

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

**Die G-Protein-Rezeptor-Kinase 2 bei der homologen
Desensitivierung von humanen 5-HT_{4a}-Rezeptoren in
Herzvorhöfen von transgenen Mäusen**

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

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

von
Josepha Brigitte Christ
geboren am 08.08.1994 in Berlin

Gutachter:
Prof. Dr. med. Joachim Neumann, Halle (Saale)
Prof. Dr. med. Wolfram-Hubertus Zimmermann, Göttingen
Prof. Dr. med. Frank Ulrich Müller, Münster

26.06.2019
17.04.2019

Referat

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktivieren nach Bindung des Agonisten intrazelluläre Reaktionen, können jedoch desensitivieren, wenn sie dauerhaft hohen Agonisten-Konzentrationen ausgesetzt sind. Die Desensitivierung der β_1 -Adrenozeptoren (β_1 -AR) wird durch die G-Protein-Rezeptor Kinase 2 (GRK2) vermittelt. Dabei kommt es zur Entkopplung des Rezeptors von der intrazellulären Signalkaskade. Im menschlichen Herzen gibt es Rezeptoren für Serotonin (5-HT), die ähnlich wie β_1 -AR cAMP/PKA-vermittelte positiv inotrope und positiv chronotrope Effekte vermitteln. Bedeutung und Regulation der kardialen 5-HT-Rezeptoren sind nicht vollständig geklärt. Serotonin wirkt aber am menschlichen Vorhof arrhythmogen und könnte bei chronischer Herzinsuffizienz und Vorhofflimmern beteiligt sein.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob kardiale 5-HT₄-Rezeptoren nicht nur eine ähnliche Signalkaskade wie β_1 -AR benutzen, sondern ebenso einer Desensitivierung durch GRK2 unterliegen. Als Modell dienten isolierte Herzvorhöfe transgener Mäuse (TG), die humane 5-HT_{4a}-Rezeptoren exprimieren. An elektrisch gereizten linken Vorhöfen wurde die Kontraktionskraft, an spontan schlagenden rechten Vorhöfen die Frequenz aufgezeichnet. Zur Bestimmung der β_1 -AR-Desensitivierung wurden zunächst Versuche an Präparaten von Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Die 60minütige Inkubation mit hohen Isoprenalin-Konzentrationen bewirkte die Desensitivierung. Die Beteiligung der GRK2 wurde mittels Hemmung durch Paroxetin bestimmt. Präparate von TG wurden mit Serotonin stimuliert. In TG reduzierte eine 60minütige Exposition gegenüber 10 μ M Serotonin sowohl die Potenz des Serotonins als auch die maximale Effektgröße. Eine Vorbehandlung mit Paroxetin konnte die Desensitivierung vollständig verhindern.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf die Rolle der GRK2 in der Regulation des kardialen 5-HT_{4a}-Rezeptors hin und schaffen Grundlagen für das bessere Verständnis der Serotonin-Wirkung in Physiologie, Pathophysiologie und bei der Entwicklung neuer Therapien kardiovaskulärer Erkrankungen.

Christ, Josepha: Die G-Protein-Rezeptor-Kinase 2 bei der homologen Desensitivierung humaner 5-HT_{4a}-Rezeptoren in Herzvorhöfen von transgenen Mäusen, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 73 Seiten, 2018.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Historischer Hintergrund.....	1
1.2	β_1 -Adrenozeptor vermittelte Wirkungen	2
1.2.1	Allgemeine Katecholaminwirkungen	2
1.2.2	Signaltransduktion der β_1 -AR Wirkungen am Herzen	2
1.3	5-HT ₄ -Rezeptor-vermittelte kardiovaskuläre Wirkungen.....	3
1.3.1	Allgemeine Wirkungen von Serotonin	3
1.3.2	Kardiale Wirkungen von Serotonin.....	4
1.3.3	Serotonin-Rezeptoren.....	4
1.3.4	Signaltransduktion des 5-HT _{4a} -Rezeptors.....	5
1.4	Desensitivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.....	7
1.4.1	Molekulare Mechanismen	7
1.4.2	Bisherige Versuchsmodelle und Erkenntnisse	7
2	Zielstellung.....	10
3	Material und Methodik	12
3.1	Tierhaltung	12
3.2	Generierung der transgenen Mäuse.....	12
3.3	Genotypisierung	13
3.3.1	DNA-Extraktion.....	13
3.3.2	Konzentrationsmessung der DNA.....	14
3.3.3	PCR-Amplifikation	14
3.3.4	Agarosegelelektrophorese.....	15
3.4	Kontraktionsversuche	15
3.4.1	Vorbereitung von Organbad und Messanlage.....	15
3.4.2	Organentnahme	17
3.4.3	Präparation.....	18
3.4.4	Versuche zur Desensitivierung von β -Rezeptoren	18
3.4.5	Versuche zur Desensitivierung von humanen 5-HT _{4a} -Rezeptoren	21
3.5	Statistische Auswertung	24

4	Ergebnisse	25
4.1	Genotypisierung	25
4.2	Kontraktionsversuche mit Isoprenalin.....	25
4.2.1	Positive Inotropie von Isoprenalin an linken Vorhöfen	25
4.2.2	Positive Chronotropie von Isoprenalin an rechten Vorhöfen	26
4.2.3	Desensitivierung mit 1 μ M Isoprenalin	27
4.2.4	Desensitivierung mit 3 μ M Isoprenalin	30
4.2.5	Desensitivierung mit 10 μ M Isoprenalin	32
4.2.6	Übersicht über die Ergebnisse von Versuchen mit Isoprenalin	34
4.3	Kontraktionsversuche mit Serotonin.....	36
4.3.1	Positive Inotropie von Serotonin an linken Vorhöfen	36
4.3.2	Positive Chronotropie von Serotonin an rechten Vorhöfen	37
4.3.3	Desensitivierung mit 1 μ M Serotonin: Inotropie	39
4.3.4	Desensitivierung mit 1 μ M Serotonin: Chronotropie	43
4.3.5	Desensitivierung mit 10 μ M Serotonin	44
4.3.6	Hemmung der GRK2 durch Zinkchlorid	49
4.3.7	Negative Inotropie von Zinkchlorid	51
4.3.8	Übersicht über die Ergebnisse von Versuchen mit Serotonin	52
4.4	Positive Inotropie von Paroxetin	54
5	Diskussion	56
5.1	Diskussion der Methoden	56
5.2	Diskussion der Ergebnisse	57
5.2.1	Wirkung von Isoprenalin.....	57
5.2.2	Wirkung von Serotonin	57
5.2.3	Desensitivierung des β -Rezeptors.....	58
5.2.4	Desensitivierung des 5-HT _{4a} -Rezeptors	59
5.2.5	Eigeneffekt von Paroxetin	61
5.3	Fazit	61
5.4	Klinische Bedeutung und Ausblick	63
5.4.1	Rezeptor-Desensitivierung	63
5.4.2	5-HT ₄ -Rezeptoren.....	63
5.4.3	GRK2-Hemmung	63
6	Zusammenfassung.....	65

7	Literaturverzeichnis	67
8	Thesen	73
9	Lebenslauf	VII
10	Selbstständigkeitserklärung	VIII
11	Erklärung über frühere Promotionsversuche	IX
12	Danksagung	X

Abkürzungsverzeichnis

5'-AMP	5'-Adenosinmonophosphat
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
5-HT _{4a} -R	5-HT _{4a} -Rezeptor
Abb.	Abbildung
AC	Adenylylcyclase
ANOVA	analysis of variance = Varianzanalyse
ATP	Adenosintriphosphat
β-ARK	β-Adrenozeptorkinase (= GRK2)
β-AR	β-Adrenozeptor
bp	Basenpaare
bpm	beats per minute (Herzschläge pro Minute)
bzw.	beziehungsweise
° C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DAD	delayed afterdepolarization = späte Nachdepolarisation
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Des	Desensitivierung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC ₅₀	halbmaximale effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E _{max}	Maximaleffekt
F	Kraft
fmol	Femtomol
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GRK	G-Protein-Rezeptor-Kinase
G _i	inhibierendes G-Protein
G _s	stimulierendes G-Protein
GTP	Guanosintriphosphat

HCN-Kanäle	Hyperpolarisations-aktivierte Kationenkanäle, die durch zyklische Nukleotide reguliert werden
Hz	Hertz
IE	Internationale Einheit
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
Iso	Isoprenalin
kg	Kilogramm
Ktr	Kontrolle
KWK	Konzentrationswirkungskurve
log	Logarithmus
LTCC	L-Typ-Calcium-Kanal
M	molar (Mol/Liter)
mA	Milliampère
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium-Ionen
MHC	schwere Kette des Myosins
min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µM	Mikromolar
mm	Millimeter
mM	Millimolar (Millimol/Liter)
mmol	Millimol
mN	Millinewton
ms	Millisekunden
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure = Boten-Ribonukleinsäure
mV	Millivolt
n	Stichprobenumfang
nm	Nanometer
nM	Nanomolar (Nanomol/Liter)
OD	optische Dichte
P	Phosphor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
pEC ₅₀	negativer dekadischer Logarithmus der EC ₅₀

pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase A
PLB	Phospholamban
Primer	Oligonukleotid für die Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RyR	Ryanodin-Rezeptor (Ca ²⁺ -Freisetzungskanal)
s	Sekunde
s.c.	subkutan
SDS	Natrium-Laurylsulfat
SEM	Standardabweichung des arithmetischen Mittels
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
SV 40 Poly A	Simian Virus 40-Poly-A-Sequenz
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TG	transgene Maus mit herzspezifischer Überexpression humaner 5-HT _{4a} -Rezeptoren
TnC	Kalzium-bindendes Troponin
TnI	Troponin I (Troponin-Inhibitor)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	1. Volt 2. Volumen
vs.	im Vergleich zu
WT	Wildtyp-Maus
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Historischer Hintergrund

Die systematische Erforschung der Katcholaminwirkung auf das Herz-Kreislauf-System begann mit den legendär gewordenen Versuchen von George Oliver und Sir Edward Albert Sharpey-Schäfer in Großbritannien Ende des 19. Jahrhunderts. Sie stellten erstmals eine blutdrucksteigernde Wirkung von intravenös injiziertem Nebennierenextrakt fest (Oliver und Schäfer 1894). Seitdem wurden verschiedene Rezeptor-Typen mit unterschiedlichen Signaltransduktionswegen, Agonisten und Antagonisten entdeckt. Mittlerweile sind die Rezeptoren des sympathischen Nervensystems wichtige therapeutische Angriffspunkte in der Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen geworden, wie beispielsweise bei koronarer Herzkrankheit, arterieller Hypertonie aber auch bei der chronischen Herzinsuffizienz.

Der zweite, in dieser Arbeit näher betrachtete Botenstoff erregte erst viele Jahre später das Interesse von Wissenschaftlern und Ärzten. Der Italiener Vittorio Erspamer isolierte in den 1930er Jahren eine Substanz aus enterochromaffinen Zellen des Magens, welche glatte Muskulatur kontrahierte. Er nannte es Enteramin (Erspamer und Asero 1952). Eine amerikanische Arbeitsgruppe um Irvine Page, Maurice Rapport und Arda Green isolierte in den 1940er Jahren eine Substanz aus dem Blutserum des Menschen, die den Tonus von Blutgefäßen erhöhte, und nannten sie Serotonin. Dabei handelte es sich in beiden Fällen um den gleichen Stoff, der nach Aufklärung seiner chemischen Struktur fortan als 5-Hydroxytryptamin (5-HT) bezeichnet wurde (Rapport et al. 1947, 1948). Wenige Jahre später erkannte man auch die Bedeutung von Serotonin im Gehirn (Brodie und Shore 1957). Die, heute auch klinisch, bedeutsame Unterscheidung verschiedener 5-HT-Rezeptor-Typen gelang aber erst viel später, nämlich in den 1990er Jahren (Hoyer et al. 1994). Nichtsdestotrotz konnten schon sehr früh Agonisten und Antagonisten an Serotonin-Rezeptoren, aber auch Hemmstoffe der Wiederaufnahme gefunden werden, die sich als außerordentlich wirksam erwiesen in der Behandlung von Migräne, Depressionen und Zwangsstörungen, Übelkeit und funktionellen Magen-Darm-Beschwerden.

1.2 β_1 -Adrenozeptor-vermittelte kardiovaskuläre Wirkungen

1.2.1 Allgemeine Wirkungen von Katecholaminen

Das kardiovaskuläre System steht unter der Kontrolle des vegetativen Nervensystems mit seinen Gegenspielern Parasympathikus und Sympathikus. Das sympathische System dient der Aktivierung des Organismus in Gefahrensituationen, was in dem Begriff „fight or flight reaction“ zum Ausdruck kommt. Die Wirkung der dabei ausgeschütteten Katecholamine wird über α - und β -Rezeptoren vermittelt, die alle zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören (Übersicht: Strosberg 1993). β -Adrenozeptoren werden unterteilt in β_1 , β_2 und β_3 (Bylund et al. 1994), wobei β_2 -Rezeptoren unter anderem relaxierend auf die glatte Muskulatur in Gefäßen, Bronchien und Darm wirken und β_3 -Rezeptoren die Lipolyse im braunen Fettgewebe anregen (Emorine et al. 1989).

1.2.2 Signaltransduktion der β_1 -AR Wirkungen am Herzen

Der in Herzmuskelzellen der Maus wichtigste Adrenozeptor ist der β_1 -Rezeptor und daher für diese Arbeit vorrangig von Bedeutung (Eine Übersicht über die nachfolgend beschriebenen Vorgänge findet sich bei: Wachter und Gilbert 2012). Er vermittelt positiv inotrope, chronotrope, dromotrope und lusitrope Effekte, das heißt Steigerung der Kontraktionskraft, der Frequenz, schnellere Erregungsleitung und beschleunigte Relaxation.

Die Bindung von Adrenalin an den membranständigen β_1 -Rezeptor bewirkt die Aktivierung eines stimulierenden G-Proteins (G_s -Protein). In Folge dessen steigt die Aktivität der ebenfalls membranständigen Adenylylcyclase (AC), die den cAMP synthetisiert. Das cAMP kann dann die intrazelluläre Proteinkinase A aktivieren, welche durch Phosphorylierung diverse Enzyme und Ionenkanäle in deren Aktivität reguliert. In Herzmuskelzellen wird zum Beispiel der L-Typ-Calcium-Kanal phosphoryliert, was dessen Leitfähigkeit erhöht. Der Calcium-Einstrom in die Zelle während der Plateauphase des Aktionspotentials wird größer und auch die Calcium-vermittelte Calcium-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum mittels Ryanodin-Rezeptor wird erhöht (Bers 2004): Die Konzentration von Ca^{2+} in der Systole

steigt und damit die Kontraktionskraft. Die Phosphorylierung von Phospholamban führt zu einer erhöhten Aktivität der Calcium-Pumpe am sarkoplasmatischen Retikulum (SERCA). Somit kann SERCA mehr Ca^{2+} in kürzerer Zeit in das sarkoplasmatische Retikulum transportieren. In Folge dessen kann bei der nächsten Kontraktion mehr Ca^{2+} freigesetzt werden. Parallel verkürzt sich Relaxationszeit, zusätzlich unterstützt durch eine Phosphorylierung von inhibitorischem Troponin I (TnI) (Solaro und Rarick 1998).

Außerdem kann Adrenalin in Zellen des Sinusknotens über β_1 -Rezeptoren seine Wirkungen entfalten. Allerdings kann cAMP hier direkt die HCN-Kanäle aktivieren, die die Spontandepolarisation bewirken: die Frequenz steigt. Hierbei sind keine Phosphorylierungsprozesse beteiligt (DiFrancesco und Tortora 1991).

Eine zeitliche aber auch räumliche Begrenzung dieser aktivierenden Signalkaskade wird durch Phosphodiesterasen (PDE) erreicht, die cAMP in wirkungsloses 5'-AMP spalten. Dabei können manche PDEs durch die PKA aktiviert werden. So kann die Signalkaskade ihre Aktivität „selbst“ begrenzen (Francis et al. 2011).

1.3 5-HT₄-Rezeptor-vermittelte kardiovaskuläre Wirkungen

1.3.1 Allgemeine Wirkungen von Serotonin

Serotonin hat im menschlichen Organismus verschiedenste Wirkungen, deren physiologischer Zweck und Zusammenhang unklar ist. Serotonin wirkt im Hirn unter anderem auf die Stimmung, das Gedächtnis und das Schlafverhalten; es reguliert die Motilität im Magen-Darm-Trakt und beeinflusst den Vasotonus (Übersicht: Mohammad-Zadeh et al. 2008); im Gerinnungssystem steigert es die Thrombozytenaggregation (Takano 1995). Möglicherweise lassen sich diese vielseitigen Wirkungen durch die Tatsache erklären, dass es sich bei Serotonin um ein phylogenetisch sehr altes Hormon handelt (Peroutka und Howell 1994).

1.3.2 Kardiale Wirkungen von Serotonin

Hohe Serotonin-Spiegel im Blut finden sich im Rahmen von Serotonin produzierenden Karzinoid-Tumoren oder durch massive Freisetzung aus Thrombozyten bei der Plättchenaggregation (Kaumann und Levy 2006, Robiolio et al. 1995). Serotonin kann dann auch auf das Herz wirken. Am menschlichen Vorhof, aber auch im Vorhof von anderen Spezies (Ratte, Katze und Schwein) ruft es einen positiv inotropen Effekt hervor (Übersicht: Kaumann und Levy 2006). Am menschlichen linken Vorhof beträgt der maximal positiv inotrope Effekt durch Serotonin etwa 25% des maximalen positiv inotropen Effekts durch β -AR-Stimulation bzw. durch CaCl_2 und an Trabekeln vom menschlichen rechten Vorhof etwa 60% der Isoprenalin-Wirkung (Sanders und Kaumann 1992; Kaumann et al. 1990).

Schon lange ist bekannt, dass Serotonin am Sinusknoten eine positive Chronotropie bewirkt (Le Messurier et al. 1959). Es sind in verschiedenen Modellen (in vivo am Menschen, in isolierten menschlichen Kardiomyozyten aus dem rechten Vorhof, an isolierten menschlichen Trabekeln) Arrhythmien durch Serotonin beobachtet worden. Da Serotonin häufig späte Nachdepolarisationen auslöst, werden als arrhythmogene Mechanismen die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration durch erhöhte Offenwahrscheinlichkeit des L-Typ-Calcium-Kanals diskutiert und die positive Chronotropie mit der Wirkung an HCN-Kanälen diskutiert (Kaumann und Levy, 2006; Kaumann 1994, Pino et al. 1998).

1.3.3 Serotonin-Rezeptoren

Die in den 50er Jahren pharmakologisch definierte Einteilung der Serotonin-Rezeptoren in zwei Gruppen (Gaddum und Picarelli 1957) wurde durch biochemische Methoden in den 1990er Jahren revolutioniert. Mit Ausnahme des 5-HT₃-Rezeptors, der ähnlich dem nikotinergeren Acetylcholin-Rezeptor als Ionenkanal wirkt, zeigen alle 7 Rezeptor-Familien den typischen Aufbau eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors mit sieben transmembranären Helices. Teilt man die Rezeptoren entsprechend der nachgeschalteten Signalkaskade ein, bilden sich folgende Gruppen: 5-HT₁ und 5-HT₅-Rezeptoren hemmen die AC; 5-HT₂-Rezeptoren stimulieren die Phospholipase C oder ein MAP-Kinase-

System; 5-HT₄-, 5-HT₆- und 5-HT₇-Rezeptoren erhöhen die Aktivität der AC. Die einzelnen Rezeptor-Typen können noch weiter in unterschiedliche Varianten eingeteilt werden, die durch alternative Spleißvorgänge entstehen (Hoyer et al. 1994).

1.3.4 Signaltransduktion des 5-HT₄-Rezeptors

Im Folgenden soll näher auf den 5-HT₄-Rezeptor eingegangen werden, da er an der Arbeitsmuskulatur des menschlichen Vorhofs häufigste Serotonin-Rezeptor ist und für die positiv inotropen und positiv chronotropen Effekte des 5-HT verantwortlich gemacht wird (Kaumann et al. 1990, Kaumann und Sanders 1994). Durch Bindung von Serotonin an den 5-HT₄-Rezeptor wird ein G_s-Protein aktiviert (Hoyer et al. 1994). Daraufhin wird die AC aktiviert, cAMP gebildet und die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) aktiviert (Kaumann et al. 1990). Die PKA kann nun verschiedene Proteine phosphorylieren und dadurch ihre Aktivität beeinflussen. Letztlich kommt es zu einem erhöhten Calcium-Strom durch den L-Typ Calcium-Kanal (Oquadid et al. 1992) und außerdem zur Phosphorylierung von Phospholamban (Gergs et al. 2009) und damit erhöhter Aktivität der SERCA, wodurch die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration schneller steigt, aber auch schneller wieder abfällt. Ein positiv inotroper, aber auch positiv lusitroper Effekt ist die Folge. Weiterhin ist die PKA über 5-HT₄-Rezeptor-Aktivierung auch in der Lage, die inhibitorische Einheit des Troponins (TnI) zu phosphorylieren (Gergs et al. 2009), was ebenso die Relaxation beschleunigt.

An Zellen vom rechten Vorhof kann Serotonin über 5-HT₄-Rezeptoren die Offenwahrscheinlichkeit der HCN-Kanäle erhöhen. Dieser geschieht über cAMP-Erhöhung und unabhängig von Phosphorylierungen (Pino et al. 1998). Dies bedingt den positiv chronotropen Effekt von 5-HT.

Serotonin kann aber auch Phosphodiesterasen (vor allem PDE3) stimulieren, die den cAMP-Spiegel in der Zelle wieder senken können (De Maeyer et al. 2006). Auf diesem Weg kann die Signalkaskade wieder beendet werden.

