfür könnten Interaktionen zwischen Isoprenalin und dem 5-HT_{4a}-Rezeptor sein. Demgegenüber steht die höhere Empfindlichkeit der LA von TG auf 5-HT verglichen mit Isoprenalin (siehe 4.3.3). Dies muss durch weitere Experimente untersucht werden. Es zeigt sich zumindest, dass die ähnlichen Signaltransduktionswege beider Substanzen nahezu identische Maxima von Kontraktionskraft bzw. Herzfrequenz ermöglichen.

5.5 Arrhythmien

Unter basalen Bedingungen, d. h. ohne pharmakologische Beeinflussung, waren gehäuft Arrhythmien in isolierten Vorhofpräparaten der 5-HT_{4a}-Rezeptor überexprimierenden Herzen feststellbar (siehe Tab. 7). Dabei wiesen jedoch lediglich die linken Vorhöfe der TG signifikant häufiger spontane Arrhythmien auf. Obwohl auch bei den rechten Vorhöfen der TG häufiger Arrhythmien auftraten, konnte keine statistische Signifikanz festgestellt werden. Dies könnte auf die hohe Sensibilität des Sinusknotens zurückzuführen sein.

Die arrhythmogene Wirkung von 5-HT steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Kaumann et al., 1990). Die Arrhythmien könnten durch ein Ca²⁺-Überangebot im sarkoplasmatischen Retikulum des Myokards ausgelöst werden. Durch gesteigerte Phosphorylierung von Phospholamban wird vermehrt Ca²⁺ in das SR transportiert, was beispielsweise zu Nachdepolarisationen führen könnte (Bers, 2007).

Auch im Zuge dieser Experimente konnte nach 5-HT induzierter Aktivierung der 5-HT_{4a}-Rezeptoren eine gesteigerte Phosphorylierung von PLB in TG-Vorhöfen gefunden werden. Ebenso könnte eine 5-HT-induzierte Verkürzung der Refraktärzeit eine Rolle spielen, was die Entstehung von Reentry-Tachyarrhythmien begünstigen kann (Yusuf et al., 2003). Die Neigung zu Arrhythmien unter 5-HT wurde ebenfalls bei menschlichen Vorhofpräparaten (rechtes Atrium) gefunden, welche während Bypass-Operationen entnommen wurden (Kaumann et Sanders, 1994; Sanders et al., 1995).

Bei 5-HT induzierten Arrhythmien müssen prinzipiell die Plasmakonzentration von 5-HT und natürlich die 5-HT-Rezeptordichte und deren Aktivität in die Überlegungen einbezogen werden. Zum Beispiel besaßen Patienten mit chronisch arteriellem Hypertonus, im Vergleich zu normotonen Patienten, eine erhöhte Plasmakonzentration von 5-HT. Ursächlich hierfür werden eine gesteigerte Sekretion und eine reduzierte Wiederaufnahme von 5-HT in die Thrombozyten angesehen (Biondi et al., 1984; Yusuf et al., 2003). Mit zunehmendem Alter steigt die 5-HT-Konzentration in den Thrombozyten, da sie 5-HT zunehmend aufnehmen (Gleerub et al., 1988). Weiterhin änderte sich bei Patienten mit Vorhofflimmern die Expression der mRNA von 5-HT₄-Rezeptoren. So wurde einerseits eine verminderte mRNA-Expression in Vorhöfen von Patienten mit chronischem Vorhofflimmern beschrieben (Grammer et al., 2001). Andererseits zeigten kürzlich veröffentlichte Ergebnisse eine gesteigerte Expression von 5-HT₄-Rezeptor-mRNA (Lezoualc'h et al., 2007). Trotz der Gegensätzlichkeit dieser Resultate weisen sie doch auf eine Beteiligung der 5-HT₄-Rezeptoren an der Entstehung von Arrhythmien im menschlichen Herzen hin. Relevant für die Entstehung der atrialen Arrhythmien erscheinen folgende Mechanismen: 5-HT aktiviert cAMP und führt, elektrophysiologisch gesehen, zu einer gesteigerten Durchlässigkeit des L-Typ Ca²⁺-Kanals und damit zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration. Außerdem wird der I_f-Kanal, durch Bindung von cAMP an dessen α -Untereinheit und folgender Hyperpolarisation, aktiviert (Ophhof et al., 1998; Pino et al., 1998; Barbuti et al., 2008). Dies kann über β_1 -, β_2 - und 5-HT₄-Rezeptoren geschehen und erhöht die Aktivität dieses Kationenkanals (Na⁺ und K⁺) durch Verschiebung des Aktivierungspotentials zu weniger negativen Werten (Lonardo et al., 2005).

Die in 4.3.4 gezeigten Ergebnisse zeigen nur Arrhythmien auf atrialer Ebene, was natürlich nicht uneingeschränkt auf das gesamte Herz übertragen werden kann. Dieses Modell könnte man vor allem für Patienten mit Vorhofflimmern aber auch für Patienten mit supraventrikulären Arrhythmien nutzen. Ferner sind hier aus Gründen der Objektivierbarkeit nur die basalen Werte ausgewertet worden, d. h. jene ohne

pharmakologische Beeinflussung. Damit sind keine Rückschlüsse auf etwaiges pharmakologisches Auslösen von Arrhythmien möglich.

Es sind weitere Experimente für die endgültige Beurteilung der Arrhythmien notwendig.

5.6 5-HT-Rezeptoren und Herzinsuffizienz

Nachdem gezeigt werden konnte, dass nach induzierter Herzinsuffizienz bei Ratten, 5-HT über 5-HT₄-Rezeptoren positiv inotrop auf die Ventrikel wirkte und dies mit erhöhten cAMP-Spiegeln einher ging (Qvigstad et al., 2005a), kann man auch von einem neurohumoralen Remodeling auf 5-HT Ebene ausgehen. Die durch Herzinsuffizienz induzierten Veränderungen auf Ebene der β_1 -Adrenozeptoren im Myokard sind schon länger bekannt. Durch die chronisch erhöhte Ausschüttung von Katecholaminen kommt es zu einer Desensitivierung der β -Adrenozeptoren, wobei die Schädigung der Herzmuskelzellen steigt (Bristow, 2000). Schon länger nutzt man daher die mortalitätssenkende Wirkung der β -Rezeptoren-Blocker (Cohn, 1990). Nun liegt die Vermutung nahe, dass durch 5-HT-Rezeptoren eine ähnlich schädigende kardiale Wirkung bei Herzinsuffizienz auftreten kann, da sich die Signaltransduktion von kardialen β - und 5-HT₄-Rezeptoren stark gleichen (siehe auch 1.2 und 1.3). Bei Ratten mit induzierter chronischer Herzinsuffizienz konnte, durch eine Blockade von 5-HT₄-Rezeptoren, eine Besserung der linksventrikulären systolischen und diastolischen Funktion erreicht werden (Birkeland et al., 2007).

Akute und chronische Herzinsuffizienz unterscheiden sich durch die Aktivierung von z.T. unterschiedlichen 5-HT-Rezeptortypen. So wird der positiv inotrope Effekt bei Ratten mit chronisch aber auch akut insuffizienten Herzen durch 5-HT₄-Rezeptoren hervorgerufen. Bei der akuten Herzinsuffizienz zeigte sich zudem eine, durch 5-HT_{2a}-Rezeptoren induzierte, positive Inotropie mit erhöhter Expression von 5-HT_{2a}-Rezeptor-mRNA (Qvigstad et al., 2005b). Es konnte eine variable Beteiligung und Regulierung von 5-HT-Rezeptoren bei anderen kardialen Erkrankungen gezeigt werden. Durch eine künstlich herbeigeführte Stenose der Aorta von Ratten wurde eine chronische Herzinsuffizienz hervorgerufen. Die später bei diesen Tieren gefundene positiv inotrope Wirkung von 5-HT auf das Ventrikelmyokard, wurde durch 5-HT₄- und 5-HT_{2a}-Rezeptoren vermittelt. Dabei korrelierte das Ausmaß der Hypertrophie mit der 5-HT_{2a}-Rezeptor-vermittelten positiv inotropen Antwort. Ebenso korrelierte die durch 5-HT₄-Rezeptoren hervorgerufene Antwort mit der Ausprägung der linksventrikulären Insuffizienz (Brattelid et al., 2007). Damit scheinen 5-HT₄- und 5-HT_{2a}-Rezeptoren bei Herzinsuffizienz und

Herzhypertrophie im Ventrikelmyokard, unterschiedlich induziert zu werden. Mit Hilfe dieses Modells könnte eine mögliche positive Wirkung von 5-HT-Antagonisten auf die chronische Herzinsuffizienz und andere kardiale Erkrankungen und eine damit verbundene mögliche Besserung der kardialen Funktion, untersucht werden (Afzal et al., 2011). Da 5-HT₄-Rezeptoren bei der Entstehung von Arrhythmien im menschlichen Herz eine Rolle zu spielen scheinen und deren Expression unter Arrhythmien gesteigert ist, kann unser Tiermodell für weitere mechanistische Untersuchungen von 5-HT-induzierten Arrhythmien verwendet werden. Neue Wege der antiarrhythmischen Therapie könnten mit Hilfe dieses Modells getestet werden. Dieses Tiermodell könnte ebenso zum Testen von neuen 5-HT₄-Rezeptor-Agonisten verwendet werden und zum Beispiel unerwünschte Wirkungen am Herz untersuchen. Sowohl Effizienz als auch Potenz von neuen 5-HT₄-Rezeptor-Agonisten könnten mit Hilfe dieses Modells überprüft werden. Sollte andererseits bei einer neu entwickelten Substanz als Nebeneffekt ein Agonismus an 5-HT₄-Rezeptor auftreten, könnte jener mit diesem Tiermodell leicht verifiziert werden.

6. Zusammenfassung

5-HT kann verschiedene kardiovaskuläre Effekte hervorrufen. Dazu gehören gesteigerte Plättchenaggregation, Vasokonstriktion und Vasodilatation, Steigerung von Kontraktilität und Herzfrequenz sowie erhöhte Neigung zu Arrhythmien (Kaumann, 1994; Kaumann und Levy, 2006).

Wir haben ein neues transgenes Tiermodell mit herzspezifischer Überexpression des humanen 5-HT_{4a}-Rezeptors generiert (Gergs et al., 2010). Der Erfolg der 5-HT_{4a}-Rezeptor-Überexpression wurde durch Experimente mit den Herzen, insbesondere mit den Vorhöfen, funktionell überprüft. In dieser Arbeit wurden hauptsächlich die atrialen Auswirkungen dieser Überexpression untersucht. Zudem wurden die kardialen Auswirkungen von 5-HT mittels invasiver Herzkathetertechnik gemessen. Unter Kontrollbedingungen führte die Überexpression von 5-HT_{4a}-Rezeptoren im Vergleich zu den WT zu keinen Unterschieden der Herzfrequenz, des systolischen linksventrikulären Drucks (LVD) sowie der maximalen Druckabfall- bzw. Druckanstiegsgeschwindigkeit (siehe 4.2). Durch Stimulation mit 5-HT stiegen die Druckabfallgeschwindigkeit sowie der LVD der TG im Vergleich zum Kontrollwert signifikant an. Die Druckanstiegsgeschwindigkeit der TG stieg im Vergleich zum Kontrollwert um 16%. Die WT-Tiere reagierten nicht auf 5-HT.