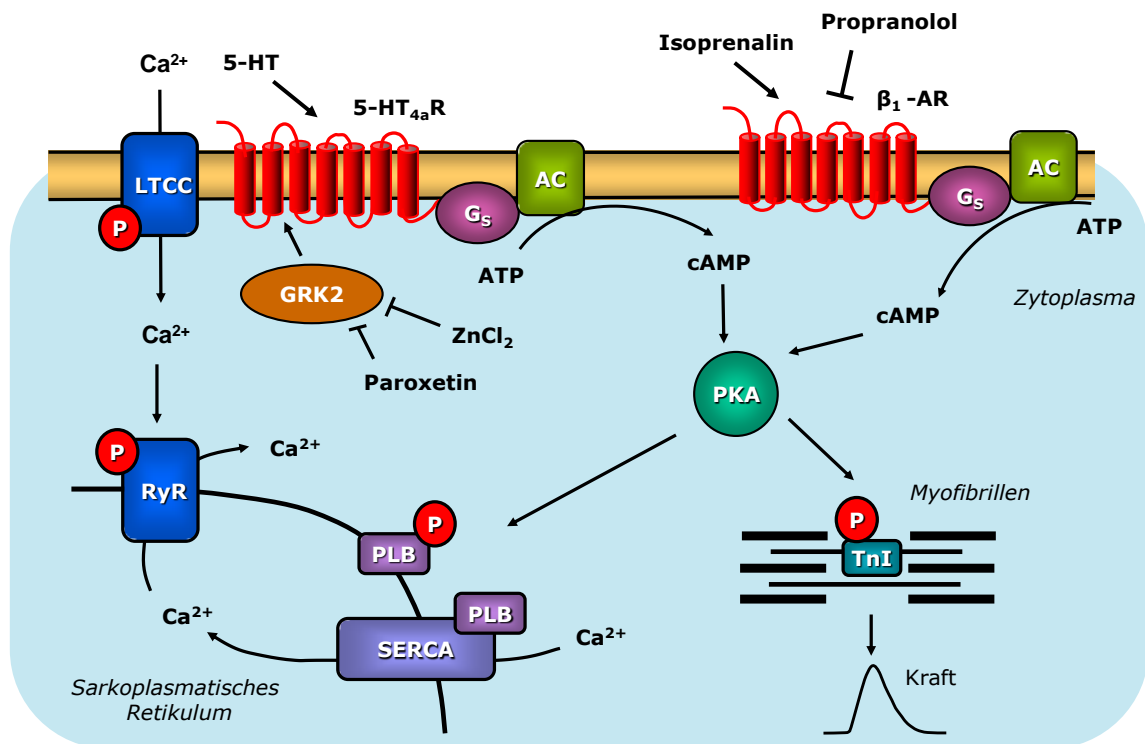


Abb. 1: Signaltransduktion von β_1 -Adrenozeptoren und 5-HT_{4a}-Rezeptoren

Es sind vereinfacht die Signaltransduktionswege in Kardiomyozyten von transgenen linken Vorhöfen der Maus dargestellt: Die Bindung von Isoprenalin an den β_1 -Adrenozeptor beziehungsweise von Serotonin (5-HT) an den 5-HT_{4a}-Rezeptor bewirkt über das stimulierende G-Protein (G_s) eine Aktivierung der Adenylylcyclase (AC). Dieses Enzym bildet aus ATP das cAMP, welches wiederum die Proteinkinase A (PKA) aktiviert. Die PKA phosphoryliert unter anderem Phospholamban (PLB), eventuell den Ryanodin-Rezeptor (RyR), den L-Typ-Calcium-Kanal (LTCC) und das Troponin I (TnI). Die Folge ist eine verstärkte Ca²⁺-Freisetzung, was eine stärkere Kontraktion hervorruft (positiv inotrop) und beschleunigte Relaxation (positiv lusitrop), da die SERCA Ca²⁺ schneller ins SR zurück pumpen kann. Dargestellt sind weiterhin Propranolol als β -Antagonist und Hemmstoffe der GRK2 (ZnCl₂ = Zinkchlorid und Paroxetin), die während der Versuche zum Einsatz kamen. P – phosphorylierter Zustand.

Abschließend sollen kurz die Gemeinsamkeiten von β_1 -Adrenozeptor und 5-HT_{4a}-Rezeptor zusammengefasst werden: es handelt sich bei beiden um G_s-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die eine Aktivierung der Adenylylcyclase hervorrufen und über eine Erhöhung des cAMP-Spiegels die PKA stimulieren. In Folge dessen können über Phosphorylierungsvorgänge an LTCC, Phospholamban und Troponin I positiv inotrope Effekte oder über cAMP direkt positiv chronotrope Effekte erreicht werden.

1.4 Desensitivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

1.4.1 Molekulare Mechanismen

Als Desensitivierung bezeichnet man das Phänomen, dass trotz konstant hoher Agonistenkonzentrationen die Rezeptor-vermittelte Antwort abnimmt. Dies kann die Zellen vor Schädigungen durch dauerhafte Rezeptor-Stimulation schützen. (Für eine Übersicht: Summers et al. 1997.) Die Desensitivierung kann durch eine Phosphorylierung des Rezeptors durch die Proteinkinase A (PKA) und eine spezielle G-Protein-Rezeptor-Kinasen (GRK) hervorgerufen werden. Dabei führt die Phosphorylierung des Rezeptors durch PKA zu einer veränderten Konformation. Als Folge erhöht sich die Affinität für inhibitorische G-Proteine (G_i). Da die PKA unselektiv, das heißt durch verschiedene Signalwege aktiviert werden kann, kann sie eine heterologe Desensitivierung hervorrufen: das heißt, es können Rezeptoren desensitiviert werden, die vormals nicht aktiviert worden waren.

Im Gegensatz dazu phosphorylieren die GRKs nur Rezeptoren, die zuvor durch die entsprechenden Agonisten aktiviert worden waren, was daher als homologe Desensitivierung bezeichnet wird. Bei β -Adrenozeptoren ist hauptsächlich die GRK2 (früher β ARK genannt) beteiligt. Einerseits wird durch die Rezeptor-Phosphorylierung die erneute Anlagerung des G_s -Proteins an den Rezeptor verhindert und so die Aktivierung der AC begrenzt. Andererseits erhöht sich die Affinität des Rezeptors zu β -Arrestin, einem Protein, welches die Entkopplung des Rezeptors von der Zellmembran und folgend eine Internalisierung bewirkt (Lohse et al. 1990).

1.4.2 Bisherige Versuchsmodelle und Erkenntnisse

Sowohl das Phänomen der Desensitivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, mehr aber noch die molekularen Effekte von GRKs und β -Arrestinen sind nach wie vor Gegenstand intensiver Forschungen. Desensitivierung von verschiedenen Adrenozeptor-Typen in unterschiedlichen Geweben unterschiedlicher Spezies wurden sowohl *in vivo* als auch *in vitro* untersucht (Broadley 1999). Broadley diskutiert in dieser Übersichtsarbeit sowohl die Effekte, die durch die Desensitivierung eintreten als auch Parameter, die zur Quantifizierung von Desensitivierung genutzt werden können. Desensitivierung äußert sich in einer Reduktion der Potenz

des Rezeptor-Agonisten, das heißt es kommt zu einer Rechtsverschiebung der Konzentrationswirkungskurve (Kaumann und Birnbaumer 1976, Broadley 1999, McMartin und Summers 1999, De Maeyer et al. 2009, Frenker 2013). Zur Quantifizierung wird der EC_{50} -Wert herangezogen, der negative dekadische Logarithmus jener Agonisten-Konzentration, die zum Erreichen des halbmaximalen Effekts nötig ist. In einigen pharmakologischen Modellen wird zusätzlich zur Rechtsverschiebung auch der maximale Effekt reduziert (De Maeyer et al. 2009, McMartin und Summers 1999, Broadley 1999, Frenker 2013). Möglicherweise spielen hier neben den Versuchsbedingungen (Gewebeart, Inkubationsdauer und Agonisten-Konzentration) auch unterschiedliche statistische Analysen eine Rolle (Broadley 1999).

Die Desensitivierung von Serotonin-Rezeptoren wurde an verschiedenen Modellen untersucht. So wurden Colliculi-Neuronen von Maus-Embryonen benutzt, um homologe Desensitivierung des 5-HT₄-Rezeptors zu bestimmen (Ansanay et al. 1992). Sanders und Kaumann zeigten die Desensitivierung des 5-HT₄-Rezeptors an humanem linksatrialen Gewebe von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz (1992). Auch an linksatrialem Gewebe von Schweinen konnte eine Desensitivierung des 5-HT₄-Rezeptors erreicht werden (De Maeyer et al. 2009). In letztgenanntem Modell zeigte sich auch, dass die Reduktion positiv inotroper Effekte nicht allein durch die Aktivierung der PDE3 zu erklären ist. In rekombinanten Zellsystemen wurden Hinweise für eine Beteiligung der GRK2 und β -Arrestinen gefunden, also Proteine aus den β -AR-Signalwegen (Barthet et al. 2005). Nach wie vor ist aber der molekulare Mechanismus der Desensitivierung des 5-HT₄-Rezeptors nicht vollkommen geklärt. Im Falle des Serotonin-Rezeptors ergeben sich besondere Schwierigkeiten, was die Wahl des Versuchsmodells angeht: Menschliches Gewebe stammt, wenn überhaupt verfügbar, von Patienten, die sich einer Herzoperation unterziehen müssen und die sich hinsichtlich Alter, Vererbung und Vormedikation unterscheiden. Auch kann der Serotonin-Rezeptor-Isoformen speziesabhängig unterschiedliche Wirkungen hervorrufen können. So ist bei der Ratte zum Beispiel der 5-HT_{2a}-Rezeptor für die positiv inotropen Effekte verantwortlich (Läer et al. 1998). Bei Schwein und Mensch wird der gleiche Effekt durch den 5-HT₄-Rezeptor vermittelt. Allerdings gibt es Unterschiede in der Aminosäuresequenz des 5-HT₄-

Rezeptors zwischen Schwein und Maus (De Mayer et al. 2008). Die Maus exprimiert während der Embryonalentwicklung 5-HT₄-Rezeptoren im Herzen (Kamel et al. 2007). In adulten Tieren lassen sich jedoch keine inotrop wirksamen 5-HT₄-Rezeptoren nachweisen (Gergs et al. 2010). Daher bietet eine in der Arbeitsgruppe hergestellte transgene Maus, welche den humanen 5-HT_{4a}-Rezeptor herzspezifisch exprimiert, möglicherweise ein geeignetes Modell, um die Rezeptor-Desensitivierung und ihre molekularen Ursachen am Herzvorhof genauer zu untersuchen. Vorteile dieses Modells sind: einfachere Züchtung im Vergleich zu anderen Labortieren, Ausschluss von Vorerkrankungen und Vormedikation im Vergleich zu menschlichem Gewebe und die getrennte Betrachtung von Kraft am linken Vorhof und Frequenz am rechten Vorhof.

Diese transgenen Mäuse zeigen deutliche positiv inotrope und positiv chronotrope Effekte nach Gabe von Serotonin (Gergs et al. 2010). Wildtyp-Geschwistertiere zeigten keinerlei inotrope oder chronotrope Reaktion auf Serotonin-Gaben und werden in dieser Arbeit als Kontrollgruppe herangezogen. 5-HT_{4a}-Rezeptoren zeigen auch eine Desensitivierung durch 600 µM Serotonin, gemessen am linken Vorhöfen (Frenker 2013). Diese Versuche demonstrierten erstmals die prinzipielle Möglichkeit, Desensitivierung von 5-HT_{4a}-Rezeptor im transgenen Mausmodell zu messen. Allerdings wurde in dieser Arbeit nur eine einzige, extrem hohe Konzentration von Serotonin benutzt. Auch konnte kein molekularer Mechanismus identifiziert werden, der die Desensitivierung hätte erklären können.

2 Zielstellung

Diese Arbeit nimmt sich daher zum Ziel, die Desensitivierung des humanen 5-HT_{4a}-Rezeptors in einer transgenen Maus genauer zu studieren. Zum einen liegt das Augenmerk dabei darauf zu prüfen, ob auch deutlich niedrigere und damit auch eventuell physiologische und gar klinisch relevantere Konzentrationen von Serotonin in der Lage sind, eine Desensitivierung zu erreichen. Zum anderen soll versucht werden, erstmals die Desensitivierung der rechten Vorhöfe sicher zu zeigen. Das wichtigste Ziel ist aber, die molekularen Mechanismen der Desensitivierung aufzudecken. Durch die Ähnlichkeit des 5-HT_{4a}-Rezeptors mit den β_1 -Adrenozeptoren scheint eine Beteiligung von GRK2 naheliegend (Ford und Clarke 1993). Versuche an rekombinanten Zellsystemen stützen diese Vermutung (Barthet et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit wird der Ansatz einer pharmakologischen Hemmung von GRK2 gewählt. Paroxetin wird benutzt, um GRK2 selektiv zu hemmen (Thal et al. 2012). Das Ausmaß einer eventuellen Beteiligung von GRK2 an der Desensitivierung von 5-HT-R soll verglichen werden mit der Beteiligung von GRK2 an der Desensitivierung von β_1 -Adrenozeptoren. Daher sollen hierzu auch Versuche zur Desensitivierung an β_1 -Adrenozeptoren von Wildtyp-Tieren erfolgen.

Die Wirkung von Serotonin am Herzen genauer zu untersuchen, ist wichtig, obwohl Serotonin im Vergleich zu Katecholaminen eine untergeordnete Rolle im Herz-Kreislauf-System spielt. Serotonin kann nämlich zum Beispiel klinisch bedeutsam werden, wenn durch Karzinoid-Tumoren große Mengen des Hormons frei gesetzt werden. Es kann dann zu Herzklappenfibrosen und Herzinsuffizienz kommen (Robiolio et al. 1995). Auch wird Serotonin für kardiale Arrhythmien verantwortlich gemacht und seine pathophysiologische Rolle bei Vorhofflimmern diskutiert (Kaumann 1994, Workman und Rankin 1998, Yusuf et al. 2003). Daher wird spekuliert, dass 5-HT₄-Antagonisten als Antiarrhythmika zum Einsatz kommen könnten (Kaumann und Levy 2006). Zudem zeigen Agonisten am 5-HT₄-Rezeptor klinisch bedrohliche kardiale Nebenwirkungen wie Tachykardie und Long-QT-Syndrom. Als Beispiel sei das Prokinetikum Cisaprid genannt, das im Jahr 2000 wegen tödlicher Herzrhythmusstörungen vom Markt genommen wurde (Wysowski et al.

2001). Weiterhin soll Serotonin auch im Rahmen der chronischen Herzinsuffizienz eine wichtige Rolle einnehmen. So konnten in menschlichem Ventrikelgewebe erhöhte 5-HT₄-mRNA-Konzentrationen im Vergleich zu gesundem Herzgewebe gemessen werden (Brattelid et al. 2004). Bei chronischer β -Rezeptor-Blockade waren sowohl der positiv inotrope Effekt als auch die arrhythmogene Wirkung von Serotonin erhöht, was eine zunehmende Bedeutung von Serotonin-Rezeptoren in dieser Situation vermuten lässt (Sanders et al. 1995, Kaumann und Sanders 1994).

Zusätzliche Bedeutung erlangt die Arbeit mit der Betrachtung der GRK2 selbst. Das Enzym wird seit längerem als wichtiges pharmakologisches Target in der Therapie der Herzinsuffizienz diskutiert (Rengo et al. 2011, Cannavo et al. 2013). Die Hemmung der GRK2 konnte aber vorerst nur in einer Knockout-Maus oder mittels Gentherapie untersucht werden. Kürzlich wurden dann auch schon erste Ergebnisse zum Einsatz von Paroxetin gezeigt: im Wildtyp-Mausmodell der Herzinsuffizienz konnte die Hemmung der GRK2 durch Paroxetin die linksventrikuläre Funktion verbessern und kardiales Remodeling reduzieren (Schumacher et al. 2015). Genauere Kenntnisse über die Funktion der GRK2 in Bezug auf andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wie den 5-HT₄-Rezeptor könnten also in der Entwicklung von Herzinsuffizienz-Therapien wichtig werden.

Zusammengefasst soll diese Arbeit einen Beitrag leisten, um die Regulation und zellulären Signalwege des kardialen 5-HT₄-Rezeptors besser verstehen zu können. Dabei werden Grundlagen geschaffen, um die Rolle von Serotonin in Gesundheit und Krankheit genauer einordnen zu können.

3 Material und Methoden

3.1 Tierhaltung

Für die Versuche wurden Tiere des Stammes CD1 benutzt. Sie wurden geschlechtergetrennt gehalten und über Nacht zur Verpaarung zusammengesetzt. Die Mäuse hatten unbegrenzten Zugang zu handelsüblichem Labortierfutter und Wasser. Ihre Haltung und der Umgang mit ihnen erfolgten nach dem genehmigten Tierversuchsantrag des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Die Wildtyp-Tiere waren am Versuchstag durchschnittlich 172 ± 4 Tage alt und $35,8 \pm 1,3$ g schwer ($n=27$); die transgenen Geschwistertiere waren 183 ± 5 Tage alt ($n=55$, $p>0,05$ vs. WT) und wogen $37,5 \pm 0,6$ g ($p>0,05$ vs. WT). Es wurden ähnlich viele männliche und weibliche Tiere verwendet.

3.2 Generierung der transgenen Mäuse

Neben Wildtypmäusen wurden für die Versuche Tiere einer Mauslinie verwendet, die den menschlichen 5-HT_{4a}-Rezeptor herzspezifisch exprimiert. Zunächst wurde dafür die kodierende Sequenz des Rezeptors aus menschlichen Herzmuskelzellen mittels RT-PCR isoliert. Mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen KpnI und SacI wurde die cDNA aus der PCR-Sequenz herausgeschnitten und in eine Expressionskassette eingefügt. Als Promoter diente die α -Isoform der schweren Kette des Myosins der Maus (α -MHC). Dadurch stand die Rezeptor-Sequenz unter der gewebsspezifischen Kontrolle des Promotors. Außerdem enthielt die Kassette zur Terminierung der Transkription eine Simian Virus 40 (SV40)-Poly-A-Signalsequenz. Diese Expressionskassette konnte nun in befruchtete Eizellen von FVB/N-Mäusen injiziert werden. Die transgenen Tiere zeigten eine herzspezifische Expression des humanen 5-HT_{4a}-Rezeptors und konnten dann in den CD1-Stamm eingekreuzt werden (Gergs et al. 2010).

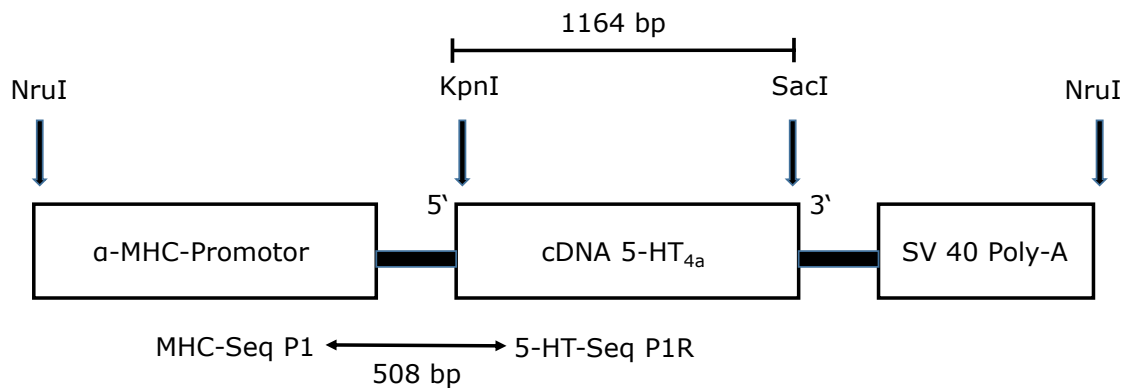


Abb. 2: α -MHC-5-HT_{4a}-Rezeptor-Expressionskassette

Mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen KpnI und SacI wurde die kodierende Sequenz des 5-HT_{4a}-Rezeptors aus menschlicher DNA herausgeschnitten. Diese Sequenz von 1164 bp Länge wurde in die Expressionskassette eingefügt, welche unter der gewebsspezifischen Kontrolle des α -MHC-Promotors der Maus stand und durch eine Simian Virus 40-Poly-A-Sequenz terminiert wurde. Die Expressionskassette wurde dann in befruchtete Eizellen von Mäusen mikroinjiziert. Mittels spezifischer Primer konnte das Transgen in der DNA der Maus nachgewiesen werden. Das erwartete PCR-Produkt hatte eine Größe von 508 bp.