Die Kontraktionskraft- und Frequenzmessungen an den Herzvorhöfen lieferten entsprechende Ergebnisse. 5-HT wirkte bei allen TG-Vorhöfen ausgeprägt positiv inotrop und chronotrop ($p < 0,05$ vs. Ausgangswert, vs. WT). Die Reaktionen der TG auf 5-HT ließen sich durch den kompetitiven 5-HT₄-Rezeptor-Antagonisten GR113808 und den inversen Agonisten GR125487 antagonisieren. Weder durch Vorbehandlung mit Reserpin noch durch Kokain als Wiederaufnahmehemmer von Katecholaminen wurden die Effekte von 5-HT auf die TG beeinflusst. Da Reserpin die Katecholaminspeicher leert (Nachweis durch HPLC, siehe 4.3.8), können freigesetzte Katecholamine als Ursachen der Kontraktionskraft- und Frequenzsteigerungen ausgeschlossen werden. Weiterhin traten gehäuft arrhythmische Kontraktionen bei linken Vorhöfen ($p < 0,05$ vs. WT) von TG auf.

Auf Proteinebene führte 5-HT bei den TG-Vorhöfen zu einer gesteigerten Phosphorylierung des regulierenden Proteins PLB an Serin16 und Threonin17. Dies kann über eine erhöhte SERCA-Aktivität die Relaxationszeit verkürzen und positiv inotrop wirken.

Die herzspezifische Überexpression von humanen 5-HT_{4a}-Rezeptoren in den Mäusen war erfolgreich. Damit stellt dieses Tiermodell eine Alternative zum bisher häufig verwendeten Schweineherz zur Untersuchung von 5-HT₄-Rezeptoren dar.

7. Literaturverzeichnis

Afzal F, Andressen KW, Mork HK, Aronsen JM, Sjaastad I, Dahl CP, Skomedal T, Levy FO, Osnes J-B, Qvigstad E (2008) 5-HT₄ elicited positive inotropic response is mediated by cAMP and regulated by PDE3 in failing rat and human cardiac ventricles. *Br J Pharmacol* 155:1005-1014.

Afzal F, Qvigstad E, Aronsen JM, Moltzau LR, Sjaastad I, Skomedal T, Osnes JB, Levy FO (2011) Agents increasing cyclic GMP amplify 5-HT₄-elicited positive inotropic response in failing rat cardiac ventricle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 384:543-553.

Bach T, Syversveen T, Kvingedal AM, Krobert KA, Brattelid T, Kaumann AJ, Levy FO (2001) 5-HT_{4(a)} and 5-HT_{4(b)} receptors have nearly identical pharmacology and are both expressed in human atrium and ventricle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 363:146-160.

Barbuti A, Di Francesco D (2008) Control of the cardiac rate by "funny" channels in health and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1123:213-223.

Bender AT, Beavo JA (2006) Cyclic nucleotid phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* 58:488-520.

Benitah JP, Alvarez JL, Gomez AM (2010) L-Type Ca²⁺ current in ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 48:26-36.

Bers DM (2001) Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. Boston MA: Kluwer academic press

Bers DM (2007) Calcium cycling and signalling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol* 70:23-49.

Bicht E, Sima AV, Shannon TR, Duncan AM, Blatter LA, Bers DM (2011) Dynamic calcium movement inside cardiac sarcoplasmic reticulum during release. *Circ Res* 108:847-856.

Bickmeyer U, Heine M, Manzke T, Richter DW (2002) Differential modulation of I(h) by 5-HT receptors in mouse CA1 hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 16:209-218.

Biondi ML, Agostoni A, Marasini B (1986) Serotonin levels in hypertension. *J Hypertens Suppl* 4:39-41.

Birkeland JAK, Sjaastad I, Brattelid T, Qvigstad E, Moberg ER, Krobert KA, Bjornerheim R, Skomedal T, Sejersted OM, Osnes J-B, Levy FO (2007) Effects of treatment with a 5-HT₄ receptor antagonist in heart failure. *Br J Pharmacol* 150 (2):143-152.

Blondel O, Gastineau M, Dahmoune Y, Langlois M, Fischmeister R (1998) Cloning, expression and pharmacology of four human 5-hydroxytryptamine₄ receptor isoforms produced by alternative splicing in the carboxyl terminus. *J Neurochem* 70:2252-2261.

Blondel O, Vandecasteele G, Gastineau M, Leclere S, Dahmoune Y, Langlois M, Fischmeister R (1997) Molecular and functional characterization of a 5-HT₄ receptor cloned from human atrium. *FEBS Letters* 412:465-474.

Brattelid T, Kvingedal AM, Krobert KA, Andressen KW, Bach T, Hystad ME, Kaumann AJ, Levy FO (2004a) Cloning, pharmacological characterisation and tissue distribution of a novel 5-HT₄ receptor splice variant, 5-HT_{4(i)}. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 369:616-628.

Brattelid T, Qvigstad E, Birkeland JAK, Swift F, Bekkevold S, Krobert KA, Sejersted OM, Skomedal T, Osnes JB, Levy FO, Sjaastad I (2007) Serotonin responsiveness through 5-HT_{2a} and 5-HT₄ receptors is differentially regulated in hypertrophic and failing rat cardiac ventricle. *J Moll Cell Cardiol* 43:767-779.

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

Bristow MR (2000) β -adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. *Circulation* 101:558-569.

Cardenas CG, Del Mar LP, Cooper BY, Scroggs RS (1997) 5-HT₄ receptors couple positively to tetrodotoxin-insensitive sodium channels in a subpopulation of capsaicin-sensitive rat sensory neurons. *J Neurosci* 17:7181-7189.

Cohn JN (1999) Improving outcomes in congesting heart failure: Val-HeFT Valsartan in heart failure trial. *Cardiol* 91 Suppl 1: 19-22.

Daul A, Elter-Schulz M, Poller U, Jockenhovel F, Pönicke K, Boomsma F, Man in't Veld AJ, Schäfers RF, Brodde OE (1995) Dose-dependent separation of dopaminergic and

adrenergic effects of epinine in healthy volunteers. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 352:429-437.

Du XY, Schoemaker RG, Bos E, Saxena PR (1994) Different pharmacological responses of atrium and ventricle: studies with human cardiac tissue. *Eur J Pharmacol* 259:173-180.

Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F, Lohse MJ (1999) Progressive hypertrophy and heart failure in β_1 -adrenic receptor transgenic mice. *Pharmacol* 99:7059-7064.

Engelhardt S, Grimmer Y, Fan GH, Lohse MJ (2001) Constitutive activity of the human beta(1)-adrenergic receptor in beta(1)-receptor transgenic mice. *Mol Pharmacol* 60:712-717.

Fabiato A, Fabiato F (1975) Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J Physiol Lond* 249 (3):469-495.

Galindo-Tovar A, Vargas ML, Escudero E, Kaumann AJ (2009) Ontogenetic changes of the control by phosphodiesterase-3 and -4 of 5-HT responses in porcine heart and relevance to human atrial 5-HT₄ receptors. *Br J Pharmacol* 156:237-249.

Gergs U, Baumann M, Böckler A, Buchwalow IB, Ebelt H, Fabritz L, Klöckner U, Neumann J (2008) Overexpression of the serotonin 5-HT_{4a} receptor: a mouse model for cardiac arrhythmias. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 377:52.

Gergs U, Boknik P, Schmitz W, Simm A, Silber RE, Neumann J (2009) A positive inotropic effect of adenosine in isolated right atria from diseased human hearts. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 379(5):533-540.

Gergs U, Baumann M, Böckler A, Buchwalow I, Ebelt H, Fabritz L, Hauptmann S, Keller N, Kirchhof P, Klöckner U, Pönicke K, Rückschloß U, Schmitz W, Werner F, Neumann J (2010) Cardiac overexpression of the human 5-HT₄-receptor in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299:H788–H798

Gergs U, Neumann J, Simm A, Silber RE, Remmers FO, Lär S (2009) Phosphorylation of phospholamban and troponin I through 5-HT₄-receptors in the isolated human atrium. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 379:349-359.

Gleerub G, Winther K (1988) The effect of ageing on human platelet sensitivity to serotonin. *Eur J Clin Invest* 18:504-506.

Grammer JB, Zeng X, Bosch RF, Kühlkamp V (2001) Atrial L-type Ca²⁺-channel, β -adrenoreceptor and 5-hydroxytryptamine type 4 receptor mRNAs in human atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol* 96:82-90.

Gordon AM, Hornsher E, Regnier M (2000) Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev* 80:853-924.

Gulick J, Subramaniam A, Neumann J, Robbins J (1991) Isolation and characterization of the mouse cardiac myosin heavy chain genes. *J Biol Chem* 266:9180-9185.

Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Harting PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PPA (1994) IUPHAR classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol Rev* 46:157-203.

Hoyer D, Hannon JP, Martin GR (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 71:533-554.

Jahnel U, Rupp J, Ertl R, Nawrath H (1992) Positive inotropic response to 5-HT in human atrial but not in ventricular heart muscle. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 34:482-485.

Jahnel U, Nawrath H, Rupp J, Ochi R (1993) L-type calcium channel activity in human atrial myocytes as influenced by 5-HT. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 348:396-402.

Kamel R, Garcia S, Lezoualc'h F, Fischmeister R, Muller S, Hoebee J, Eftekhari P (2007) Immunomodulation by maternal autoantibodies of the fetal serotonergic 5-HT₄ receptor and its consequences in early BALB/c mouse embryonic development. *BMC Developmental Biology* 7:34.

Kaumann AJ (1990) Piglet sinoatrial receptors resemble human atrial 5-HT₄-like receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 342:619-622.

Kaumann AJ (1994) Do human atrial 5-HT₄ receptors mediate arrhythmias? *TiPS* 15:451-455.

Kaumann AJ, Levy FO (2006) 5-hydroxytryptamin receptors in the human cardiovascular system. *Pharmacol Ther* 111:674-706.

Kaumann AJ, Levy FO (2006) Fading of 5-HT receptor-mediated inotropic responses to 5-Hydroxytryptamine is caused by phosphodiesterase activity in porcine atrium. *Br J Pharmacol* 147:128-130.

Kaumann AJ, Lynham JA, Brown AM (1995) Labelling with [¹²⁵I]-SB 207210 of a small 5-HT₄ receptor population in piglet right atrium: functional relevance. *Br J Pharmacol* 115:933-936.

Kaumann AJ, Lynham JA, Brown AM (1996) Comparison of the densities of 5-HT₄-receptors, β_1 - and β_2 -adrenoceptors in human atrium: functional implications. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 353:592-595.

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

Kaumann AJ, Sanders L, Brown AM, Murray KJ, Brown MJ (1990) A 5-hydroxytryptamine receptor in human atrium. *Br J Pharmacol* 100:879-885.