3.3 Genotypisierung

3.3.1 DNA-Extraktion

Um zwischen Wildtyptieren und transgenen Tieren unterscheiden zu können, wurde allen Mäusen im Alter von vier Wochen ein kleines Stück Schwanz (circa 0,5 cm) abgeschnitten und zur Vermeidung von Verwechslungen eine Ohrmarkierung gesetzt. Die Schwanzstücke wurden enzymatisch zersetzt: dafür wurden die Präparate zwölf Stunden mit jeweils 700 μ l TE/SDS-Puffer (Tris HCl 50 mM, EDTA 100 mM, SDS 0,5 %, pH 8,0) und 20 μ l Proteinase K (10 mg/ml) bei 55° C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die DNA mittels Phenolaufreinigung aus dem Lysat gewonnen. Behandelt man das Gemisch mehrfach mit Phenol und Chloroform, bildet sich eine obere wässrige Phase und eine untere organische Phase. Die obere Phase enthält dabei die DNA, während die untere Phase Proteine und Verunreinigungen enthält. Zunächst wurden 700 μ l wassergesättigtes Phenol zugegeben und bei 14000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde entnommen und in ein neues Versuchsgefäß überführt, woraufhin 700 μ l Chloroform-

Isoamylalkohol (24:1) zugegeben wurden. Wiederum wurde bei 14000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Erneut wurde die obere Phase entnommen und nun mit 70 µl Natriumacetat (3 M, pH 6,0) und 770 µl reinem Ethanol versetzt, um die DNA aus dem Gemisch auszufällen und von den Phenolresten zu reinigen. Es bildete sich nach Zentrifugieren bei 14000 rpm für zehn Minuten ein Sediment, das nach Verwerfen des Überstandes erneut mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und bei 14000 rpm für zehn Minuten zentrifugiert wurde. Nach erneutem Verwerfen des Überstandes konnte das Sediment auf dem Heizblock bei 30-35° C getrocknet werden. Nach Inkubieren mit 50 µl TE-Puffer (Tris HCl 10 mM, EDTA 0,25 mM) für 15 Minuten bei 65° C konnte die DNA so bis zu Weiterverwendung bei 4° C gelagert werden.

3.3.2 Konzentrationsmessung der DNA

Die Reinheit der DNA-Lösung konnte mit Hilfe eines Biophotometers über die Bestimmung der optischen Dichte gemessen werden. Dafür wurde zunächst ein Kontrollwert ohne DNA bestimmt. Anschließend wurde die Extinktion der Proben bei 260 nm gemessen. Bei einer Dicke der Küvette von 1 cm und einem Messwert von 1,0 enthält die Lösung 50 µg/ml Doppelstrang-DNA.

Mithilfe des Verhältnisses vom Messwert bei zwei verschiedenen Wellenlängen (260 und 280 nm) kann zusätzlich die Qualität der Probe abgeschätzt werden. Liegt der Quotient zwischen 1,8 und 2,0 ist die Lösung weitestgehend frei von Proteinen und anderen Verunreinigungen.

3.3.3 PCR-Amplifikation

Nun konnte das gesuchte DNA-Fragment mittels PCR-Amplifikation vervielfältigt werden. Dazu wurden 1 µl DNA-Probe im Thermocycler (PCR-Gerät Mastercycler gradient, Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH) mit 10 µM Forward Primer (MHC-SEQ-P1, biomers.net GmbH; Sequenz: ACC CTT ACC CCA CAT AGA CC), 10 µM Reverse Primer (5-HT-SEQ-P1R, biomers.net GmbH; Sequenz: AAA CAC CTC CCC ATA AAT CC) sowie 10 µl PCR Super Master Mix (100 U/ml Taq DNA-Polymerase, 0,5 mM dNTPs, 4 mM MgCl₂, mit

Reinstwasser zu 20 µl Volumen aufgefüllt) inkubiert. Es wurden 40 Zyklen durchlaufen (Denaturierung 94 °C 45 s, Annealing 50-65 °C 15 s, Elongation 72 °C 30 s).

3.3.4 Agarosegelelektrophorese

Die Größe von PCR-Produkten kann mit Hilfe einer Elektrophorese abgeschätzt werden, da kleine Moleküle in einem elektrischen Feld schneller wandern als große. Die Elektrophorese erfolgte in einem 1%igem Agarosegel in einer TAE-Pufferlösung (Tris Base 1,99 M, Eisessig 0,99 M, EDTA 59,5 mM). Die Proben wurden zusammen mit 8 µl Ladepuffer (TAE-Puffer 50 %, Glycerol 50 %, Bromphenolblau) in die Geltaschen gefüllt. Zusätzlich wurden ein Marker sowie eine Positiv- und eine Negativkontrolle aufgetragen. Die Proben liefen bei 80 mV 45 Minuten lang. Die mit Ethidiumbromid gefärbten Banden wurden anschließend im UV-Licht beurteilt. Das gesuchte DNA-Fragment war 508 Basenpaare lang.

3.4 Kontraktionsversuche

3.4.1 Vorbereitung von Organbad und Messanlage

Vor Beginn jedes Versuches wurde eine sogenannte Tyrodelösung aus vorbereiteten Stammlösungen hergestellt. Bei der Tyrodelösung handelt es sich um eine von Maurice Vejux Tyrode entwickelte Lösung von Elektrolyten und Glukose in physiologischen Konzentrationen in Wasser (Tyrode 1910). Sie dient dazu, ein geeignetes Milieu für die isolierten Vorhofpräparate zu schaffen.

Die Tyrodelösung wurde hergestellt aus 40 ml Stammlösung I (NaCl 17,5 %, KCl 1,005 %, $MgCl_2 \times 6H_2O$ 0,56 %), 38 ml Stammlösung II ($NaHCO_3$ 5%) und 20 ml Stammlösung III ($NaH_2PO_4 \times H_2O$ 0,29 %). Anschließend wird dieses Gemisch mit Reinstwasser auf 1 Liter aufgefüllt und nach 10minütiger Begasung mit Carbogen (95% O_2 und 5% CO_2) werden 0,8 ml Calciumchlorid-Lösung (33,2 g $CaCl_2/100$ ml H_2O), 1 g wasserfreie Glucose, 49,9 mg Ascorbinsäure und 19 mg Na_2EDTA hinzugefügt. Zur Erreichung eines stabilen und physiologischen pH-Werts von 7,4 wurde die Lösung kontinuierlich

begast und auf 37° C erwärmt. (Endkonzentrationen der Tyrodelösung: NaCl 119,9 mM, KCl 5,4 mM, MgCl₂ x 6H₂O 1,1 mM, NaHCO₃ 22,6 mM, NaH₂PO₄ x H₂O 0,42 mM, CaCl₂ x 2H₂O 1,8 mM, Glucose 5,05 mM, Ascorbinsäure 0,28 mM, Na₂-EDTA 0,05 mM.)

Die Messanlage für die Kontraktionsversuche (Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim) besteht aus doppelwandigen Gefäßen. Das äußere Gefäß dient zur Erwärmung des Organbads (Abb. 3). Das innere Gefäß enthält am unteren Badrand einen Anschluss für die Carbogenzufuhr. Das innere Gefäß wird mit exakt 10 ml Tyrodelösung gefüllt. Weiterhin enthält es zwei starre Metalldrähte zur Befestigung der Organpräparate. Der obere Metalldraht ist mit einem Kraftmesser verbunden, der über einen Brückenverstärker die Messung an eine digitalisierende Hardware überträgt. Die graphische Darstellung auf einem Computerbildschirm und die Aufzeichnung der Daten erfolgte mithilfe der Software IOX von Emka Technologies, Paris, Frankreich.

In den Organbädern für die linken Vorhöfe befinden sich außerdem zwei Reizelektroden. Die Reizung erfolgte mit einer Reizfrequenz von 1 Hz und Rechteckimpulsen von 5 ms Dauer, wobei die Spannung etwa 10-20% oberhalb der Reizschwelle lag. Die rechten Vorhöfe kontrahierten spontan, wenn der Sinusknoten und das Reizleitungssystem durch die Präparation nicht verletzt wurden. An diesen Präparaten konnte dann die spontane Schlagfrequenz gemessen und eventuelle Arrhythmien aufgezeichnet werden.

Vor Beginn jedes Versuchs wurden die Kraftaufnehmer kalibriert. Dafür wurde zunächst bei frei hängendem Metalldraht ein Nullpunkt festgelegt. Anschließend wurde ein 500 mg schwerer Draht ring an den Messdraht gehängt und dieser Ausschlag von 5 mN in der Software als Referenz gespeichert.

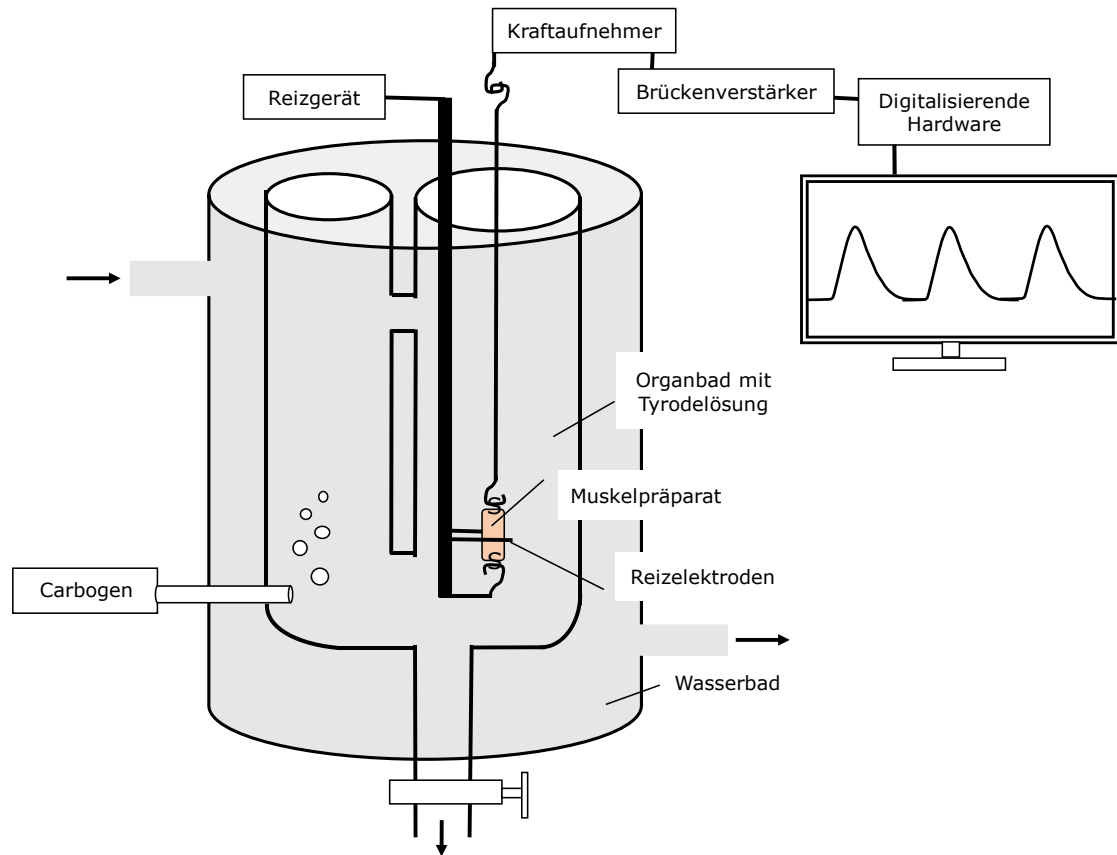


Abb. 3: Versuchsapparatur für isometrische Kontraktionsmessungen

Die Versuchsapparatur besteht aus einem doppelwandigen Glasgefäß, welches ein mit Tyrodelösung gefülltes Organbad enthält. Es wird über ein Wasserbad auf 37° C erwärmt und kontinuierlich mit Carbogen begast. Darin befindet sich das Muskelpräparat zwischen den zwei Reizelektroden. Die Kontraktion des Vorhofs wird über einen Kraftaufnehmer, der über einen Brückenverstärker mit einer digitalisierenden Hardware verbunden ist, aufgezeichnet und auf einem Computerbildschirm dargestellt.

3.4.2 Organentnahme

Die Mäuse hatten bis unmittelbar vor Versuchsbeginn unbegrenzten Zugang zu Wasser und Trockenfutter. Die Mäuse wurden zunächst gewogen. Zur Vermeidung von Thrombenbildung erfolgte dann die Injektion von 10 000 IE Heparin intraperitoneal. Pentobarbital wurde in einer gewichtsadaptierten Dosierung (50-75 mg/kg Körpergewicht) zur Narkotisierung intraperitoneal injiziert. Pentobarbital erzeugte eine tiefe Bewusstlosigkeit, die eine schmerzbedingte Katecholaminausschüttung weitgehend vermeiden sollte. Waren die Tiere bewusstlos, wurden sie an der Haut von Thorax und Abdomen in einer Präparationsschale fixiert. Der Thorax wurde mit einer Schere von

ventral eröffnet, wobei ein Schnitt durch Fell und Haut vom Abdomen zum Sternum geführt wurde und zwei weitere Schnitte entlang der Rippenbögen nach axillär die Pleura durchtrennten und die Thoraxorgane freilegten. Nach Setzen einer Klemme am Sternum wurde der Rippenbogen nach kranial umgeschlagen und durch einen Schnitt zur Durchtrennung der Venae cavae und der Aorta das noch schlagende Herz entnommen. Das Präparat wurde sofort in raumtemperierte Tyrodelösung überführt.

3.4.3 Präparation der Vorhöfe

Anschließend erfolgte die Präparation der Vorhöfe in einer Präparierschale, die mit Carbogen begaster Tyrodelösung gefüllt war. Dafür wurde das Herz zunächst mit einer Nadel am Apex fixiert. Teile von Lunge, großen Gefäßen und Thymus wurden entfernt. Danach konnte der linke Vorhof mit einem Schnitt abgetrennt werden. Am oberen und unteren Pol des Vorhofs wurden Metallhaken eingestochen und dieser in die Messanlage eingehängt. Nach Eintauchen der Apparatur in das oben beschriebene Organbad wurden die linken Vorhöfe elektrisch gereizt und auf ungefähr 5 mN vorgespannt. Der noch schlagende rechte Vorhof wurde mit zwei Schnitten vorsichtig abgetrennt, um den Sinusknoten an der Einmündung der Vena cava superior nicht zu verletzen. Vergleichbar zum linken Vorhof erfolgte das Einstechen der Metallhaken in das Muskelgewebe, das Einhängen in die Apparatur sowie die Vorspannung bis circa 5 mN. Vor Beginn des eigentlichen Versuchs wurde die Tyrodelösung über einen Zeitraum von 30 Minuten dreimalig gewechselt und die Präparate meist noch nachgespannt (maximal drei Mal). Diese Phase diente zur Einstellung eines Gleichgewichts der Kontraktionskraft beziehungsweise der Schlagfrequenz.

3.4.4 Versuche zur Desensitivierung von β -Rezeptoren

Diese Versuche wurden nur an Präparaten von Wildtyp-Tieren durchgeführt. Jeder Versuch begann mit einer kumulativen Konzentrationswirkungskurve für Isoprenalin von 0,1 nM bis 1 μ M (Abb. 4). Nach jeder Erhöhung der Konzentration wurde der Effekteintritt abgewartet bis die nächsthöhere

Konzentration pipettiert wurde. Sowohl die positiv inotrope als auch die positiv chronotrope Effekt zeigten sich innerhalb von fünf Minuten. Nach dieser ersten Konzentrationswirkungskurve wurden mehrmalige Badwechsel mit frischer Tyrodelösung durchgeführt, um die Substanz Isoprenalin aus dem Präparat auszuwaschen, bis in etwa die ursprüngliche Ausgangslage von Kraft beziehungsweise Frequenz vom Versuchsbeginn wieder erreicht war. Dafür waren etwa 3 Badwechsel im Abstand von 5 Minuten notwendig. Anschließend erfolgten die individuellen Behandlungen der Präparate entsprechend der folgenden Protokolle. Insgesamt wurden drei verschiedene Konzentrationen zur Desensitivierung verwendet, um optimale Bedingungen und eventuell unterschiedlich starke Desensitivierungen zu erreichen.

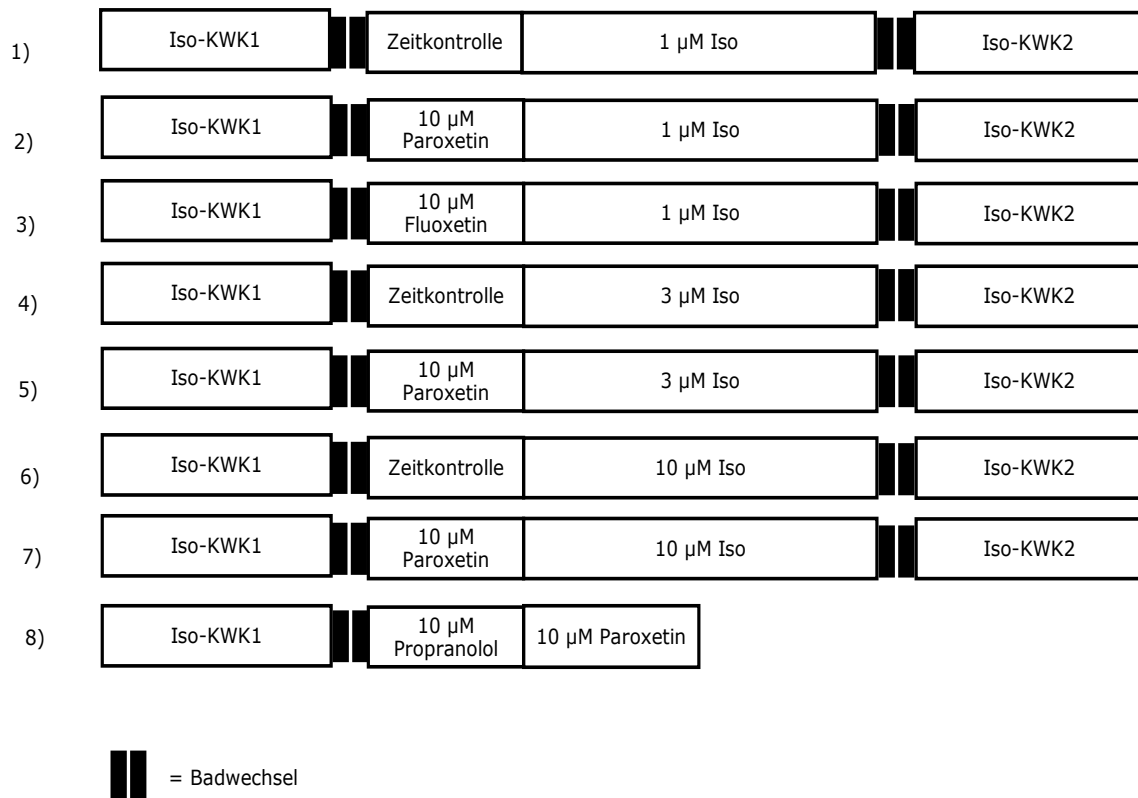


Abb. 4: Schematische Darstellung der Versuchsprotokolle an WT

Jeder Versuch begann zunächst mit einer Konzentrationswirkungskurve für Isoprenalin von 0,1 nM bis 1 µM. Nach dem Auswaschen der Substanz wurden die individuellen Protokolle begonnen, die nach erneutem Badwechsel mit einer zweiten Konzentrationswirkungskurve (Isoprenalin 0,1 nM bis 1 µM) endeten.

Protokoll 1), 4) und 6): Nach dem beschriebenen Badwechsel verblieben die Präparate unverändert im Organbad für 30 Minuten (Zeitkontrolle). Anschließend wurden die Präparate zum Zweck der β_1 -Rezeptor-Desensitivierung mit 1, 3 beziehungsweise 10 μM Isoprenalin für 60 Minuten inkubiert. Es folgten mehrmalige Badwechsel wie oben beschrieben zum Erreichen der Ausgangslage vom Versuchsbeginn. Daraufhin wurde eine erneute Konzentrationswirkungskurve für Isoprenalin mit denselben Konzentrationen wie im ersten Versuchsteil (KWK1) aufgezeichnet. Dieser letzte Versuchsteil wurde KWK2 genannt.

Protokoll 2), 5) und 7): Unmittelbar nach dem Badwechsel Inkubation mit 10 μM Paroxetin für 30 Minuten. 10 μM Paroxetin war die Konzentration, für die Thal et al. (2012) eine Hemmung der GRK2 in isolierten Zellen gezeigt hatten. Anschließend zusätzliche Gabe von 1, 3 beziehungsweise 10 μM Isoprenalin für 60 Minuten. Badwechsel und KWK2 wie bereits beschrieben.

Protokoll 3): Inkubation mit 10 μM Fluoxetin für 30 min, anschließend Inkubation mit 1 μM Isoprenalin für 60 Minuten, dann Badwechsel und KWK2. Die Kontrolle mit Fluoxetin diente der Prüfung, ob die durch Paroxetin vermittelten Effekte auch durch andere Vertreter der Substanzgruppe der selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI) zu erreichen sind. Für Fluoxetin wurde bisher keine hemmende Wirkung auf die GRK2 beschrieben (Thal et al. 2012, Schumacher et al. 2015). Paroxetin und Fluoxetin wurden zur besseren Vergleichbarkeit in identischen Konzentrationen und Inkubationszeiten verwendet.

Protokoll 8): Im Laufe der experimentellen Arbeit fiel auf, dass alle Präparate (sowohl von Wildtyp als auch von transgenen Tieren) auf die Gabe von Paroxetin mit einem langsamen Kraftanstieg reagierten. Um zu prüfen, ob dieser Kraftanstieg auf eine unspezifische Freisetzung von Katecholaminen zurückzuführen sein könnte, wurde an Wildtyp-Vorhöfen folgender Kontrollversuch durchgeführt: Zunächst Isoprenalin-KWK zur Prüfung der Vitalität der Präparate und der Reagibilität der β -Rezeptoren; Badwechsel zum Auswaschen von Isoprenalin, anschließend Inkubation mit 10 μM Propranolol für 30 Minuten, dann Inkubation mit 10 μM Paroxetin für 30 Minuten.