Kirchhefer U, Baba HA, Kobayashi YM, Jones LR, Schmitz W, Neumann J (2002) Altered function in atrium of transgenic mice overexpressing triadin 1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H1334-H1343.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Lange RA, Hillis LD (2001) Cardiovascular complications of cocaine use. *N Engl J Med* 345:351-358.

Lanner JT, Georgiou DK, Joshi AD, Hamilton SL (2010) Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details and function in calcium release. *Cold Spring Harb Perspect Biol*.

Läer S, Remmers F, Scholz H, Stein B, Müller FU, Neumann J (1998) Receptor mechanism involved in the 5-HT-induced inotropic action in the rat isolated atrium. *Br J Pharmacol* 123:1182-1188.

Lezoualc'h F, Steplewski K, Sartiani L, Mugelli A, Fischmeister R, Bril A (2007) Quantitative mRNA analysis of serotonin 5-HT₄ receptor isoforms, calcium handling proteins and ion channels in human atrial fibrillation. *Biochem Biophys Res Comm* 357:218-224.

Lonardo G, Cerbai E, Casini S, Giunti G, Bonacchi M, Battaglia F, Fiorani B, Stefano PL, Sani G, Mugelli A (2005) Pharmacological modulation of the hyperpolarisation-

activated current (I_f) in human atrial myocytes: focus on G-protein coupled receptors. *J Moll Cell Cardiol* 38:453-460.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Fass AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.

MacLennan DH (2001) Ca^{2+} signalling and muscle disease. *Eur J Biochem* 267 (17):5291-5297.

MacLennan DH, Kranias EG (2003) Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:566-577.

Mandela P, Chandley M, Xu Y, Zhu MY, Ordway GA (2010) Reserpine-induced reduction in Norepinephrine Transporter function requires catecholamine storage vesicles. *Neurochem Int* 56:760-767.

Morano I, Bächle-Stolz C, Katus A, Rüegg JC (1988) Increased calcium sensitivity of chemically skinned human atria by myosin light chain kinase. *Basic Res Cardiol* 83:350-359.

Neumann J, Boknik P, Matherne GP, Lankford A, Schmitz W (2003) Pertussis toxin sensitive and insensitive effects of adenosine and carbachol in murine atria overexpressing A1-adenosine receptors. *Br J Pharmacol* 138:29-217

Neumann J, Simm A, Silber RE, Gergs U (2007) Serotonin increases phosphorylation of phospholamban in the human atrium. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 375:62.

Neumann J, Ebelt H, Klöckner U, Böckler A, Günther S, Baumann M, Schulz N, Werner F, Gergs U (2008) The human serotonin 5-HT_{4a} receptor. *Circulation* 117:8-9.

Ng WA, Grupp IL, Subramaniam A, Robbins J (1991) Cardiac myosin heavy chain mRNA expression and myocardial function in the mouse heart. *Circ Res* 69:1742-1750.

Niu J, Vaiskunaite R, Suzuki N, Kozasa T, Carr DW, Dulin N, Voyno-Vasenetskaya TA (2001) Interaction of heterotrimeric G13 protein with an A-kinase-anchoring protein 110 (AKAP110) mediates cAMP-dependent PKA activation. *Curr Biol* 11:1686-1690.

O'Leary OF, Bechtholt AJ, Crowley JJ, Hill TE, Page ME, Lucki I (2007) Depletion of serotonin and catecholamines block the acute behavioural response to different classes of antidepressant drugs in the mouse tail suspension test. *Psychopharmacol* 192:357-371.

Opthof T (1998) The membrane current I_f in human atrial cells: implications for atrial arrhythmias. *Cardiovasc Res* 38:537-540.

Pau D, Workmann AJ, Kane KA, Ranking AC (2003) Electrophysiological effects of 5-hydroxytryptamine on isolated human atrial myocytes, and the influence of chronic β -adrenoceptor blockade. *Br J Pharmacol* 140:1434-1441.

Pau D, Workman AJ, Kane KA, Ranking AC (2005) Electrophysiological Effects of Prucalopride, a Novel Enterokinetic Agent, on Isolated Atrial Myocytes from Patients Treated with β -Adrenoceptor Antagonists. *J Pharmacol Experiment Therap* 313:146-153.

Pindon A, Van Hecke G, Van Gompel P, Lesage AS, Leysen JE, Jurzak M (2002) Differences in signal transduction of two 5-HT₄ receptor splice variants: compound specificity and dual coupling with G α s- and G α i/o-proteins. *Mol Pharmacol* 61:85-96.

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

Ponimaskin EG, Profirovic J, Vaiskunaite R, Richter DW, Voyno-Yasenetskaya TA (2002) 5-hydroxytryptamine 4(a) receptor is coupled to the Galpha subunit of heterotrimeric G13 protein. *J Biol Chem* 277:20812-20819.

Popova NK, Naumenko VS, Pliusnina IZ (2006) The involvement of brain 5-HT(1A) receptors in genetically determined aggressive behaviour. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* 56(4):537-542.

Porzio MA, Pearson AM (1977) Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecal sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochem Biophys Acta* 490:27-34.

Qvigstad E, Brattelid T, Sjaastad I, Andressen KW, Krobert KA, Birkeland JA, Sejersted OM, Kaumann AJ, Skomedal T, Osnes JB, Levy FO (2005a) Appearance of a ventricular 5-HT₄ receptor-mediated inotropic response to serotonin in heart failure. *Cardiovasc.Res.*65:869-878.

Qvigstad E, Sjaastad I, Brattelid T, Nunn C, Swift F, Birkeland JAK, Krobert KA, Andersen GO, Sejersted OM, Osnes JB, Levy FO, Skomedal T (2005b) Dual Serotonergic Regulation of Ventricular Contractile Force Through 5-HT_{2A} and 5-HT₄ Receptors Induced in the Acute Failing Heart. *Circ Res* 97:268-276.

Rao S, Verkamann AS (2000) Analysis of organ physiology in transgenic mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 279:C1-C18.

Robiolo PA, Rigolin VH, Wilson JS Harrison JK, Sanders LL, Bashore TM, Feldman JM (1995) Carcinoid heart disease. Correlation of high serotonin levels with valvular abnormalities detected by cardiac catheterization and echocardiography. *Circulation* 92:790-795.

Sanders L, Lynham JA, Bond B, DelMonte F, Harding S, Kaumann AJ (1995) Sensitization of human atrial 5-HT₄ receptors by chronic β -blocker treatment. *Circulation* 92:2526-2539.

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

Schwartz BG, Rezkalla S, Kloner RA (2010) Cardiovascular effects of cocaine. *Circulation* 122:2558-2559.

Simmerman HKB, Jones LR (1988) Phospholamban: protein structure, mechanism of action and role in cardiac function. *Physiol Rev* 78:921-947.

Solaro RJ, Robertson SP, Johnson JD, Holroyde MJ, Potter JD (1981) Troponin-I phosphorylation: A unique regulator of the amounts of calcium required to activate cardiac myofibrils. *Cold Spring Harb Conf Cell Prolif* 8:901-911.

Solaro RJ, Rarick HM (1998) Troponin and tropomyosin. Proteins that switch on and tune in the activity of myofilaments. *Circ Res* 83:471-474.

Tada M, Yamaoto T, Tonomura Y (1978) Molecular mechanism of active calcium transport by sarcoplasmic reticulum. *Physiol Rev* 58:1-79.

Takano S (1995) Role of 5-hydroxytryptamine in platelet thrombus formation and mechanisms of inhibition of thrombus formation by 5-hydroxytryptamine_{2A} antagonists in rabbits. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 330(3):297-308.

Toyoshima C, Norimatsu Y, Iwasawa S, Tsuda T, Ogawa H (2007) How processing of aspartylphosphate is coupled to luminal gating of the ion pathway in the calcium-pump. *Proc Natl Acad Sci* 104:19831-6.

Tramontana M, Giuliani S, Del Bianco E, Lecci A, Maggi CA, Evangelista S, Geppetti P (1993) Effects of capsaicin and 5-HT₃ antagonists on 5-hydroxytryptamine-evoked

release of calcitonin gene-related peptide in guinea-pig heart. *Br J Pharmacol* 108:431-435.

Verbeuren TJ: The distribution and biochemistry of 5-HT in the cardiovascular system. In: Saxena PR, Wallis DI, Wouters W, Bevan P (ed.): *Cardiovascular pharmacology of 5-Hydroxytryptamine*. Kluwer, Dordrecht, 1990, pp. 3-13.

Verbeuren TJ: Distribution, synthesis, metabolism, release, uptake and passage across body membranes in cardiovascular tissues including blood-brain barrier. In: Olesen J, Saxena PR (ed.): *5-Hydroxytryptamine*. Raven Press, New York, 1992, pp. 3-9.

Wagenknecht T, Grassucci R, Frank J, Saito A, Inui M, Fleischer S (1989) Three-dimensional architecture of the calcium channel/foot structure of sarcoplasmic reticulum. *Nature* 338:167-170.

Wilkinson LO, Dourish CT (1991) Serotonin receptor subtypes: Basic and clinical aspects. (ed. Peroutka, S. J.) 15:147–210.

Yusuf, S, Naab AS, Camm J (2003) 5-Hydroxytryptamine and Atrial Fibrillation: How significant is this piece in the puzzle? *J Cardiovasc Electrophysiol* 14:209-214.

Veröffentlichung von Teilen dieser Arbeit

Gergs U, Baumann M, **Böckler A**, Buchwalow IB, Ebelt H, Fabritz L, Klöckner U, Neumann J (2008) Overexpression of the serotonin 5-HT_{4a} receptor: a mouse model for cardiac arrhythmias. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 377:52.

Gergs U, Baumann M, **Böckler A**, Buchwalow I, Ebelt H, Fabritz L, Hauptmann S, Keller N, Kirchhof P, Klöckner U, Pönicke K, Rückschloß U, Schmitz W, Werner F, Neumann J (2010) Cardiac overexpression of the human 5-HT₄-receptor in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299:H788–H798.

Gergs U, Böckler A, Ebelt H, Hauptmann S, Keller N, Otto V, Pönicke K, Schmitz W, et al. (2013) Human 5-HT₄ receptor stimulation in atria of transgenic mice. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (Epub ahead of print).

8. Anhang

8.1 Puffer und Lösungen

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

Genotypisierung der Versuchstiere

Proteinase-K-Lösung	Proteinase K			
TE/SDS-Puffer	Tris-HCl	50	mM	
	EDTA	100	mM	
	SDS	0,5	%	
	pH 8,0			
	autoklavieren			
TE-Puffer	Tris-HCl	10	mM	
	EDTA	0,25	mM	
	autoklavieren			
Natriumacetat-Lösung	Natriumacetat	3	M	
	pH 6,0			
DEPC-Wasser	DEPC	0,1	%(V/V)	
dNTP-Mix				
Agarosegel	Agarose	1	%	
	TAE-Puffer			
	Ethidiumbromid	0,01	%	
TAE-Puffer	Tris-Base	1,99	M	
	Eisessig	0,99	M	
	EDTA	59,5	mM	
	gelöst	in	aqua	bidest.