3.4.5 Versuche zur Desensitivierung von humanen 5-HT_{4a}-Rezeptoren

Die Durchführung der im Folgenden beschriebenen Versuchsprotokolle erfolgte mit Ausnahme der Wildtyp-Kontrollen an Präparaten von transgenen Tieren (Abb. 5). Es wurden zwei verschiedene Konzentrationen (1 μ M und 10 μ M) zur Desensitivierung der 5-HT_{4a}-Konzentrationen getestet, um eine eventuelle Konzentrationsabhängigkeit der Desensitivierung zu finden. (Zur Desensitivierung von links atrialen Trabekeln vom Schwein verwendeten De Maeyer et al. (2009) 1, 3 und 10 μ M Serotonin für 30 bis 60 Minuten, während Ansanay et al. (1992) Colliculi Neuronen von Maus-Embryos mit 10 μ M für bis zu 24 Stunden inkubierten.) Jeder Versuch begann zunächst mit einer Konzentrationswirkungskurve für Serotonin durch kumulative Gaben von 1 nM bis 1 μ M. Die positiv inotropen beziehungsweise chronotropen Effekt zeigten sich ebenso wie bei Isoprenalin in einem Zeitraum von 5 Minuten. Nach Erreichen eines Plateaus wurde die nächst höhere Konzentration pipettiert. Nach dem Ende der ersten Konzentrationswirkungskurve wurde die Tyrodelösung im Organbad so lange gewechselt bis in etwa die Ursprungslage vom Versuchsbeginn erreicht war, woraufhin die individuellen Protokolle folgten.

9)	5-HT-KWK1	Zeitkontrolle	1 μ M 5-HT	5-HT-KWK2	Iso
10)	5-HT-KWK1	10 μ M Paroxetin	1 μ M 5-HT	5-HT-KWK2	Iso
11)	5-HT-KWK1	10 μ M Fluoxetin	1 μ M 5-HT	5-HT-KWK2	Iso
12)	5-HT-KWK1	Zeitkontrolle	10 μ M 5-HT	5-HT-KWK2	Iso
13)	5-HT-KWK1	10 μ M Paroxetin	10 μ M 5-HT	5-HT-KWK2	Iso
14)	5-HT-KWK1	10 μ M Fluoxetin	10 μ M 5-HT	5-HT-KWK2	Iso
15)	5-HT-KWK1	25 μ M ZnCl ₂	10 μ M 5-HT	5-HT-KWK2	Iso
16)	5-HT-KWK1	2,5 μ M ZnCl ₂	10 μ M 5-HT	5-HT-KWK2	Iso


 = Badwechsel

Abb. 5: Schematische Darstellung der Versuchsprotokolle an TG

Jeder Versuch begann zunächst mit einer Konzentrationswirkungskurve für Serotonin von 1 nM bis 1 μ M (5-HT-KWK1). Nach Badwechsel erfolgten die individuellen Behandlungen. Nach erneutem Badwechsel erfolgte für alle Präparate eine zweite Serotonin-Konzentrationswirkungskurve (5-HT-KWK2) und die abschließende Gabe von 1 μ M Isoprenalin (Iso).

Protokoll 9) und 12): Die Präparate kontrahierten ohne Substanzzugabe für 30 Minuten (Zeitkontrolle), dann Zugabe von 1 beziehungsweise 10 μ M Serotonin für 60 Minuten zur Desensitivierung der 5-HT_{4a}-Rezeptoren. Anschließend Badwechsel und Serotonin-Konzentrationswirkungskurve mit den gleichen Konzentrationen wie zu Versuchsbeginn (KWK2).

Protokoll 10) und 13): Gabe von 10 μ M Paroxetin für 30 Minuten zur Hemmung der GRK2, dann Zugabe von 1 beziehungsweise 10 μ M Serotonin für 60 Minuten. Badwechsel und KWK2 für Serotonin.

Protokoll 11) und 14): Gabe von 10 μ M Fluoxetin für 30 Minuten zur oben erläuterten Kontrolle. Anschließend Inkubation mit 1 oder 10 μ M Serotonin für 60 Minuten, Badwechsel und Konzentrationswirkungskurve 2.

Protokoll 15) und 16): Die Motivation für dieses Protokoll entsprang der Arbeit von Julia Frenker, die ebenfalls Versuche zur Desensitivierung des humanen 5-HT_{4a}-Rezeptors in der Maus durchführte. Sie versuchte die Desensitivierung des Rezeptors durch die Gabe von ZnCl₂ (ebenfalls Hemmstoff der GRK2) zu verhindern. Da es sich dabei aber um eine zelltoxische Substanz handelte und die negativ inotropen und chronotropen Effekte bei der von ihr verwendeten Konzentration von 400 μ M sehr ausgeprägt waren, wurde diesmal eine weitaus geringere Konzentration verwendet (25 sowie 2,5 μ M). Die Inkubation mit 25 beziehungsweise 2,5 μ M ZnCl₂ erfolgte für 60 Minuten, anschließend die Zugabe von 10 μ M Serotonin für 60 Minuten. Badwechsel und KWK2 wie üblich.

In den Kontrollen mit Wildtyp-Vorhöfen wurde eine Serotonin-Konzentrationswirkungskurve von 1 nM bis 1 μ M durchgeführt. Abschließend erfolgte die Gabe von 1 μ M Isoprenalin, um die Vitalität des Präparats zu prüfen.

Zum Abschluss jedes Versuchs erfolgte die einmalige Gabe von 1 μ M Isoprenalin, um zu zeigen, ob das Muskelpräparat noch vital war und ob der

maximale positiv inotrope beziehungsweise chronotrope Effekt durch die Gabe von Serotonin bereits erreicht worden war.

Da Paroxetin im Gegensatz zu den anderen verwendeten Substanzen nicht in Reinstwasser, sondern in 99,9%igem DMSO gelöst wird, wurde auch eine Lösungsmittelkontrolle durchgeführt, das heißt es wurde nicht Paroxetin pipettiert, sondern das gleiche Volumen DMSO (10 µl). Da sich keine Veränderung bezüglich der untersuchten Parameter Inotropie und Chronotropie sowie des maximalen Ansprechens auf Serotonin oder Isoprenalin zeigten, wurden diese Versuchsergebnisse auch für die Auswertung herangezogen.

3.5 Statistische Auswertung

Die Daten wurden mithilfe von Microsoft Office Excel und GraphPad Prism 5.0 für Windows ausgewertet. Die Berechnung des p-Werts erfolgte mit dem Student'schen t-Test für verbundene und für unverbundene Stichproben sowie mit dem Fisher-Test und ANOVA. Als signifikant gilt ein p-Wert kleiner als 0,05. Zur Bewertung der Empfindlichkeit der Präparate auf Serotonin oder Isoprenalin wurde der EC_{50} -Wert berechnet. Die EC_{50} ist die mittlere effektive Konzentration eines Pharmakons, das heißt die Konzentration, bei der der halbmaximale Effekt gemessen werden kann. Dafür wird zunächst für jeden Einzelversuch die EC_{50} aus der Konzentrationswirkungskurve bestimmt. Zur anschließenden Berechnung des Mittelwerts wurden nur Versuche herangezogen, bei denen das R-Quadrat über 0,9 lag. Ein derart hoher R-Quadrat-Wert zeigt, dass der Kurvenverlauf der Einzelversuche einem sigmoidalen Verlauf folgt und kann daher als Qualitätsmerkmal betrachtet werden. Im Folgenden ist stets der negative dekadische Logarithmus der mittleren effektiven Konzentration angegeben ($-\log EC_{50}$ oder pEC_{50}).

Die Daten werden als arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Es werden die maximale absolute Kraft bzw. Frequenz sowie der maximale Effekt (E_{max}) als Differenz zwischen Ausgangs- und Maximalkraft bzw. -frequenz angegeben. Die Anzahl der Einzelversuche wird im Folgenden als „n“ bezeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Genotypisierung

Zur Unterscheidung von transgenen und Wildtyp-Tieren wurde DNA gewonnen, mittels PCR amplifiziert und in einer Elektrophorese aufgetrennt. In Abbildung 6 ist beispielhaft dargestellt, wie so die Identifikation der transgenen Tiere gelang.

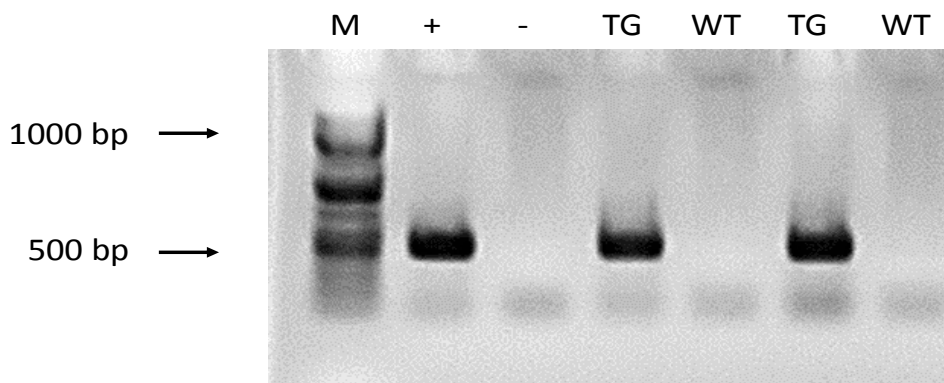


Abb. 6: Genotypisierung der Versuchstiere

Die DNA der Versuchstiere wurde zunächst mittels PCR amplifiziert und dann in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die gesuchte DNA-Sequenz hat eine Länge von 508 bp. Zur Beurteilung der Länge der DNA-Fragmente wurde ganz links eine 100 bp DNA-Leiter (M) aufgetragen, daneben Positiv- (+) und Negativkontrolle (-).

4.2 Kontraktionsversuche mit Isoprenalin

4.2.1 Positive Inotropie von Isoprenalin an linken Vorhöfen

Die Versuche zur Desensitivierung von β -Rezeptoren wurden nur an Wildtyp-Präparaten durchgeführt. Die linken Vorhöfe dieser Tiere zeigten zu Beginn des Versuchs eine basale Kraft von $2,95 \pm 0,42$ mN bei einer Vorspannung von 5 mN und elektrischer Reizung mit 1 Hz. Im Laufe der ersten Konzentrationswirkungskurve wurden kumulative Dosen von Isoprenalin gegeben (von 0,1 nM bis 1 μ M), woraufhin die Präparate mit einer Zunahme der Kraft reagierten. Allerdings zeigten die Präparate zu Beginn des Versuchs bei sehr geringen Konzentrationen Isoprenalin (1 nM) noch ein leichtes

Nachlassen der Kraft (nicht signifikant). Der erste signifikante Anstieg zeigte sich bei einer Konzentration von 10 nM Isoprenalin im Bad, wobei die Kraft um $1,52 \pm 0,36$ mN gegenüber der Ausgangslage zunahm ($p < 0,05$, $n = 17$). Der E_{\max} lag letztlich bei einer Zunahme der Kraft um $4,27 \pm 0,47$ mN und der pEC_{50} bei $7,77 \pm 0,06$.

4.2.2 Positive Chronotropie von Isoprenalin an rechten Vorhöfen

Die rechten Vorhöfe von Wildtyp-Tieren wiesen eine Basalfrequenz von 392 ± 14 bpm auf ($n = 12$). Auch an diesen Präparaten wurde eine kumulative Konzentrationswirkungskurve durchgeführt (Abb. 7). Im Unterschied zu den linken Vorhöfen derselben Herzen zeigten die rechten Vorhöfe kein anfängliches Nachlassen bezüglich der Frequenz, sondern zeigten schon auf die zweite Konzentration Isoprenalin (0,3 nM) eine signifikante Zunahme der Frequenz um $22 \pm 6,5$ bpm ($p < 0,05$, $n = 12$).

Der maximal entwickelte Kraft lag bei 605 ± 9 bpm ($p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 12$), der E_{\max} bei 214 ± 14 bpm und der pEC_{50} betrug $8,67 \pm 0,09$ ($n = 10$). Damit war der pEC_{50} signifikant höher als für die linken Vorhöfe (Tabelle 1). Das bedeutet, dass der positiv chronotrope Effekt von Isoprenalin (gemessen an rechten Vorhöfen) empfindlicher ist als der positiv inotrope Effekt (gemessen an linken Vorhöfen).

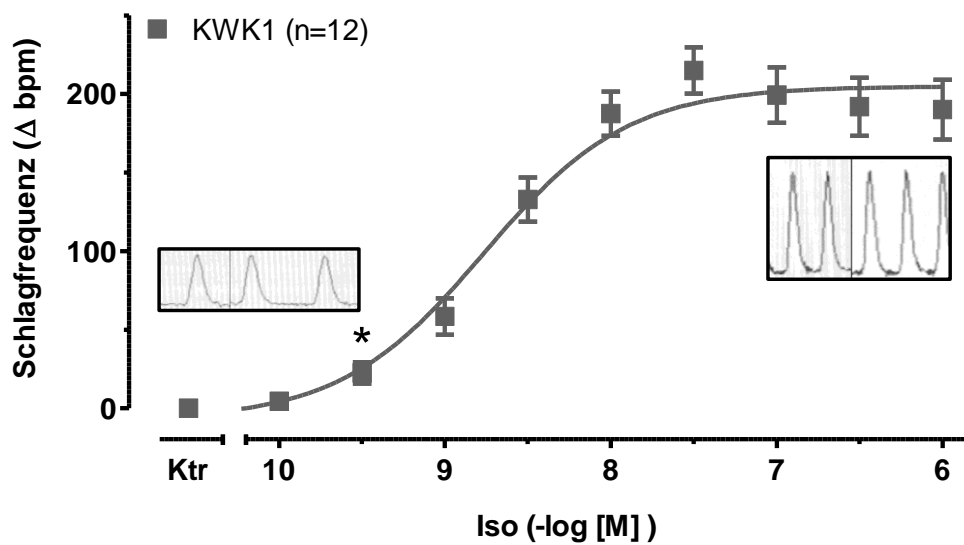


Abb. 7: Positive Chronotropie von Isoprenalin an rechten WT-Vorhöfen

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM für die absolute Zunahme (Δ bpm) der Schlagfrequenz für kumulativ ansteigende Konzentrationen von Isoprenalin in spontan kontrahierenden rechten Vorhöfen von WT. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle (Ktr). Iso: Isoprenalin, Ordinate: Frequenz, Abszisse: Isoprenalin-Konzentration.

Die eingeschobenen Bilder zeigen beispielhaft Einzelkontraktionen aus Originalaufzeichnungen unter Kontrollbedingungen (links) und in Gegenwart von $1 \mu\text{M}$ Isoprenalin (rechts).

4.2.3 Desensitivierung mit $1 \mu\text{M}$ Isoprenalin

Nach der ersten Konzentrationswirkungskurve für Isoprenalin, Badwechsel, 30 min Zeitkontrolle sowie 60minütiger Inkubation mit $1 \mu\text{M}$ Isoprenalin und nochmaligem Badwechsel wurde erneut die Kraft der linken Vorhöfe gemessen. Sie betrug $0,65 \pm 0,05$ mN und war somit signifikant geringer als zu Versuchsbeginn ($p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n=3$). Die erste signifikante Zunahme der Kraft während der Konzentrationswirkungskurve zeigte sich bei einer Gabe von $0,1 \mu\text{M}$ Isoprenalin, also bei zehnmal höherer Konzentration als in KWK1. Die Kraft betrug dann $2,12 \pm 0,37$ mN ($p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n=3$). Während der KWK2 stieg die Kraft auf maximal $3,9 \pm 0,26$ mN und der pEC_{50} betrug $6,78 \pm 0,23$. Somit waren sowohl der E_{max} als auch die Potenz im Vergleich zur Kontrollgruppe (KWK1) vermindert. Dieses Ergebnis kann als Desensitivierung von β -Rezeptoren durch Isoprenalin gedeutet werden.

Bei den Präparaten, die zusätzlich zu 1 μM Isoprenalin auch 10 μM Paroxetin erhielten, betrug die Kraft vor Beginn der zweiten Konzentrationswirkungskurve $2,93 \pm 0,53$ mN. Diese Ausgangskraft war signifikant höher als die der desensitivierten Präparate, nicht aber signifikant verändert gegenüber Versuchsbeginn. Der erste signifikante Anstieg im Verlauf der Konzentrationswirkungskurve zeigte sich bei 10 nM Isoprenalin ($4,42 \pm 0,99$, $n=3$), das heißt bei der gleichen Konzentration von Isoprenalin wie in KWK1. Die maximale Kraft betrug in dieser Gruppe $7,88 \pm 0,9$ mN (E_{max} : $5,88 \pm 0,5$ mN) und war damit signifikant höher im Vergleich zur Desensitivierung, aber darüber hinaus nicht unterschiedlich im Vergleich zu KWK1. Der pEC_{50} betrug $7,78 \pm 0,08$ und war signifikant höher als für die desensitivierten Präparate und nicht unterschiedlich im Vergleich zur Kontrollgruppe (KWK1). Es fand also, im Gegensatz zur Gruppe desensitiverter Präparate, weder eine Verschiebung der EC_{50} noch der maximal entwickelten Kraft im Vergleich zu KWK1 statt. Die Inkubation der Muskelpräparate mit Paroxetin vor der 60minütigen Gabe von Isoprenalin konnte also die Desensitivierung vollständig verhindern (Abb. 8).

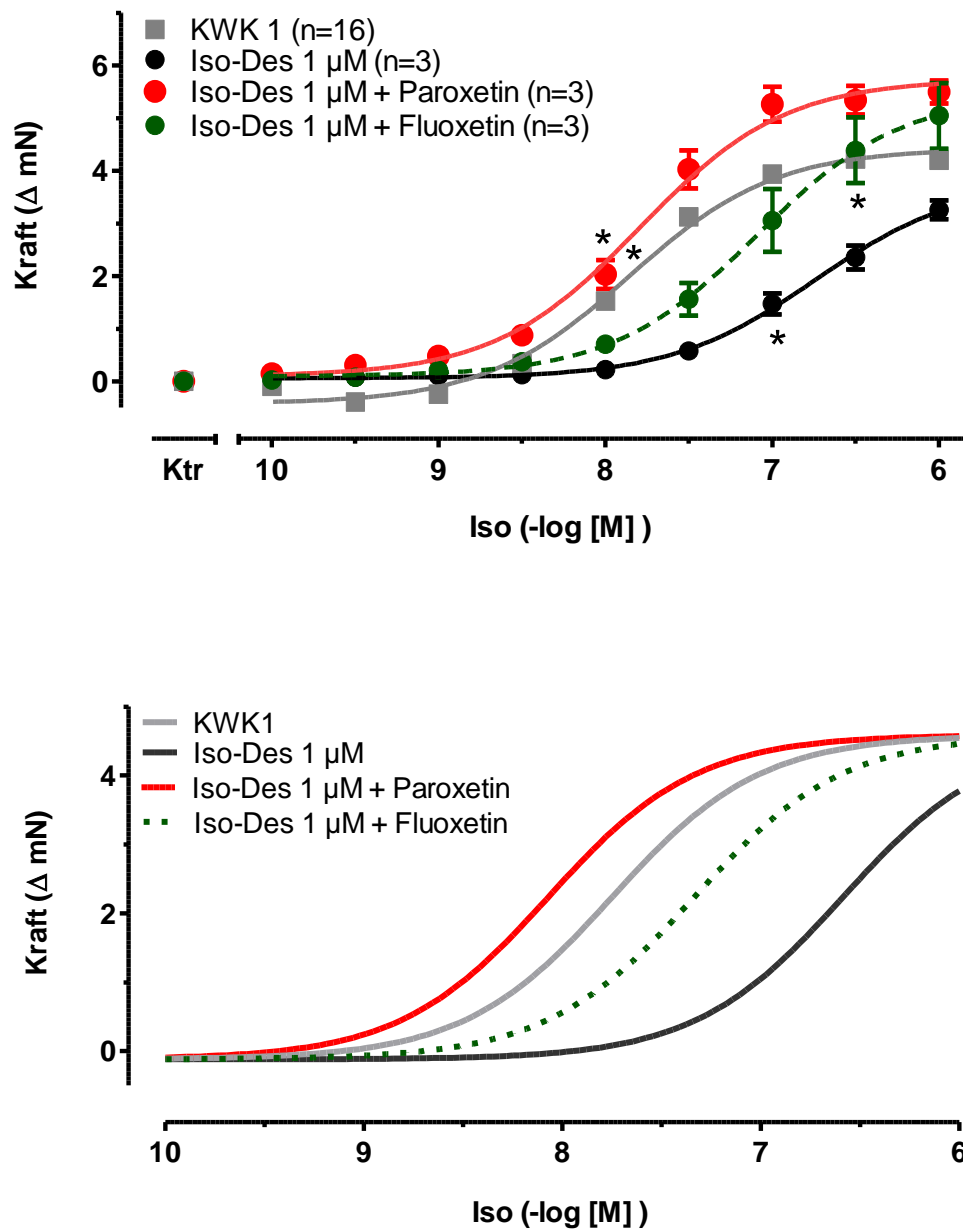


Abb. 8: Desensitivierung der β -Rezeptoren mit 1 μ M Isoprenalin

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM für die absolute Zunahme (Δ mN) der Kraft für kumulativ ansteigende Konzentrationen von Isoprenalin in linken Vorhöfen von WT für KWK1 sowie KWK2 nach Desensitivierung mit 1 μ M Isoprenalin, weiterhin nach Desensitivierung mit 1 μ M Isoprenalin in Gegenwart von Paroxetin oder Fluoxetin. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle (Ktr). Iso: Isoprenalin, Ordinate: Kraft, Abszisse: Isoprenalin-Konzentration.

Die untere Abbildung zeigt die Verschiebung der EC_{50} unter den verschiedenen Versuchsbedingungen (EC_{50} -Shift).

Mit Hilfe einer Fluoxetin-Versuchsgruppe sollte geklärt werden, ob diese Veränderungen im Kraftverhalten der Präparate von Wildtyp-Tieren durch Paroxetin durch dessen Wirkung als SSRI erklärt werden können. Die Mittelwerte für die Kraft lagen in der Fluoxetin-Gruppe vor der zweiten Konzentrationswirkungskurve für Isoprenalin bei $1,11 \pm 0,2$ mN ($n=3$). Diese Ausgangslage unterschied sich statistisch gegenüber keiner Vergleichsgruppe signifikant. Eine signifikante Zunahme der Kraft zeigte sich erst bei $0,3 \mu\text{M}$ Isoprenalin: $F = 6,16 \pm 1,26$ mN. Der pEC_{50} betrug $7,03 \pm 0,15$ ($p < 0,05$ vs. KWK1, $p < 0,05$ vs. Iso-Des $1 \mu\text{M}$ + Paroxetin, $p > 0,05$ vs. Iso-Des $1 \mu\text{M}$).

Eine Hemmung der Desensitivierung der β -Rezeptoren war durch Vorbehandlung mit Paroxetin, nicht aber durch Vorbehandlung mit Fluoxetin möglich (Abb. 8).

4.2.4 Desensitivierung mit $3 \mu\text{M}$ Isoprenalin

Die Vorhöfe in diesem Protokoll begannen die zweite Konzentrationswirkungskurve nach Inkubation mit $3 \mu\text{M}$ Isoprenalin für 60 Minuten und Badwechsel mit einer Kraft von $0,54 \pm 0,2$ mN ($n=3$). Damit war die Ausgangslage der Präparate zu diesem Zeitpunkt des Versuches signifikant geringer als zu Versuchsbeginn. Der erste signifikante Anstieg in der Kraftentwicklung zeigte sich erst bei einer Konzentration von $0,3 \mu\text{M}$ Isoprenalin im Bad, das heißt beim letzten Pipettierschritt vor der Maximaldosis. Die maximale Kraft war mit $4,6 \pm 1,7$ mN niedrig und auch der pEC_{50} mit $6,6 \pm 0,2$ vermindert. Diese Ergebnisse zeigen wiederum die Desensitivierung der Präparate (Abb. 9).

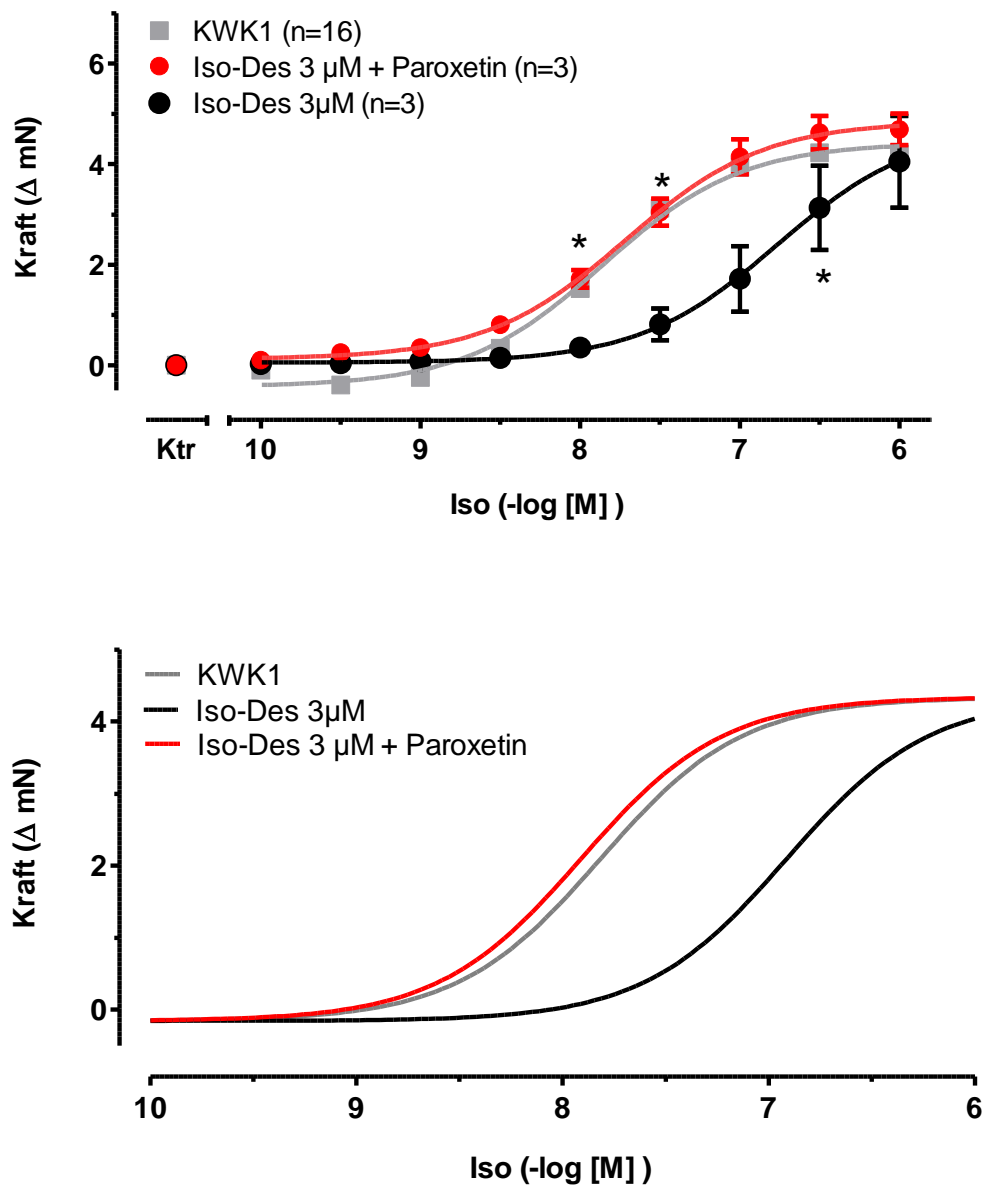


Abb. 9: Desensitivierung der β -Rezeptoren mit 3 μ M Isoprenalin

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM für die absolute Zunahme (Δ mN) der Kraft für kumulativ ansteigende Konzentrationen von Isoprenalin in linken Vorhöfen von WT für KWK1 sowie KWK2 nach Desensitivierung mit 3 μ M Isoprenalin, weiterhin nach Desensitivierung mit 3 μ M Isoprenalin in Gegenwart von Paroxetin. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle (Ktr). Iso: Isoprenalin, Ordinate: Kraft, Abszisse: Isoprenalin-Konzentration.

Die untere Abbildung zeigt die Verschiebung der EC₅₀ durch die Desensitivierung der Rezeptoren nach rechts und die nicht verschobene Kurve bei Einsatz von Paroxetin (EC₅₀-Shift).

Bei den zusätzlich mit 10 μM Paroxetin für 30 Minuten inkubierten Präparaten betrug die Kraft vor Beginn der zweiten Konzentrationswirkungskurve für Isoprenalin $2,2 \pm 0,6$ mN. Der erste signifikante Kraftanstieg erfolgte bei einer Konzentration von 30 nM Isoprenalin ($F = 5,24 \pm 1,38$ mN), das heißt früher als bei den desensitivierten Vorhöfen. Die maximale Kraft ($6,9 \pm 1,4$ mN) und der E_{max} ($4,69 \pm 0,88$ mN) zeigten weder einen signifikanten Unterschied gegenüber KWK1 noch gegenüber der Gruppe der mit 3 μM Isoprenalin desensitivierten Präparate. Der pEC_{50} war mit $7,7 \pm 0,12$ gegenüber der Desensitivierungsgruppe ($p < 0,05$), nicht aber gegenüber KWK1 signifikant verändert. Die Vorbehandlung mit Paroxetin war in der Lage, auch eine Desensitivierung durch mehr als 1 μM Isoprenalin zu hemmen (Abb. 9).

4.2.5 Desensitivierung mit 10 μM Isoprenalin

Nach Inkubation mit 10 μM Isoprenalin für 60 Minuten und mehrmaligen Badwechseln kontrahierten die Vorhöfe mit einer Kraft von $1,63 \pm 0,4$ mN ($n=3$). Der erste signifikante Anstieg der Kraft zeigte sich erst bei der maximalen Dosis Isoprenalin (1 μM): die Kraft betrug dann $6,5 \pm 1,6$ mN. Der pEC_{50} für diese Gruppe lag bei $6,55 \pm 0,08$ ($p < 0,05$ vs. KWK1). Diese Werte legen die Vermutung nahe, dass durch die höchste verwendete Konzentration Isoprenalin (10 μM) auch die deutlichste Desensitivierung stattgefunden hat, denn der signifikante Kraftanstieg erfolgte im Laufe der kumulativen Isoprenalin-Gaben am spätesten. Allerdings zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den EC_{50} der verschiedenen Desensitivierungsgruppen. Das heißt, die Desensitivierung wurde durch 1 μM Isoprenalin für 60 Minuten erreicht und ließ sich scheinbar durch Verwendung höherer Dosierungen nicht steigern.

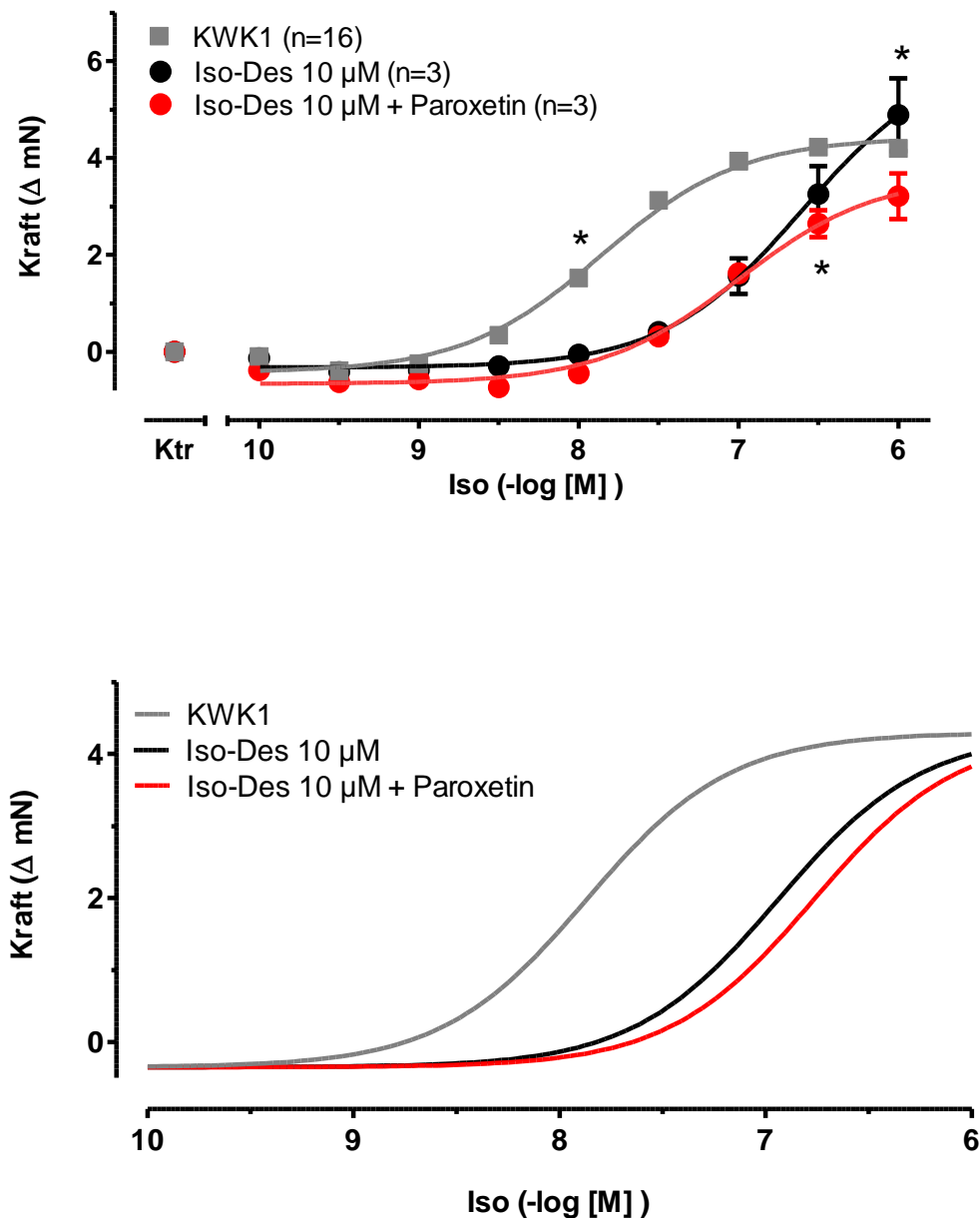


Abb. 10: Desensitivierung der β -Rezeptoren mit 10 μ M Isoprenalin

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM für die absolute Zunahme (Δ mN) der Kraft für kumulativ ansteigende Konzentrationen von Isoprenalin in linken Vorhöfen von WT für KWK1 sowie KWK2 nach Desensitivierung mit 10 μ M Isoprenalin, weiterhin nach Desensitivierung mit 10 μ M Isoprenalin in Gegenwart von Paroxetin. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle (Ktr). Iso: Isoprenalin, Ordinate: Kraft, Abszisse: Isoprenalin-Konzentration.

Die untere Abbildung zeigt die Verschiebung der EC₅₀ sowohl nach Desensitivierung als auch mit Einsatz von Paroxetin (EC₅₀-Shift).

Die Präparate aus der Paroxetin-Gruppe begannen die zweite Konzentrationswirkungskurve für Isoprenalin mit einer Kraft von $3,61 \pm 0,2$ mN ($n=3$). Ein signifikanter Kraftanstieg war bei einer Konzentration von $0,3 \mu\text{M}$ Isoprenalin zu verzeichnen. Die Kraft stieg im Verlauf auf maximal $6,8 \pm 0,68$ mN (E_{max} : $3,21 \pm 0,82$), der pEC_{50} betrug $7,0 \pm 0,17$ ($p < 0,05$ vs. KWK1, $p > 0,05$ vs. Iso-Des $10 \mu\text{M}$). Somit zeigte sich weder bezüglich des E_{max} noch bezüglich der EC_{50} ein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen Desensitivierung mit $10 \mu\text{M}$ Isoprenalin und Desensitivierung mit Paroxetin. Es fand also im Gegensatz zu den vorigen Experimenten keine Hemmung der Desensitivierung durch Paroxetin statt (Abb. 10).

4.2.6 Übersicht über die Ergebnisse von Versuchen mit Isoprenalin

Die Desensitivierung der β -Rezeptoren konnte durch alle drei verwendeten Konzentrationen Isoprenalin ($1 \mu\text{M}$, $3 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$) erreicht werden. Es kam bei allen Präparaten zu Verschiebung der EC_{50} und teilweise auch zur Reduktion der maximalen absoluten Kraft bzw. des E_{max} (siehe Tabelle 1 und 2). Bei Inkubation mit $1 \mu\text{M}$ und mit $3 \mu\text{M}$ Isoprenalin konnte die Desensitivierung durch Paroxetin verhindert werden, nicht aber bei Inkubation mit $10 \mu\text{M}$ Isoprenalin. Fluoxetin zeigte keinen hemmenden Einfluss auf die Desensitivierung.

Tabelle 1: Übersicht der Ergebnisse an rechten Vorhöfen von WT

Dargestellt sind der pEC₅₀-Wert, die maximale absolute Frequenz (in bpm) und der E_{max} als Differenz der Ausgangs- und Maximalfrequenz (in bpm) jeweils als Mittelwert der Einzelversuche für die erste Konzentrationswirkungskurve. Für die anderen Versuchsbedingungen war die Berechnung nicht möglich.

	pEC ₅₀	Maximale absolute Frequenz	E _{max}
KWK1	8,67 ± 0,09 *	605 ± 9	214 ± 14

KWK, Konzentrationswirkungskurve; Des, Desensitivierung; Iso, Isoprenalin;
* p<0,05 vs. KWK1 (linker Vorhof, siehe Tabelle 2)

Tabelle 2: Übersicht der Ergebnisse an linken Vorhöfen von WT

Dargestellt sind der pEC₅₀-Wert, die maximale absolute Kraft (in mN) und der E_{max} als Differenz der Ausgangs- und Maximalkraft (in mN) jeweils als Mittelwert der Einzelversuche für die verschiedenen Versuchsbedingungen.

	pEC ₅₀	Maximale absolute Kraft	E _{max}
KWK1	7,77 ± 0,06	7,14 ± 0,76 *	4,27 ± 0,47
Iso-Des 1 µM	6,78 ± 0,23 *	3,9 ± 0,26	3,25 ± 0,31
Iso-Des 1 µM + Paroxetin	7,78 ± 0,08	7,88 ± 0,9 *	5,88 ± 0,5 #
Iso-Des 1 µM + Fluoxetin	7,03 ± 0,15 *	6,16 ± 1,26	5,04 ± 1,08
Iso-Des 3 µM	6,6 ± 0,2 *	4,6 ± 1,7	4,04 ± 1,58
Iso-Des 3 µM + Paroxetin	7,7 ± 0,12	6,9 ± 1,4	4,69 ± 0,88
Iso-Des 10 µM	6,55 ± 0,08 *	6,5 ± 1,6	4,89 ± 1,3
Iso-Des 10 µM + Paroxetin	7,0 ± 0,17 *	6,8 ± 0,68	3,21 ± 0,82

KWK, Konzentrationswirkungskurve; Des, Desensitivierung; Iso, Isoprenalin;
* p<0,05 vs. KWK1; # p<0,05 vs. Iso-Des 1 µM

4.3 Kontraktionsversuche mit Serotonin

4.3.1 Positive Inotropie von Serotonin an linken Vorhöfen

Die Versuche zur Desensitivierung des humanen 5-HT_{4a}-Rezeptors fanden sowohl an TG als auch an WT statt (Abb. 16). Die Präparate der Wildtyp-Tiere zeigten keinen positiv inotropen Effekt auf Serotonin. Bei einer Basalkraft von $3,66 \pm 0,88$ mN ($n=6$) am Anfang des Versuchs (Abb. 11), betrug die Kraftentwicklung zum Ende der Konzentrationswirkungskurve für Serotonin noch $2,91 \pm 0,7$ mN. Dieser Unterschied war nicht signifikant und wurde daher als Abschleifen des Präparats mit der Zeit gewertet. Das zum Abschluss des Versuchs gegebene Isoprenalin führte zu einer Zunahme der Kraft auf $8,36 \pm 1,06$ mN ($p < 0,05$ vs. Kontrolle). Daher kann man davon ausgehen, dass sich die Präparate noch in einem vitalen Zustand befanden.

Die Ausgangskraft der linken Vorhöfe von transgenen Tieren lag zu Beginn des Versuchs bei $4,17 \pm 0,29$ mN ($n=35$). Damit war die Basalkraft signifikant größer als in der Wildtyp-Gruppe ($p < 0,05$, TG $n=35$, WT $n=17$).

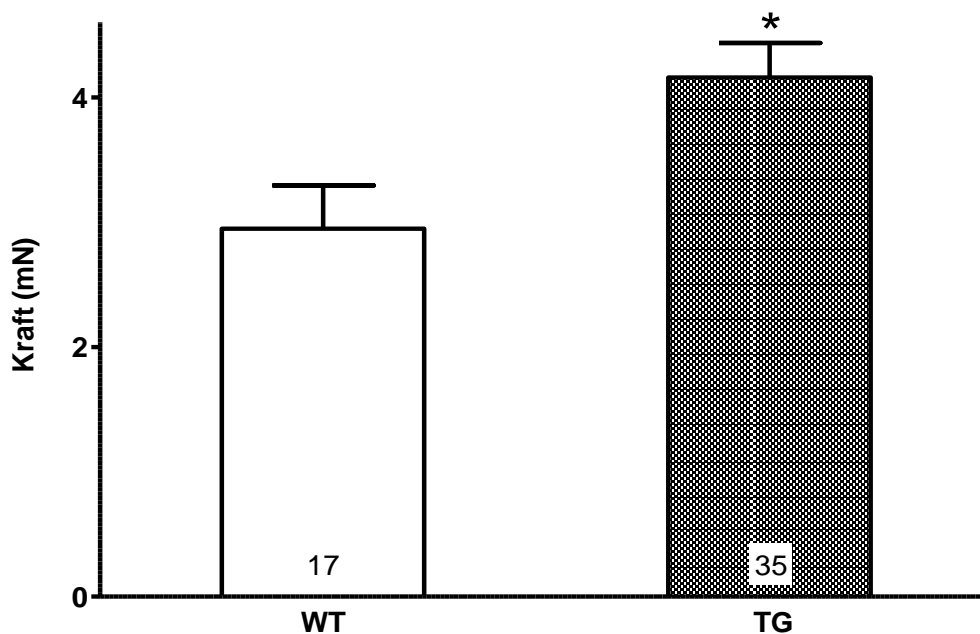


Abb. 11: Basalkraft von linken Vorhöfen von WT und TG

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der Kontraktionskraft von linken Vorhöfen im Vergleich von WT und TG unter Kontrollbedingungen (Versuchsbeginn, vor Substanzgabe). Die Zahl in den Säulen gibt die Zahl der untersuchten Präparate an. * $p < 0,05$ vs. WT

Während der kumulativen Konzentrationswirkungskurve für Serotonin an Vorhöfen von TG (von 1 nM bis 1 μ M) zeigte sich ein positiv inotroper Effekt, wobei der erste signifikante Anstieg der Kraft bei der niedrigsten Konzentration von Serotonin (1 nM) zu verzeichnen war. Die Differenz zur Ausgangslage betrug dabei $0,32 \pm 0,09$ mN ($p < 0,05$, $n = 35$). Die maximale absolute Kraft zeigte sich bei einer Konzentration von 0,1 μ M Serotonin ($9,32 \pm 0,48$ mN). Anschließend sank die Kraftamplitude trotz steigender Konzentrationen von Serotonin wieder leicht ab, wobei die Kraft bei maximaler Konzentration Serotonin (1 μ M) $8,72 \pm 0,46$ mN betrug. Dieses Absinken war signifikant. Der pEC_{50} betrug für diese erste Konzentrationswirkungskurve $8,14 \pm 0,06$.