Ladepuffer	TAE-Puffer	50	%
	Glycerol	50	%
	Bromphenolblau		

Kontraktionskraft- und Frequenzmessungen an Mäusevorhöfen

Badlösung

Stamm I	NaCl	17,5	%	(g/V)
	KCl	1,005	%	(g/V)
	MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,56	%	(g/V)
Stamm II	NaHCO ₃	5,00	%	(g/V)
Stamm III	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,29	%	(g/V)
	NaCl	119,8	mM	
	KCl	5,4	mM	
	MgCl ₂ x 6H ₂ O	1,1	mM	
	NaHCO ₃	22,6	mM	
	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,42	mM	
	CaCl ₂ x 2H ₂ O	1,8	mM	
	Glucose	5,05	mM	
	Ascorbinsäure	0,28	mM	
	Na ₂ -EDTA	0,05	mM	
	pH 7,4			

Nachweis auf Proteinebene

Probenpuffer	Tris-Base	0,125	M
	SDS	4	%
	Glycerol	20	%
	Bromphenolblau	0,002	%
	pH 6.8		
Molekulargewichts- standard	Lipidoxidase-Stock	4,17	%
	BSA-Stock	1,7	%

Ovalbumin-Stock	2,5	%
Carboanhydrase-Stock	1,7	%
Chymotrypsinogen-Stock	2,5	%
Ribonuclease-Stock	2,5	%
Cytochrom C -Stock	2,5	%
Probenpuffer	82,5	%

Für jede Substanz wurde eine Stocklösung aus 10 mg/ml Lämmli-Probenpuffer hergestellt.

10%iges Trenngel	Porziopuffer	47,39	%
	Acrylamid 30%	31,6	%
	Glycerol	7,9	%
	H ₂ O	12,64	%
	TEMED	0,08	%
	APS	0,38	%
4%iges Sammelgel	Sammelgelpuffer	24,73	%
	Acrylamid 30%	13,16	%
	H ₂ O	61,05	%
	TEMED	0,06	%
	APS	1	%
Porziopuffer	Tris-Base	0,2	M
	Glycin	0,6	M
	EDTA	0,12	mM
	SDS	0,2	%
	Glycerol	10	%
	Polyacrylamid	0,4	%
Sammelgelpuffer	Tris-Base	1,5	M
	SDS	0,4	%
APS	Ammoniumpersulfat gelöst in aqua bidest.	10	%(w/V)
Elektrophoresepuffer	Tris-Base	0,4	M

10 x	Glycin	1,2	M
	SDS	0,4	%
	gelöst in aqua bidest. zur Verwendung 1:10 verdünnt		
Transferpuffer	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	40	mM
	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	7,9	mM
TBST-Puffer	Tris-Base	10	mM
	NaCl	150	mM
	Tween	0,1	%
(V/V)			
AP-Puffer	Triethanolamin	100	mM
	NaCl	100	mM
	$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	5	mM
Puffer A	Rinderserum-Albumin	2	%
	gelöst in TBST-Puffer		
Puffer B	Milchpulver	5	%
	gelöst in TBST-Puffer		
NBT-Lösung	NBT	50	mg/ml
	Dimethylformamid	70	% in
	Aqua bidest.		
BCIP-Lösung in Dimethylformamid	Toluidin-Salz	50	mg/ml

8.2 Substanzen

Agarose, Typ SeaKem	FMC bioproducts, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Acrylamid 30%: Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe, BRD
L (+) –Ascorbinsäure	Merck, Darmstadt, BRD
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	MBI Fermentas, Heidelberg, BRD

Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
CaCl ₂ x 2H ₂ O	Merck, Darmstadt, BRD
Carbaminsäure-Ethylester (Urethan)	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Chloroform	Roth, Karlsruhe, BRD
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
dNTP	MBI fermentas, Heidelberg, BRD
Essigsäure 100%	(Eisessig) Merck, Darmstadt, BRD
Ethanol 100%	C. Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Ethidiumbromid	Fluka Chemie GmbH, BRD
GR125487	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
GR113808	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Glucose	Merck, Darmstadt, BRD
Glycerol	Roth, Karlsruhe, BRD
Glycin	Roth, Karlsruhe, BRD
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe, BRD
Isoprenalin	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
KCl	Roth, Karlsruhe, BRD
Kokain	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, BRD
1-Methyl-3-isobutylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
MgCl ₂ x 6H ₂ O	Merck, Darmstadt, BRD
Milchpulver	TSI GmbH, Zeven, BRD
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe, BRD
NaCl	Merck, Darmstadt, BRD
Na ₂ -EDTA	Roth, Karlsruhe, BRD
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt, BRD
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Merck, Darmstadt, BRD
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt, BRD
Nitro-Blau-Tetrazolium (NBT)	MBI Fermentas, Heidelberg, BRD
N,N-Dimethylformamid	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg, BRD
Phenol	Roth, Karlsruhe, BRD
Polyacrylamid	Roth, Karlsruhe, BRD
Ponceau S-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD

Reserpin	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Rinderserumalbumin	Merck, Darmstadt, BRD
Serotonin	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
10x Standard-Buffer	15mM MgCl ₂ ; Ampliqon
Taq-DNA-Polymerase	Ampliqon
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt, BRD
Triethanolamin	Roth, Karlsruhe, BRD
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe, BRD
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)	Fluka AG, Buch, BRD
Tween 20	Merck, Darmstadt, BRD
Tyramin	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD

8.3 Geräte und Bezugsquellen

PCR-Gerät mastercycler gradient; Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