4.3.2 Positive Chronotropie von Serotonin an rechten Vorhöfen

Die rechten Vorhöfe der transgenen Tiere kontrahierten zu Beginn der Versuchsaufzeichnung mit einer Frequenz von 431 ± 15 bpm (Abb. 12). Damit war die Basalfrequenz der Präparate von transgenen Tieren signifikant höher als die von Wildtyp-Mäusen ($p < 0,05$, WT $n = 16$, TG $n = 29$).

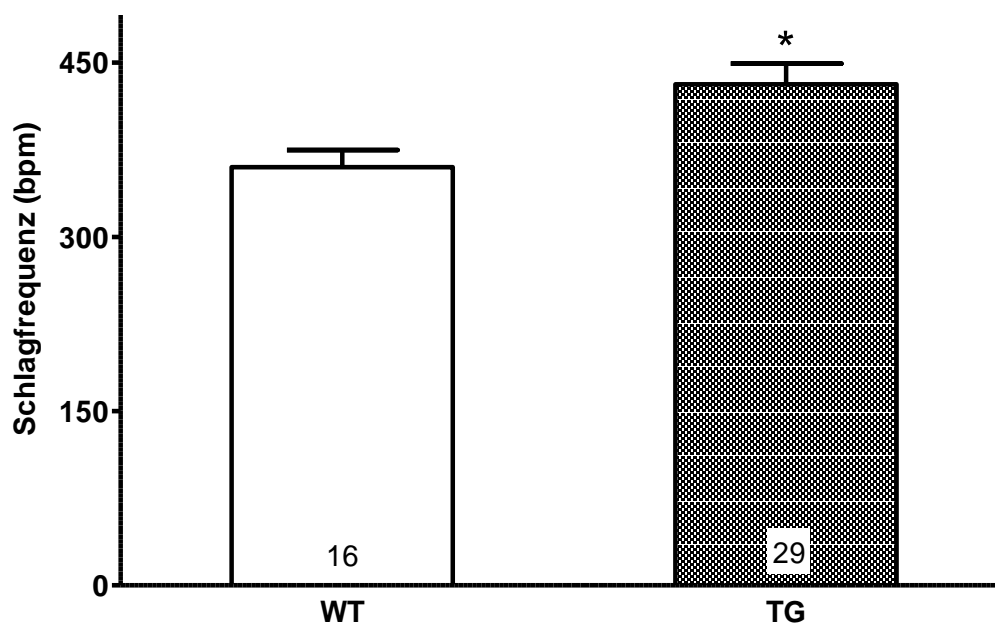


Abb. 12: Basalfrequenz von rechten Vorhöfen von WT und TG

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der Kontraktionsfrequenzen von rechten Vorhöfen im Vergleich von WT und TG unter Kontrollbedingungen (Versuchsbeginn, vor Substanzgabe). Die Zahl in den Säulen gibt die Zahl der untersuchten Präparate an. * $p < 0,05$ vs. WT

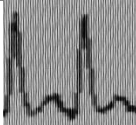
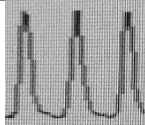
Die rechten Vorhöfe von Wildtyp-Tieren schlugen zu Beginn des Versuchs mit 363 ± 60 Schlägen pro Minute und am Ende der Konzentrationswirkungskurve für Serotonin mit 339 ± 53 ($n=4$). Somit zeigte sich kein positiv chronotroper Effekt für Serotonin an Wildtyp-Präparaten. Stattdessen zeigte sich eine leichte Abnahme der Frequenz, die aber gegenüber der Basalfrequenz nicht signifikant war. Somit ist von einem normalen Nachlassen des Präparats im Zeitverlauf auszugehen. Auf die abschließende Gabe von $1 \mu\text{M}$ Isoprenalin hin stieg die Frequenz auf 509 ± 56 bpm, was die Vitalität der Vorhöfe anzeigte ($p<0,05$, $n=4$).

Die rechten Vorhöfe von transgenen Mäusen schlugen anfangs mit einer Frequenz von 431 ± 15 Schlägen pro Minute ($n=29$). Der erste signifikante Anstieg der Frequenz zeigte sich bei der zweitniedrigsten Serotoninkonzentration (3 nM): die Vorhöfe schlugen dann durchschnittlich 455 ± 14 Mal in der Minute (siehe Abb. 15). Die maximale absolute Kraft lag bei 567 ± 16 Schlägen pro Minute (E_{max} : 149 ± 13 bpm) und der $p\text{EC}_{50}$ betrug $8,36 \pm 0,02$ ($n=23$). Die EC_{50} der rechten Vorhöfe war signifikant höher im Vergleich zu den linken Vorhöfen (Tabelle 4). Das heißt, dass wiederum der positiv chronotrope Effekt von Serotonin empfindlicher ist als der positiv inotrope Effekt.

Um eine mögliche Arrhythmie-Neigung von transgenen Präparaten zu quantifizieren, wurden die Basalarrhythmien pro Gruppe gezählt (Tabelle 3): von den rechten Vorhöfen von WT zeigten 5 von 26 Präparaten (19%) zu Versuchsbeginn Arrhythmien; bei TG waren es 14 von 54 (26%). Es handelte sich bei allen Arrhythmien um sogenannte späte Nachdepolarisationen (DAD). Es konnte mittels Fisher-Test keine statistische Signifikanz bei den Basalarrhythmien festgestellt werden. Allerdings konnte der Anteil der arrhythmischen rechten Vorhöfe durch Serotonin noch gesteigert werden: bei einer Konzentration von $0,3 \mu\text{M}$ Serotonin zeigten 28 von 54 Präparaten DAD-Arrhythmien ($p<0,05$ vs. basal).

Tabelle 3: Arrhythmien von rechten Vorhöfen von WT und TG unter Basalbedingungen

Es sind die Häufigkeiten von Arrhythmien vom Typ delayed afterdepolarization (DAD) = späte Nachdepolarisation von rechten Vorhöfen von WT und TG gegenübergestellt. Die eingefügten Bilder von Originalaufzeichnungen zeigen beispielhaft rhythmische und arrhythmische Kontraktionen. Es zeigte sich keine statistische Signifikanz zwischen den zwei Gruppen (Fisher-Test).

	DAD-Arrhythmie		Keine Arrhythmie	
WT	5		21	
TG	14		40	

4.3.3 Desensitivierung mit 1 μ M Serotonin: Inotropie

Die linken Vorhöfe begannen die zweite Konzentrationswirkungskurve mit einer Kraft von $1,65 \pm 0,16$ mN ($n=5$). Die Ausgangslage nach der ersten Konzentrationswirkungskurve, der Inkubation über 60 Minuten mit 1 μ M Serotonin und mehrmaligem Badwechsel war also signifikant geringer gegenüber der Ausgangslage zu Versuchsbeginn ($p<0,05$). Auf die kumulativen Gaben von Serotonin hin reagierten die Präparate erneut mit einem Kraftanstieg. Der erste signifikante Anstieg zeigte sich dabei bei einer Konzentration von 30 nM, das heißt drei Pipettierschritte später als in KWK1. Die Kraft stieg auf maximal $7,6 \pm 0,7$ mN bei einer Konzentration von 0,3 μ M Serotonin und sank daraufhin noch einmal leicht ab auf $6,3 \pm 0,54$ bei 1 μ M Serotonin. Dieser signifikante Abfall der Kraft bei der höchsten Dosis Serotonin zeigte sich auch in den anderen Versuchsgruppen. E_{\max} ($6,1 \pm 0,68$ mN) war in dieser Versuchsgruppe nicht signifikant reduziert gegenüber KWK1. Der Versuch endete mit der Gabe von 1 μ M Isoprenalin. Es zeigte sich daraufhin ein erneuter Kraftanstieg auf $9,19 \pm 0,86$, der signifikant gegenüber der vorherigen Kraftentwicklung war, nicht aber gegenüber der maximalen absoluten Kraft für Serotonin. Die maximale Kontraktionskraft wurde durch Serotonin erreicht und konnte durch Isoprenalin nicht noch erhöht werden. Der pEC_{50} war mit $7,69 \pm 0,1$ signifikant niedriger im

Vergleich zu KWK1 ($p < 0,05$). Man kann daher von einer Desensitivierung der Rezeptoren durch die Gabe von $1 \mu\text{M}$ Serotonin für 60 Minuten ausgehen (Abb. 13).

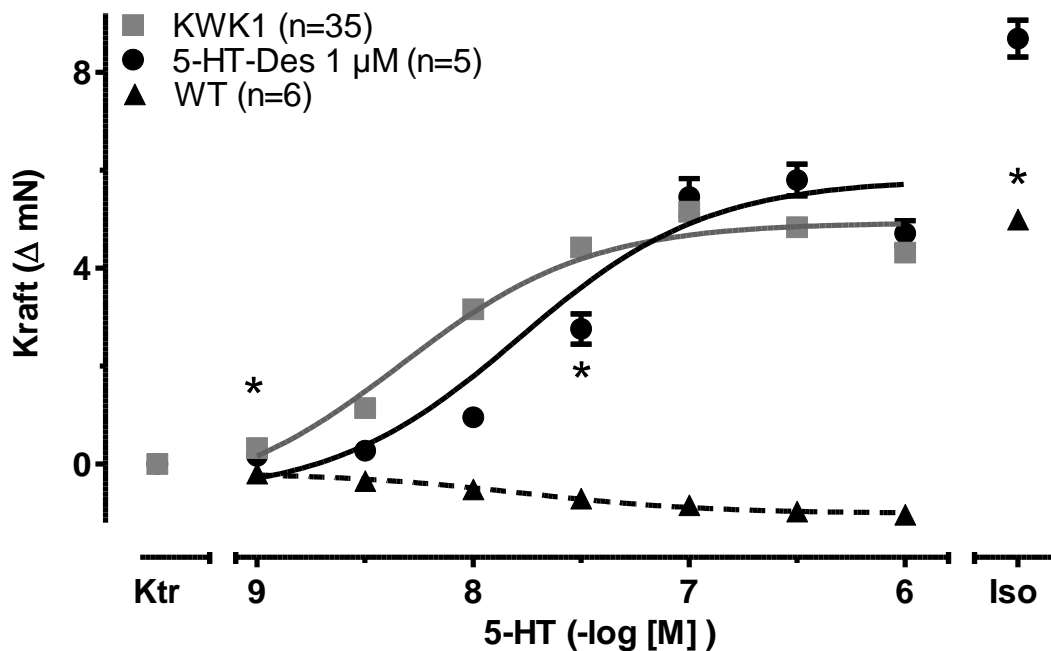


Abb. 13: Desensitivierung mit $1 \mu\text{M}$ Serotonin: Inotropie

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM für die absolute Zunahme (ΔmN) der Kraft für kumulativ ansteigende Konzentrationen von Serotonin in linken Vorhöfen von TG für KWK1 sowie KWK2 nach Desensitivierung mit $1 \mu\text{M}$ Serotonin sowie WT-Kontrollversuche. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle (Ktr). Iso: Isoprenalin, Ordinate: Kraft, Abszisse: 5-HT-Konzentration.

Die Gruppe der mit Paroxetin ($10 \mu\text{M}$, 30 Minuten) vorbehandelten Präparate begannen die zweite Konzentrationswirkungskurve mit $3,92 \pm 0,67 \text{ mN}$ ($n=5$). Die Ausgangslage war im Vergleich zu Versuchsbeginn nicht signifikant geringer, aber signifikant höher als in der zuvor beschriebenen Gruppe ohne Paroxetin-Vorbehandlung. Auch für diese Präparate wurde eine Konzentrationswirkungskurve mit kumulative Gaben von Serotonin aufgezeichnet. Dabei zeigte sich der erste signifikante Kraftanstieg bei einer Konzentration von 3 nM Serotonin. Das heißt der erste signifikante Anstieg zeigte sich einen Schritt später als in KWK1, aber zwei Schritte früher als in der Gruppe desensitiverter Präparate. Die maximale absolute Kraft zeigten die Präparate bei $0,1 \mu\text{M}$ Serotonin ($F = 9,9 \pm 1,05 \text{ mN}$). Auch in dieser Gruppe zeigte sich wieder eine Abnahme der Kraft trotz steigender Dosis

Serotonin. Allerdings war diese Abnahme deutlich geringer ausgeprägt als in der Gruppe der desensitivierten Präparate und die Abnahme war auch nicht signifikant. Der pEC_{50} zeigte sich mit $7,9 \pm 0,07$ signifikant höher im Vergleich zur Desensitivierungs-Gruppe, aber signifikant unverändert gegenüber KWK1. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass der Einsatz von Paroxetin zusätzlich zu Serotonin in der Lage sein könnte, die Desensitivierung des 5-HT_{4a}-Rezeptors zumindest teilweise zu verhindern, denn die Verschiebung der $-\log EC_{50}$ konnte in geringem Maße aufgehoben werden (Abb. 14).

Um zu klären, ob Paroxetin seine Effekte durch seine Wirkung als SSRI erzielte, wurde eine Kontrolle mit Fluoxetin durchgeführt. Fluoxetin wurde in derselben Konzentration und Inkubationsdauer eingesetzt wie Paroxetin (10 μ M, 30 Minuten). Die Präparate der Fluoxetin-Kontrollgruppe begannen den Versuchsteil der 2. KWK mit $1,18 \pm 0,26$ mN (n=4). Diese Ausgangslage war signifikant niedriger als zu Versuchsbeginn ($p < 0,05$). Auch diese Gruppe von Vorhöfen erhielt kumulative Serotonin-Gaben, die einen Kraftanstieg hervorriefen. Der erste signifikante Unterschied in der Kraftentwicklung zeigte sich bei 30 nM Serotonin, das heißt zum gleichen Zeitpunkt wie die Desensitivierungs-Gruppe. Die maximale absolute Kraft zeigte sich bei einer Konzentration von 0,1 μ M beziehungsweise 0,3 μ M (identische Kraft bei beiden Konzentrationen) und betrug $6,13 \pm 1,24$ mN. Auch in dieser Gruppe sank die Kraft trotz steigender Serotonin-Konzentrationen leicht ab, was nicht signifikant war. Auf die Gabe von Isoprenalin (1 μ M) stieg die Kraft noch einmal an auf $6,66 \pm 1,2$ mN, was gegenüber der vorherigen Kraft signifikant erhöht war, nicht aber gegenüber maximalen absoluten Kraft für Serotonin. Der pEC_{50} war mit $7,75 \pm 0,12$ gegenüber KWK1, nicht aber gegenüber Paroxetin oder Desensitivierung signifikant verschoben. Es zeigte sich also kein hemmender Einfluss von Fluoxetin auf die Desensitivierung durch 1 μ M Serotonin (Abb. 14).

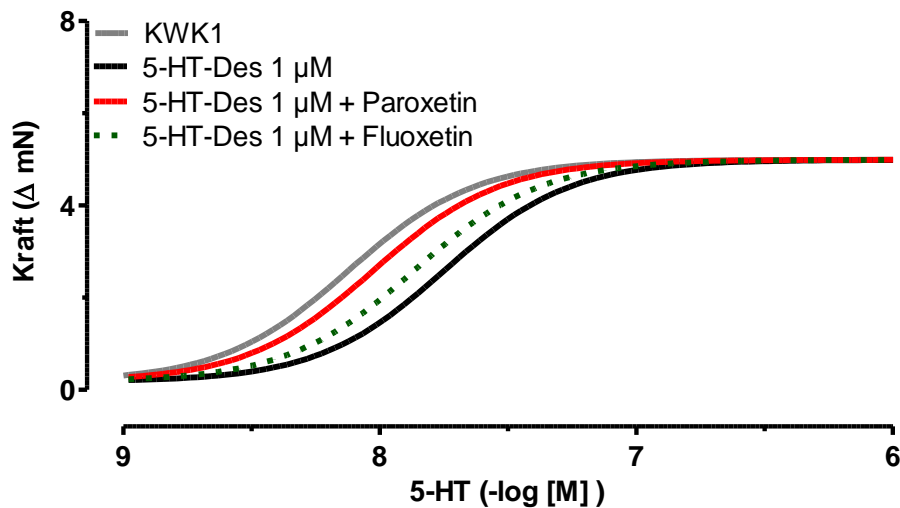
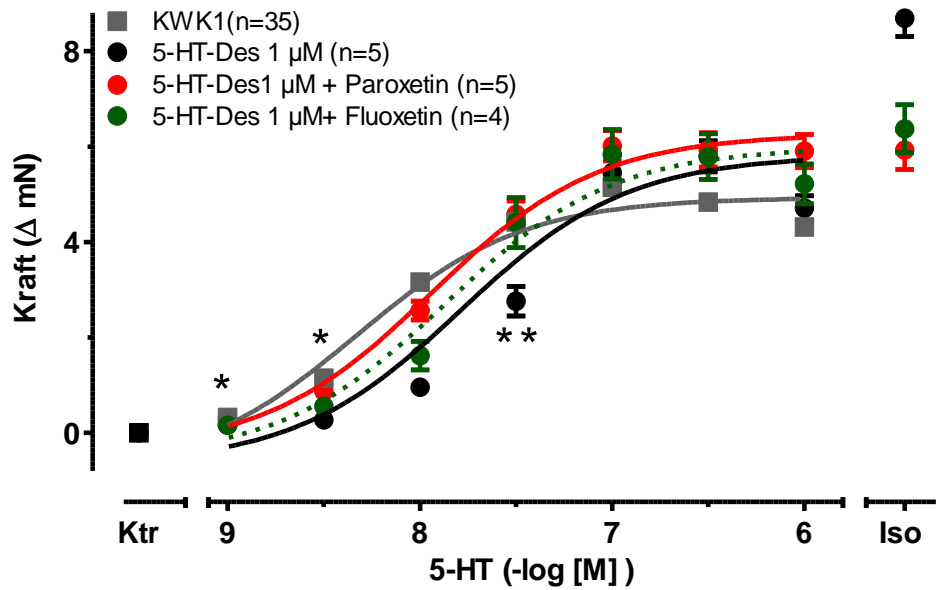


Abb. 14: Einfluss von Paroxetin und Fluoxetin auf die Desensitivierung mit 1 μ M Serotonin

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM für die absolute Zunahme (Δ mN) der Kraft für kumulativ ansteigende Konzentrationen von Serotonin in linken Vorhöfen von TG für KWK1 sowie KWK2 nach Desensitivierung mit 1 μ M Serotonin sowie Desensitivierung in Anwesenheit von Paroxetin und Fluoxetin, weiterhin WT-Kontrollversuche. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle (Ktr). Iso: Isoprenaline, Ordinate: Kraft, Abszisse: 5-HT-Konzentration.

Die untere Abbildung zeigt die Verschiebung der EC_{50} -Kurven unter den verschiedenen Bedingungen (EC_{50} -Shift).

4.3.4 Desensitivierung mit 1 μ M Serotonin: Chronotropie

Für die rechten Vorhöfe konnte bei Inkubation mit 1 μ M Serotonin für 60 Minuten ebenfalls eine Desensitivierung gezeigt werden (Tabelle 4): Die rechten Vorhöfe schlugen zu Beginn der zweiten KWK mit 363 ± 33 bpm ($n=3$). Der erste signifikante Frequenzanstieg zeigte sich bei einer Serotoninkonzentration von 30 nM und in Höhe von 89 ± 14 bpm. Die maximale Frequenz betrug 497 ± 21 bpm bei 1 μ M Serotonin im Bad und ließ sich durch Isoprenalin nicht weiter steigern. Der pEC_{50} war $7,76 \pm 0,25$ und die Kurve somit signifikant rechtsverschoben gegenüber KWK1 (Abb. 15).

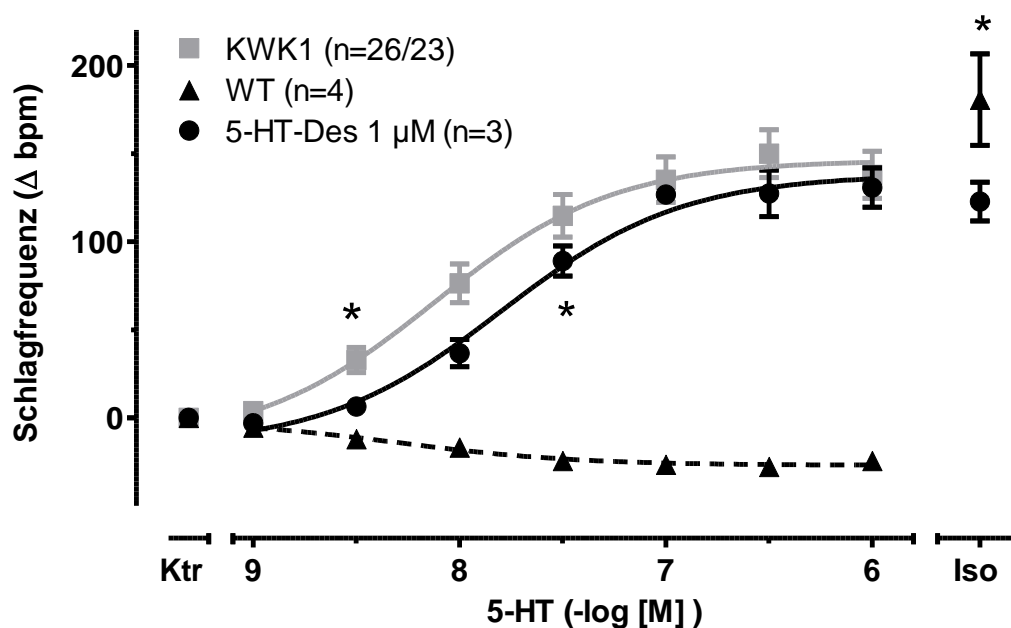


Abb. 15: Desensitivierung mit 1 μ M Serotonin: Chronotropie

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM für die absolute Zunahme (Δ bpm) der Schlagfrequenz für kumulativ ansteigende Konzentrationen von Serotonin in spontan kontrahierenden rechten Vorhöfen von TG für KWK1 sowie KWK2 nach Desensitivierung mit 1 μ M Serotonin sowie Kontrollversuche an WT-Präparaten. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle (Ktr). Iso: Isoprenalin, Ordinate: Frequenz, Abszisse: 5-HT-Konzentration.