Zentrifuge Modell 5415 C; Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

Photometer; Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

Elektrophoresekammer Typ Horizon 58; Life Technologies, Gaithersburg, USA

Waage Typ AT61 DeltaRange; Mettler,

Kontaktionskraftmessanlage Servomed; Hellige

- a) Verstärker + integrierter Schreiber
- b) Reizgerät mit vier Kanälen
- c) Wärmebad
- d) vier Transducer
- e) vier Doppelwandgefäße
- f) vier Stative
- g) vier Elektroden, Halterungsstäbe, Haken

Mikro-Dismembrator S Typ 8531609 Sartorius

Ultraschallhomogenisator Typ UW 2070 Bandelin, Berlin

Nitrocellulosemembran Typ Amersham Hybond-N⁺ GE Healthcare

Hoefer SE 600 Gelkammer, HSI, San Francisco, Kalifornien, USA

Trans Blot Cell, BioRad

Verstärker; ADInstruments, Spechbach

Chart 5 Software; ADInstruments, Spechbach

Katheter (Intramedic non-radiopaque polyethylene), BD Primary Cate Diagnostics, Sparks, MD, USA

Prism 4; GraphPad Software, San Diego, CA

8.4 Primer, PCR-Programm und Antikörper

Primer

Forward MHC-SEQ-P1, biomers.net GmbH, Ulm

ACC CTT ACC CCA CAT AGA CC

Reverse 5HT-SEQ-P1R, biomers.net GmbH, Ulm

AAA CAC CTC CCC ATA AAT CC

PCR-Programm

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

Antikörper

1. Anti-Ser16-PLB; Badrilla, Leeds, UK
2. Anti-Thr17-PLB; Badrilla, Leeds, UK
3. Anti-CSQ; freundlicherweise von L.R. Jones zur Verfügung gestellt, Krannert Institute of Cardiology, Indianapolis, USA
4. Anti-rabbit-IgG; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, BRD

9. Thesen

1. Es wurde ein transgenes Tiermodell der Maus mit Überexpression von humanen Serotoninrezeptoren vom Typ 4a generiert.
2. Die kodierende DNA-Sequenz für den Rezeptor konnte mittels PCR in den transgenen Tieren nachgewiesen werden.
3. 5-Hydroxytryptamin wirkt positiv inotrop an linken Vorhöfen von Tieren mit Überexpression von Serotoninrezeptoren vom Typ 4a.
4. 5-Hydroxytryptamin wirkt positiv chronotrop an rechten Vorhöfen von Tieren mit Überexpression von Serotoninrezeptoren vom Typ 4a.
5. Es traten häufiger spontane Arrhythmien an linken Vorhöfen von Tieren mit Überexpression von Serotoninrezeptoren vom Typ 4a auf.
6. Die Wildtyp-Tiere zeigten keine Wirkung auf 5-Hydroxytryptamin.
7. Auf Proteinebene bewirkte 5-Hydroxytryptamin eine Phosphorylierung von Phospholamban an Serin16 und Threonin17 der rechten und linken Vorhöfe von Tieren mit Überexpression von Serotoninrezeptoren vom Typ 4a.
8. Es trat keine 5-Hydroxytryptamin induzierte Phosphorylierung von Phospholamban bei den Wildtypen auf.
9. Die Ergebnisse weisen auf eine erfolgreiche Überexpression des humanen Serotoninrezeptors vom Typ 4a hin.

LEBENS LAUF

ZUR PERSON

Name, Vorname: Böckler, Anne
Geburtstag: 13.03.1984
Geburtsort: Halle/Saale
Adresse: Gustav-Hertzberg-Str.8, 06110 Halle/Saale

AUSBILDUNG

08/1994 – 07/2003 Gymnasium Latina August Hermann Francke
Abiturdurchschnitt: 1,2

10/2003 Beginn des Medizinstudiums an der Martin-Luther-
Universität Halle-Wittenberg

09/2005 1. Staatsexamen (Physikum) erfolgreich abgeschlossen
Note: 2

seit 2006 Anfertigung einer Promotion zum Thema
„Charakterisierung und Untersuchung von humanen 5-
Hydroxytryptamin-Rezeptoren in Herzvorhöfen transgener
Mäuse“

10/06 – 01/09 Tutorin des Seminars „Allgemeine Pharmakologie und
Toxikologie“

05/10 Abschluss des Medizinstudiums
Note: 2,0

seit 08/2010 Tätigkeit als Ärztin in Weiterbildung im St. Elisabeth
Krankenhaus Halle, Fachbereich: Innere Medizin
(Medizinische Klinik I)

Selbstständigkeitserklärung

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

Charakterisierung eines neuen transgenen Tiermodells mit herzspezifischer Überexpression von humanen Serotoninrezeptoren Typ 4a

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

1. selbstständig angefertigt,
2. nur unter der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen habe.

Halle, den 21.03.2012

Anne Böckler

Hiermit erkläre ich, Anne Böckler, keine weiteren Promotionsversuche unternommen zu haben.

Halle, den 21.03.2012

Anne Böckler

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Neumann möchte ich ganz herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und das in mich gelegte Vertrauen in die sachgerechte Umsetzung danken. Seine gute Betreuung und ständige Ansprechbarkeit waren eine große Hilfe und führten zu einem zügigen Voranschreiten der wissenschaftlichen Arbeit.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Dr. U. Gergs für die intensive Betreuung. Er stand mir bei jeglichen Problemen und Fragen immer geduldig zur Seite.

Allen technischen und wissenschaftlichen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die ständige Hilfsbereitschaft bei experimentellen und technischen Schwierigkeiten. Insbesondere seien hier erwähnt Frau S. Reber, Frau J. Wehde und Herr Dr. Pönicke.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern und an Stephan, auf deren Unterstützung ich immer zählen konnte.