4.3.5 Desensitivierung mit 10 μ M Serotonin

Nach der Inkubation mit 10 μM 5-HT für 60 Minuten und mindestens dreimaligem Badwechsel zeigten die linken Vorhöfe eine Kraftentwicklung von $1,28 \pm 0,32$ mN ($n=3$). Somit war die Ausgangslage signifikant geringer als zu Beginn des Versuchs ($p<0,05$). Im Verlauf fand eine erneute Konzentrationswirkungskurve für Serotonin mit identischen Dosierungen wie im ersten Teil des Versuches statt. Dabei kam es zur signifikanten Zunahme der Kraft bei einer Konzentration von 30 nM Serotonin, das heißt ein Pipettierschritt später als in KWK1 und zum gleichen Zeitpunkt wie nach der Desensitivierung mit 1 μM Serotonin. Die maximale absolute Kraft von $4,33 \pm 0,57$ mN zeigte sich bei einer Konzentration von 0,3 μM Serotonin. Anschließend, bei der höchsten Konzentration Serotonin (1 μM), sank die Kraft etwas ab auf $4,07 \pm 0,62$ mN. Dieser Kraftabfall trotz steigender Konzentrationen der positiv inotropen Substanz ließ sich bereits in anderen Konzentrationswirkungskurven registrieren und war in dieser Gruppe signifikant (Abb. 17).

Nichtsdestotrotz waren sowohl die maximale absolute Kraft als auch der E_{max} gegenüber der Kontrolle (KWK1) signifikant geringer ($p<0,05$, $n=3$). Ebenso kam es zu einem signifikanten Unterschied beim $p\text{EC}_{50}$ -Wert, der für die Gruppe der desensitvierten Vorhöfe in KWK2 $7,5 \pm 0,08$ betrug ($p<0,05$ vs. KWK1, $n=3$). Auf die abschließende Gabe von 1 μM Isoprenalin hin stieg die Kraft nochmals leicht an auf $5,3 \pm 0,6$ mN, was allerdings nicht signifikant war. Das bedeutet, dass die maximale Kraftentwicklung durch maximale Gaben von Serotonin erreicht wurde (Abb. 17).

Insgesamt zeigte sich auch ein signifikanter Unterschied im Vergleich der EC_{50} -Werte und der Werte für E_{max} von mit 1 μM Serotonin und von mit 10 μM Serotonin desensitvierten Präparaten: der Einsatz von 10 μM Serotonin hatte also eine stärkere Desensitivierung zur Folge. Zusätzlich war nach Inkubation mit 10 μM Serotonin auch der maximale Effekt in der KWK2 gegenüber KWK1 abgeschwächt (Tabelle 5).

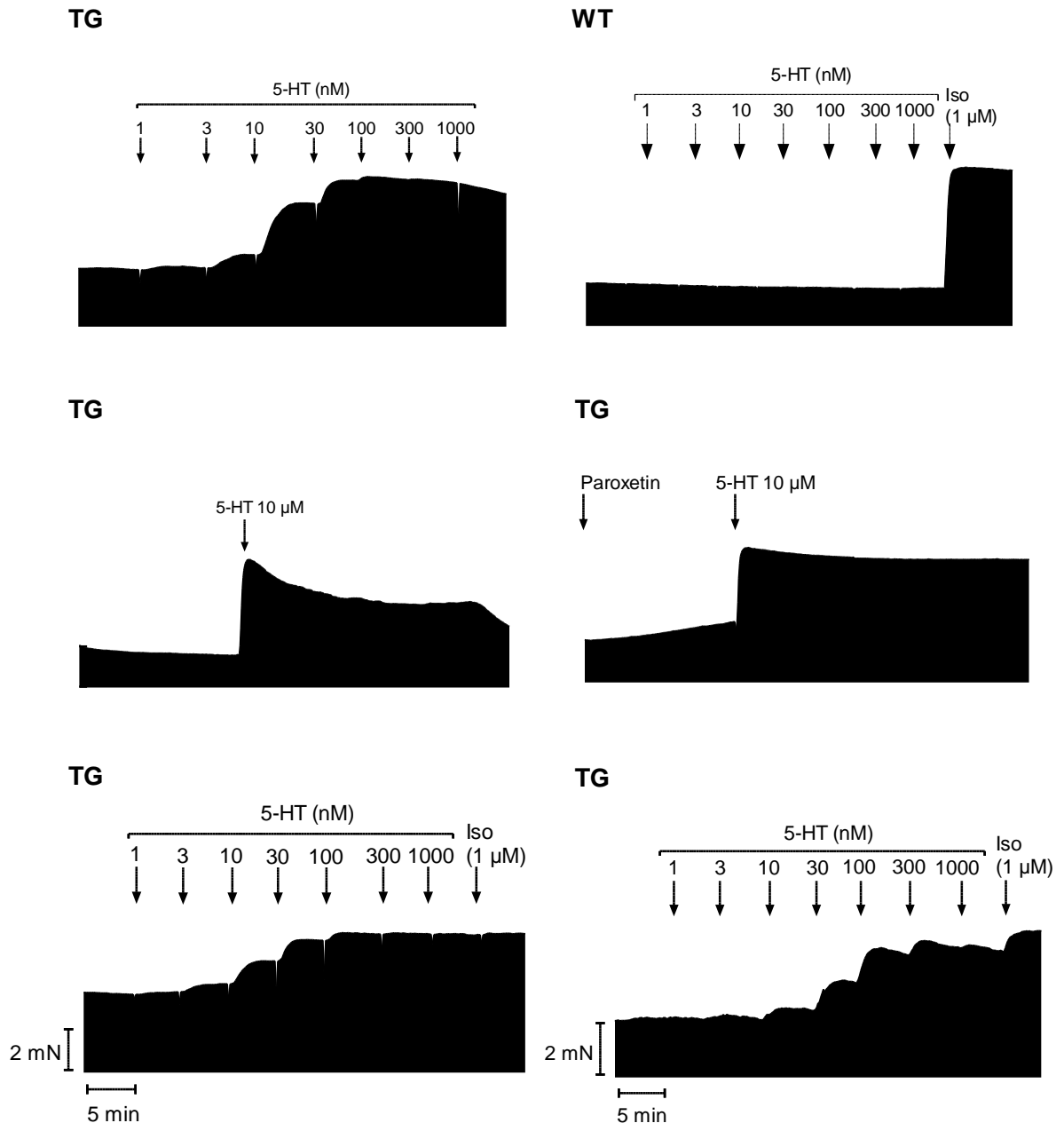


Abb. 16: Originalmechanogramme von linken Vorhöfen von WT und TG

Dargestellt sind Originalaufzeichnungen von Kraft über die Zeit von linken Vorhöfen von TG und WT. Linke Vorhöfe von TG reagierten auf Serotonin-Gaben positiv inotrop. WT-Vorhöfe zeigten nur auf Isoprenalin, nicht aber auf Serotonin hin eine Zunahme der Kontraktionskraft (oben rechts). Während der einstündigen Inkubation mit 10 μM Serotonin (an TG) kam es zur zeitlichen Abschwächung des positiv inotropen Effekts (mittlere Mechanogramme). Paroxetin allein bewirkte eine langsame Zunahme der Kraft. In KWK2 (untere Mechanogramme) zeigte sich bei dem desensitivierten Präparat (unten links) ein späteres und ein geringeres Ansprechen auf Serotonin im Vergleich zur ersten KWK (oben links) beziehungsweise zum mit Paroxetin behandelten Vorhof (unten rechts). Die Pfeile kennzeichnen jeweils die Substanzzugabe.

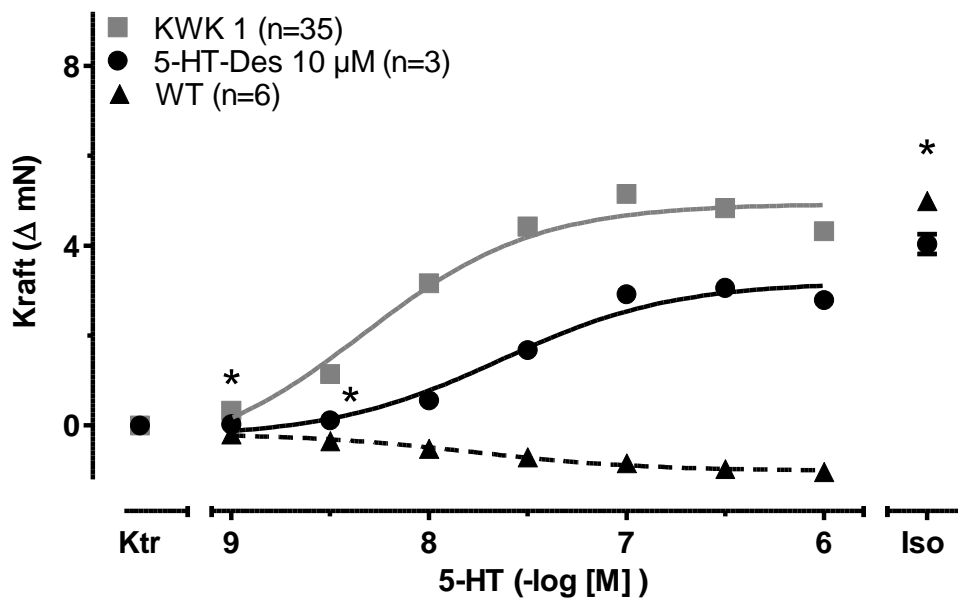


Abb. 17: Desensitivierung mit 10 μM Serotonin

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM für die absolute Zunahme (ΔmN) der Kraft für kumulativ ansteigende Konzentrationen von Serotonin in linken Vorhöfen von TG für KWK1 sowie KWK2 nach Desensitivierung mit 10 μM Serotonin sowie Kontrollen an WT. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle (Ktr). Iso: Isoprenalin, Ordinate: Kraft, Abszisse: 5-HT-Konzentration.

Die Gruppe von Vorhöfen, die nach der ersten Konzentrationswirkungskurve mit Serotonin für 30 Minuten mit 10 μM Paroxetin und danach zusätzlich mit 10 μM Serotonin für 60 Minuten inkubiert wurden, wies vor Beginn der zweiten Konzentrationswirkungskurve eine Kraft von $4,03 \pm 0,82$ auf ($n=4$). Damit lag dieser Wert signifikant höher als bei den desensitvierten Präparaten ($p < 0,05$), aber nicht signifikant verändert gegenüber der Ausgangslage aller transgenen Vorhöfe zu Versuchsbeginn ($p > 0,05$, $n=35$). Im Laufe der zweiten Konzentrationswirkungskurve mit Serotonin (wieder 1 nM bis 1 μM), stieg die Kraft erstmals signifikant bei einer Konzentration von 10 nM Serotonin. Die maximale absolute Kraft zeigte sich auch hier nicht bei der maximalen Konzentration Serotonin, sondern bei 0,3 μM und betrug dann $9,17 \pm 1,2$. Anschließend sank die Kraft leicht ab, was allerdings nicht signifikant war. Auf die Gabe von 1 μM Isoprenalin hin ließ sich die Kraft leicht steigern, allerdings im Vergleich zur maximalen absoluten Kraft für Serotonin nicht signifikant erhöhen. Der $p\text{EC}_{50}$ für die Paroxetin-Gruppe betrug $7,88 \pm$

0,1 und der Unterschied gegenüber der EC_{50} (5-HT-Des 10 μ M) war signifikant. Das bedeutet, dass auch bei der Verwendung einer höheren Konzentration Serotonin die Desensitivierung der 5-HT_{4a}-Rezeptoren durch Paroxetin gehemmt werden konnte (Abb. 18).

Um bei diesem Effekt zwischen einer Wirkung als SSRI und einer hemmenden Wirkung auf die GRK2 unterscheiden zu können, wurde das gleiche Versuchsprotokoll noch einmal mit derselben Konzentration Fluoxetin (10 μ M) durchgeführt. Die Kraft zu Beginn von KWK 2 betrug $1,5 \pm 0,58$ mN ($n=3$) und verhielt sich somit signifikant geringer als zu Beginn von KWK1. Die Kraft stieg im Verlauf auf maximal $4,28 \pm 0,37$ mN (bei 0,3 μ M Serotonin, erster signifikanter Kraftanstieg bei 0,1 μ M). Der E_{max} war mit $2,54 \pm 0,43$ signifikant geringer als in KWK1. Der pEC_{50} betrug für die Fluoxetin-Gruppe $7,28 \pm 0,09$ ($p < 0,05$ vs. 5-HT-Des 10 μ M + Paroxetin, $p > 0,05$ vs. 5-HT-Des 10 μ M). Daraus ergibt sich keine Hemmung der Desensitivierung durch Fluoxetin (Abb. 18).

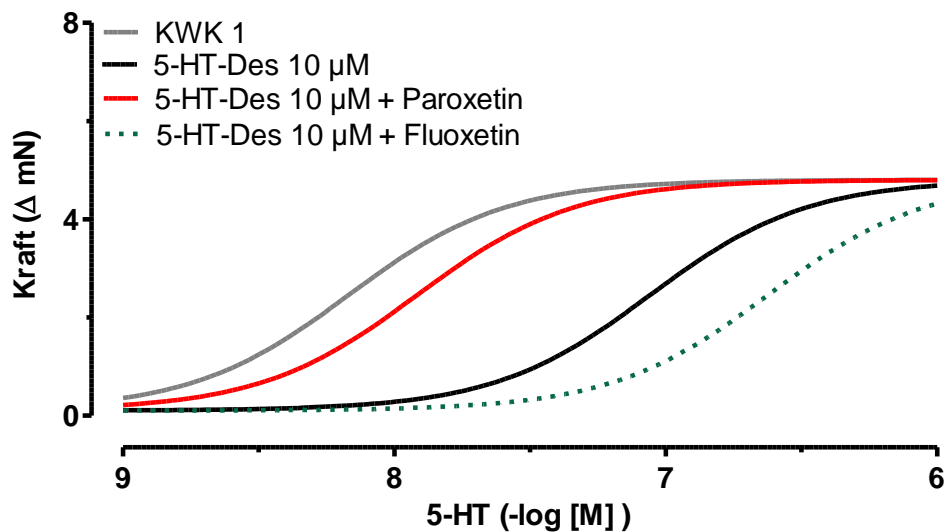
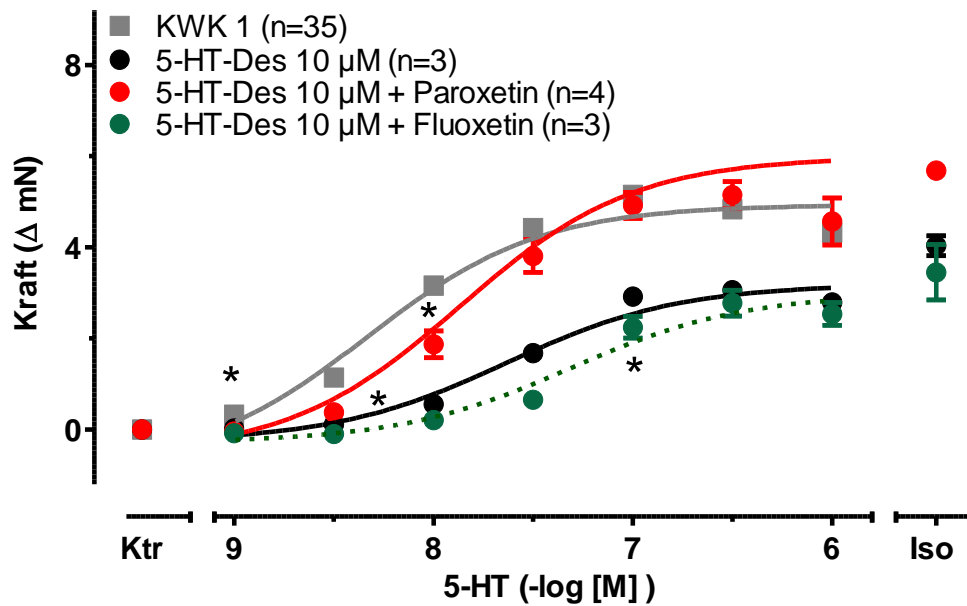


Abb. 18: Einfluss von Paroxetin und Fluoxetin auf die Desensitivierung 10 μM Serotonin

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM für die absolute Zunahme (ΔmN) der Kraft für kumulativ ansteigende Konzentrationen von Serotonin in linken Vorhöfen von TG für KWK1 sowie KWK2 nach Desensitivierung mit 10 μM Serotonin, weiterhin nach Desensitivierung mit 10 μM Serotonin in Gegenwart von Paroxetin und Fluoxetin. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle (Ktr). Iso: Isoprenalin, Ordinate: Kraft, Abszisse: 5-HT-Konzentration.

Die untere Abbildung zeigt die Verschiebung der EC_{50} -Kurven unter den verschiedenen Versuchsbedingungen (EC_{50} -Shift).

4.3.6 Hemmung der GRK2 durch Zinkchlorid

In der Vergangenheit wurde die GRK2 in vitro auch durch Zinkchlorid gehemmt (Benovic et al. 1987). Ein hemmender Einfluss auf die Desensitivierung des 5-HT_{4a}-Rezeptors in der transgenen Maus konnte aber bisher nicht sicher gezeigt werden (Frenker 2013). Da nun die Ergebnisse aus den Versuchen mit Paroxetin eine große Bedeutung der GRK2 für die Desensitivierung vermuten ließen, schien es interessant, die Hemmung der GRK2 durch Zinkchlorid nochmals zu prüfen. Allerdings kamen in den folgenden Versuchen weitaus geringere Konzentrationen (sowohl von Serotonin als auch von Zinkchlorid) als in der vorangegangenen Arbeit (Frenker 2013) zum Einsatz. Die Präparate erhielten erst eine Serotonin-KWK wie üblich, anschließend Badwechsel und Inkubation mit 25 µM ZnCl₂ für 60 Minuten, dann die Inkubation mit 10 µM Serotonin für 60 Minuten, daraufhin Badwechsel und erneute Serotonin-KWK. Diese Präparate begannen die zweite KWK mit einer Kraft von $2,04 \pm 0,4$ mN (n=6). Im Verlauf stieg die Kraft auf maximal $4,04 \pm 0,7$ mN bei 1 µM Serotonin im Bad, wobei sich auch die erste und somit einzige statistische Signifikanz gegenüber der Ausgangslage bei dieser maximalen Konzentration Serotonin zeigte ($p < 0,05$). Auf die Gabe von 1 µM Isoprenalin stieg die Kraft nochmals signifikant auf $5,03 \pm 0,85$ mN ($p < 0,05$). Der pEC₅₀ betrug $6,45 \pm 0,29$. Somit zeigte sich keine Hemmung der Desensitivierung, sondern im Gegenteil waren die mit Zinkchlorid behandelten Präparate signifikant noch weniger empfindlich für Serotonin als alle ihre Vergleichsgruppen (Abb. 19).

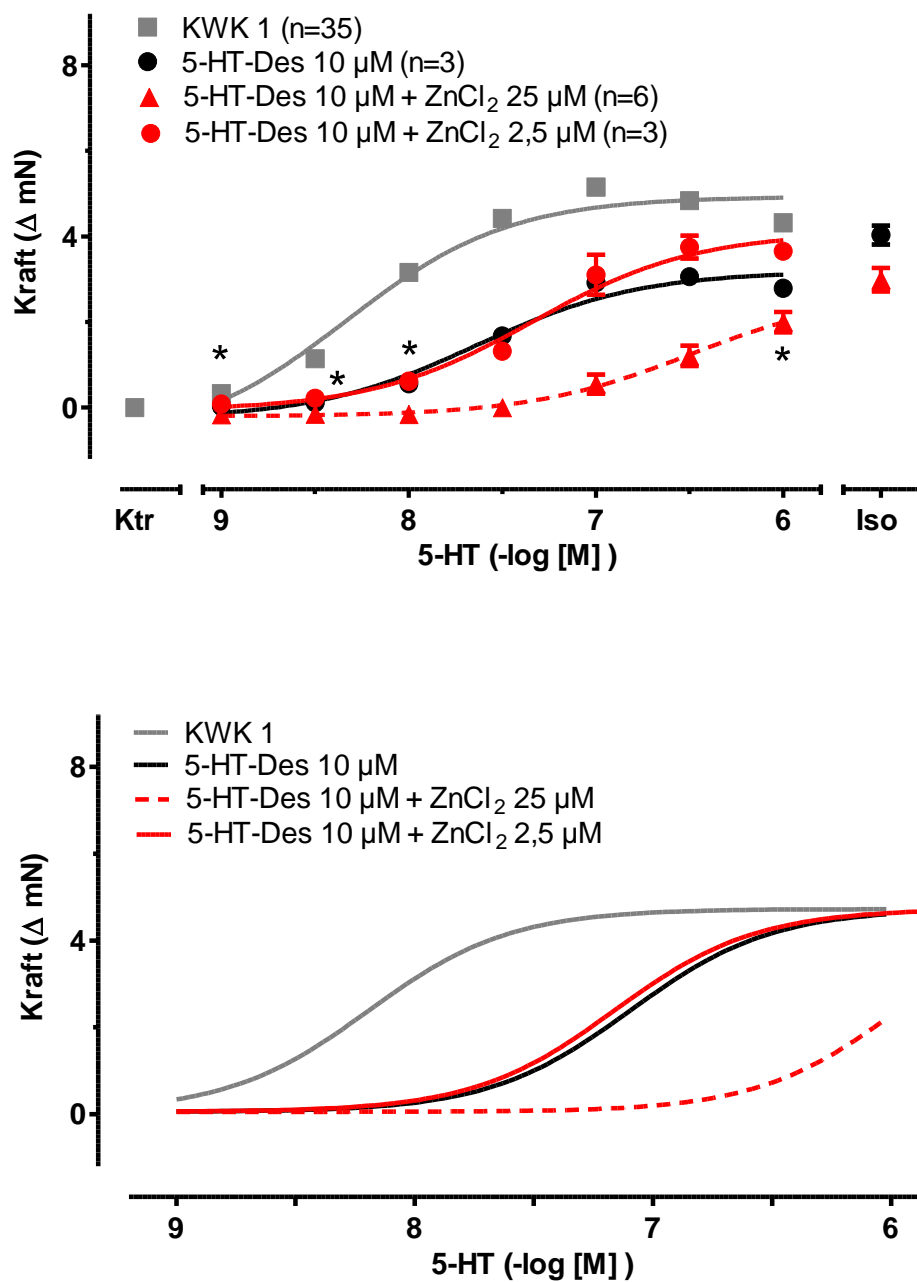


Abb. 19: Einfluss von Zinkchlorid auf die Desensitivierung mit 10 μM Serotonin

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM für die absolute Zunahme (ΔmN) der Kraft für kumulativ ansteigende Konzentrationen von Serotonin in linken Vorhöfen von TG für KWK1 sowie KWK2 nach Desensitivierung mit 10 μM Serotonin, weiterhin nach Desensitivierung mit 10 μM Serotonin in Gegenwart verschiedener Zinkchlorid-Konzentrationen. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle (Ktr). Iso, Isoprenalin, Ordinate: Kraft, Abszisse: 5-HT-Konzentration.

Die untere Abbildung zeigt die Verschiebung der EC_{50} unter den verschiedenen Versuchsbedingungen.

In einem weiteren Protokoll mit nochmals auf 2,5 μM reduzierter Konzentration Zinkchlorid zeigten sich folgende Ergebnisse: die Vorhöfe zeigten unter Kontrollbedingungen eine Kraft von $2,7 \pm 0,64$ mN ($n=4$). Im Verlauf stieg die Kraft, wobei sich der erste signifikante Kraftanstieg bereits bei 10 nM zeigte und die maximale absolute Kraft bei $6,49 \pm 1,2$ mN bei 1 μM Serotonin im Bad lag. Auf die Gabe von 1 μM Isoprenalin hin stieg die Kraft auf $7,8 \pm 1,68$ mN, was allerdings nicht signifikant war. Der pEC_{50} -Wert betrug für diese Gruppe $7,26 \pm 0,22$ ($p < 0,05$ vs. KWK1 und vs. Paroxetin). Somit konnte mit dem Einsatz von Zinkchlorid bei keiner der verwendeten Konzentrationen eine Hemmung der Desensitivierung der 5-HT_{4a}-Rezeptoren erzielt werden.

4.3.7 Negative Inotropie von Zinkchlorid

Bei der Auswertung der Daten von mit 25 μM Zinkchlorid behandelten Muskelpräparaten zeigte sich nicht nur die oben beschriebene geringe positiv inotrope Antwort auf Serotonin. Auch reagierten die Präparate auf die Gabe von Zinkchlorid mit einem Abfall der Kraft (Abb. 20): kontrahierten die linken Vorhöfe zunächst mit einer Kraft von $2,78 \pm 0,28$ mN ($n=14$), betrug die Kraftentwicklung nach 60 Minuten Inkubation mit 25 μM Zinkchlorid nur noch $1,02 \pm 0,28$ mN ($n=5$, $p < 0,05$ vs. Kontrolle). Beim Einsatz von 2,5 μM Zinkchlorid zeigten sich dahingegen keine signifikanten Unterschiede (Kraft nach 60 Minuten $2,95 \pm 0,47$ mN, $n=9$).

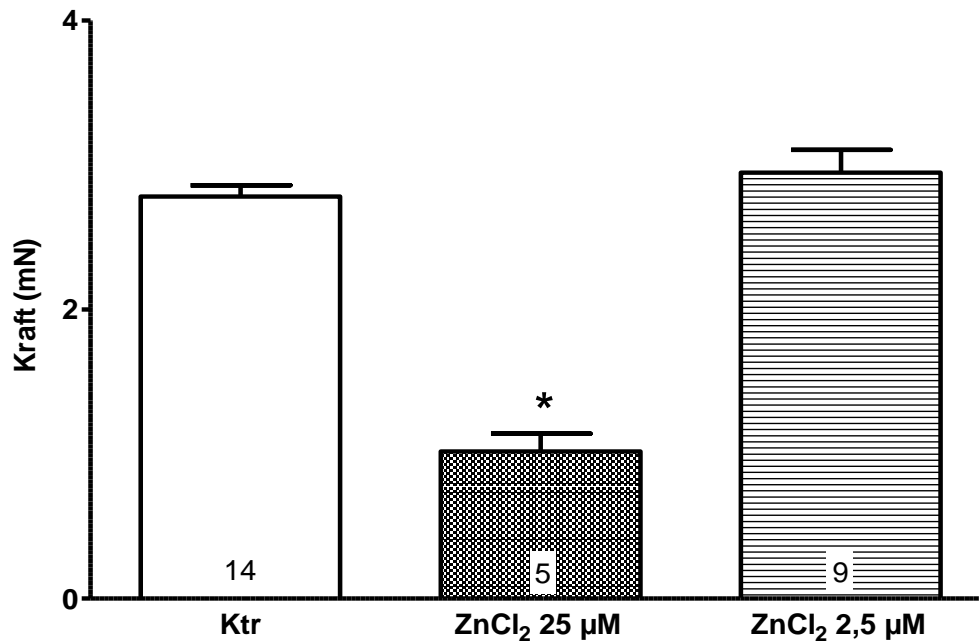


Abb. 20: Negative Inotropie von Zinkchlorid

Dargestellt ist die absolute Kraft von linken Vorhöfen von TG in mN vor (Ktr) und nach 60minütiger Inkubation mit Zinkchlorid in zwei verschiedenen Konzentrationen.* $p < 0,05$ vs. Kontrolle. Die Zahlen in den Säulen geben die Anzahl der untersuchten Präparate an.

4.3.8 Übersicht über die Ergebnisse von Versuchen mit Serotonin

Es lässt sich zusammenfassen, dass die Desensitivierung des humanen 5-HT_{4a}-Rezeptors durch 1 µM Serotonin und durch 10 µM Serotonin erreicht wurde, wobei die Desensitivierung mit höherer Konzentration stärker ausgeprägt war. Es kam zur Verminderung der Potenz (Verschiebung der Konzentrationswirkungskurven und der EC₅₀) und teilweise zur Reduktion der maximalen absoluten Kraft bzw. des E_{max} (jeweils Tabelle 4 und Tabelle 5). Paroxetin konnte in beiden Gruppen die Desensitivierung hemmen, wohingegen Fluoxetin keinen Effekt zeigte. Zinkchlorid konnte in keiner verwendeten Konzentration die Desensitivierung hemmen.

Tabelle 4: Übersicht der Ergebnisse an rechten Vorhöfen von TG

Dargestellt sind der pEC₅₀-Wert, die maximale absolute Frequenz (in bpm) und der E_{max} (in bpm) jeweils als Mittelwert der Einzelversuche für KWK1 und die Desensitivierung mit 1 µM Serotonin. Für die anderen Versuchsbedingungen war die Berechnung nicht möglich.

	pEC ₅₀	Maximale absolute Frequenz	E _{max}
KWK1	8,36 ± 0,02 *	567 ± 16	149 ± 13
5-HT-Des 1 µM	7,76 ± 0,25 #	497 ± 21	130 ± 19

KWK, Konzentrationswirkungskurve; Des, Desensitivierung; 5-HT, Serotonin; * p<0,05 vs. KWK1 (linker Vorhof, siehe Tabelle 5) # p<0,05 vs. KWK1 (rechter Vorhof)

Tabelle 5: Übersicht der Ergebnisse an linken Vorhöfen von TG

Dargestellt sind der pEC₅₀-Wert, die maximale absolute Kraft (in mN) und der E_{max} (in mN) jeweils als Mittelwert der Einzelversuche für die verschiedenen Versuchsbedingungen.

	pEC ₅₀	Maximale absolute Kraft	E _{max}
KWK1	8,14 ± 0,06	9,32 ± 0,48	5,06 ± 0,36
5-HT-Des 1 µM	7,69 ± 0,01 *	7,61 ± 0,71	6,1 ± 0,68
5-HT-Des 1 µM + Paroxetin	7,9 ± 0,07	9,84 ± 1,11 +	5,91 ± 0,78
5-HT-Des 1 µM + Fluoxetin	7,75 ± 0,12 *	6,13 ± 1,16	4,44 ± 0,83
5-HT-Des 10 µM	7,5 ± 0,08 * +	4,33 ± 0,57 +	2,79 ± 0,31 +
5-HT-Des 10 µM + Paroxetin	7,88 ± 0,1	9,17 ± 1,21 #	4,57 ± 1,2
5-HT-Des 10 µM + Fluoxetin	7,28 ± 0,09 *	4,28 ± 0,37 +	2,54 ± 0,43 *
5-HT-Des 10 µM + ZnCl₂ 25 µM	6,45 ± 0,29 *	4,04 ± 0,7 +	2,36 ± 0,72 *
5-HT-Des 10 µM + ZnCl₂ 2,5 µM	7,26 ± 0,22 *	6,49 ± 1,2	3,72 ± 0,33

KWK, Konzentrationswirkungskurve; 5-HT, Serotonin; Des, Desensitivierung; * p<0,05 vs. KWK1; + p<0,05 vs. 5-HT-Des 1 µM; # p<0,05 vs. 5HT-Des 10 µM

4.4 Positive Inotropie von Paroxetin

Im Laufe der Versuche fiel auf, dass nach der Gabe von 10 μ M Paroxetin die Kraft der linken Vorhöfe langsam zunahm (Abb. 16). Während die Kraft vor Gabe von Paroxetin $2,22 \pm 0,18$ mN betrug ($n=23$), stieg sie langsam, über 30 Minuten nach Zugabe auf $4,33 \pm 0,37$ mN ($n=20$, $p<0,05$ vs. Kontrolle). Dieser positiv inotrope Effekt zeigte sich in allen mit Paroxetin behandelten Präparaten (Abb. 21), sowohl von Wildtyp- als auch von transgenen Tieren. Da es bei der Verwendung von Fluoxetin zu keinem vergleichbaren Effekt kam und der Effekt unabhängig davon war, ob die Tiere WT oder TG waren, schien der Effekt nicht über eine Hemmung der Wiederaufnahme von Serotonin vermittelt zu sein.

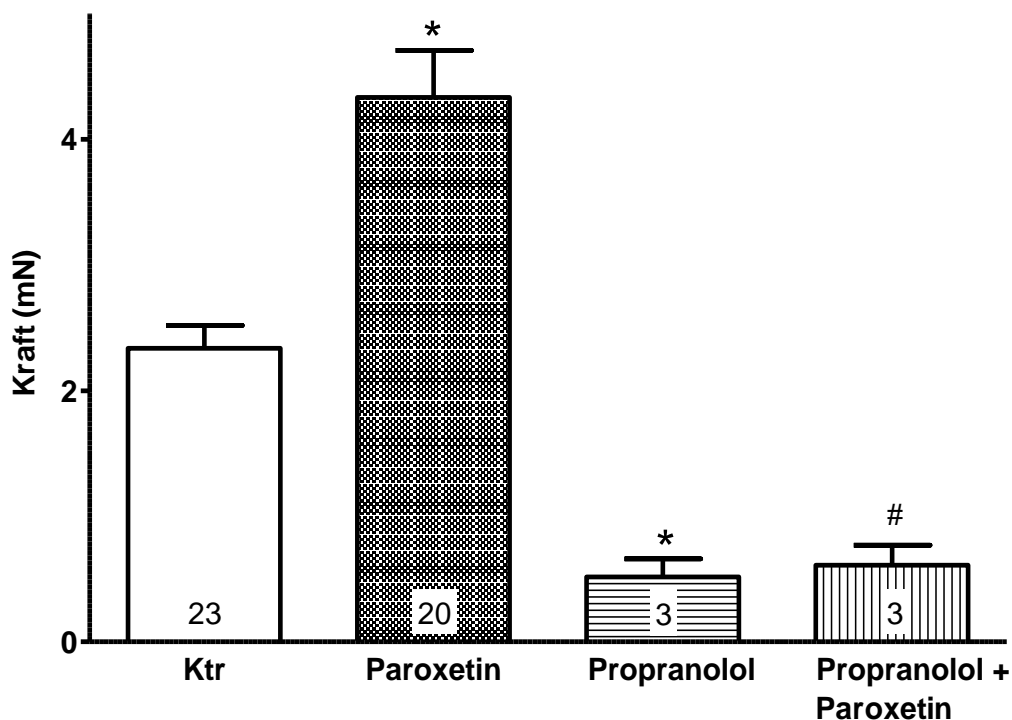


Abb. 21: Eigeneffekt von Paroxetin

Dargestellt ist die absolute Kraft \pm SEM von linken Vorhöfen (WT und TG) in mN vor Substanzzugabe (Ktr), nach 30minütiger Inkubation mit 10 μ M Paroxetin (WT und TG), sowie in Gegenwart von 10 μ M Propranolol (WT) beziehungsweise 10 μ M Propranolol und 10 μ M Paroxetin (WT). * $p<0,05$ vs. Ktr, # $p>0,05$ vs. Propranolol. Die Zahlen in den Säulen geben die Anzahl der untersuchten Präparate an.

Um zu prüfen, ob die positive Inotropie durch Paroxetin auf eine Freisetzung von Katecholaminen zurückzuführen sein könnte, wurden Versuche an WT in Gegenwart von Propranolol ausgeführt. Die Präparate wurden zunächst mit 10 μ M Propranolol für 30 Minuten vorbehandelt, dann wurde für weitere 30 Minuten 10 μ M Paroxetin zugegeben. Nach Gabe von Propranolol sank die Kraft der Wildtyp-Vorhöfe auf $0,51 \pm 0,14$ mN ($n=3$). Auf die Gabe von Paroxetin hin veränderte die Kraftentwicklung sich kaum ($0,6 \pm 0,15$ mN, $n=3$, $p>0,05$ vs. Propranolol). Der positiv inotrope Effekt von Paroxetin war in Gegenwart von Propranolol stark abgeschwächt ($p<0,05$). Damit ist der positiv inotrope Effekt von Paroxetin sehr wahrscheinlich über eine Aktivierung von β -Adrenozeptoren vermittelt (Abb. 21).

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

Die Versuche an isolierten Vorhöfen von transgenen Mäusen zeigten die Desensitivierung humaner 5-HT_{4a}-Rezeptoren und lieferten Hinweise für ihre zellulären Signalwege. Im Folgenden sollen zunächst Möglichkeiten, aber auch Grenzen des verwendeten Modells diskutiert werden.

Mäuse, die humane 5-HT_{4a}-Rezeptoren herzspezifisch exprimieren, wurden für diese Arbeit verwendet, weil sie im Vergleich zu menschlichem Gewebe einfacher verfügbar sind und die Versuchsbedingungen vergleichbar machen.

Obwohl die herzspezifische Expression der humanen 5-HT_{4a}-Rezeptoren bereits gezeigt werden konnte (Gergs et al. 2010) und die Funktionalität der Rezeptoren weiter charakterisiert wurde (Gergs et al. 2013), gibt es immer noch einige Unklarheiten, die die Interpretation der Ergebnisse erschweren. Da die Rezeptordichte bislang nicht gemessen werden konnte, sind die Ergebnisse nur begrenzt auf den Menschen übertragbar. Veränderte Parameter unter Basalbedingungen, nämlich erhöhte Kontraktionskraft und erhöhte Grundfrequenz im Vergleich zu Wildtyp-Präparaten, deuten auf eine erhöhte Basalaktivität hin (Gergs et al. 2010). Möglicherweise ist der Rezeptor in seiner Konformation verändert und aktiviert auch ohne Bindung eines Agonisten die Signalkaskade (Kaumann 2013).

Einschränkend muss erwähnt werden, dass das verwendete Mausmodell nur die Rolle der 5-HT_{4a}-Rezeptoren darstellen kann. Über den 5-HT_{4b}-Rezeptor und andere im Herzen vorkommende Isoformen lassen sich also keinerlei Aussagen treffen.

Die Kontraktionsversuche wurden an isolierten linken und rechten Vorhöfen durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode ist, dass man Frequenz und Kraft getrennt voneinander beurteilen kann. Es lassen sich so also sowohl Aussagen über Arbeitsmyokardzellen aus dem linken Vorhof als auch über die Schrittmacherzellen im rechten Vorhof treffen. Komplexe Bedingungen, wie sie im intakten Organismus stattfinden, lassen sich so aber nicht beurteilen.

Eine technische Schwierigkeit besteht aufgrund ihrer geringen Größe (wenige Millimeter) in der Präparation der Vorhöfe selbst. Mechanische Irritationen äußerten sich zum Teil als Arrhythmien. Dies behinderte insbesondere die Auswertung der Daten von rechten Vorhöfen.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Wirkung von Isoprenalin

Die Vorhöfe der Wildtyp-Mäuse reagierten auf Isoprenalin positiv inotrop und positiv chronotrop. Die in der vorliegenden Arbeit bestimmten pEC_{50} -Werte (linke Vorhöfe $7,77 \pm 0,06$ und rechte Vorhöfe $8,67 \pm 0,09$) ähneln denen in anderen Arbeiten mit dem demselben Mausmodell (Gergs et al. 2010, Böckler 2013). Dabei reagierten rechte Vorhöfe empfindlicher auf Isoprenalin mit einer Frequenzsteigerung als die linken Vorhöfe mit einer Kraftzunahme. Dieses Phänomen könnte erklärt werden mit der direkten Aktivierung der HCN-Kanäle durch cAMP, die keiner Phosphorylierung bedarf (DiFrancesco und Mangoni 1994, DiFrancesco und Tortora 1991).

5.2.2 Wirkung von Serotonin

Wie schon zuvor beschrieben, zeigten weder die rechten noch die linken Vorhöfe von Wildtyp-Mäusen inotrope oder chronotrope Reaktionen auf Serotonin-Gaben, die in ihren transgenen Geschwistertieren maximale Effekte erzielten. (Gergs et al. 2010). Die Muskelpräparate von TG dagegen zeigten auf Serotonin eine positiv inotrope und eine positiv chronotrope Antwort. Die EC_{50} -Werte für die linken Vorhöfe ($8,14 \pm 0,06$) ähneln vorherigen Arbeiten (Gergs et al. 2013, Frenker 2013, Böckler 2013). Auch beim Serotonin-Rezeptor zeigte sich eine erhöhte Empfindlichkeit für den Agonisten bezüglich des Parameters Chronotropie im Vergleich zu Inotropie ($8,36 \pm 0,02$). Hier scheint analog zum β -Rezeptor die direkte Aktivierung der HCN-Kanäle durch cAMP der ursächliche Mechanismus zu sein (Pino et al. 1998). Vergleicht man die an TG gemessenen EC_{50} -Werte mit denen anderer Spezies wie Mensch (positiv inotroper Effekt an rechten Vorhöfen: 7,2

(Kaumann et al. 1990); positiv inotroper Effekt an linken Vorhöfen 7,04 (Sanders und Kaumann 1992)) oder Schwein (positiv chronotroper Effekt am rechten Vorhof: 7,1, positiv inotroper Effekt am linken Vorhof: $6,98 \pm 0,05$ (De Maeyer et al. 2009)), fällt auf, dass die Vorhöfe transgener Mäuse weitaus empfindlicher reagieren als die Vorhöfe von Mensch oder Schwein, die den Rezeptor physiologischerweise exprimieren. Auch zeigten sich Unterschiede bezüglich des maximalen Serotonin-Effekts im Vergleich zu Isoprenalin. Während der positiv inotrope Serotonin-Effekt am rechten menschlichen Vorhof 60% (Kaumann et al. 1990) und am linken menschlichen Vorhof etwa 25% des Isoprenalin-Effekts ausmacht (Sanders und Kaumann 1992), erreichen die Präparate der transgenen Maus 100%. (Gergs et al. 2013, Frenker 2013). Auch in dieser Arbeit zeigte Serotonin positiv inotrope und positiv chronotrope Effekt, die durch Isoprenalin nicht weiter steigerbar waren. Diese Erkenntnisse deuten eine höhere Rezeptordichte in der transgenen Maus im Vergleich zu Mensch oder Schwein an.

5.2.3 Desensitivierung des β -Rezeptors

Herepath und Broadley testeten verschiedene Isoprenalin-Konzentrationen zur Desensitivierung von β -Rezeptoren an isolierten Vorhöfen von Meerschweinchen, unter anderem 1 μM und 10 μM für 0,5 bis 8 Stunden (Herepath und Broadley 1990), Kaumann und Birnbaumer verwendeten 30 μM Isoprenalin für 3 Stunden an isolierten Katzen-Vorhöfen (Kaumann und Birnbaumer 1976). Für die vorliegende Arbeit wurden sowohl 1 μM , 3 μM als auch 10 μM Isoprenalin verwendet. Durch alle Konzentrationen konnte eine Rechtsverschiebung der Konzentrationswirkungskurven erreicht werden. Das Ausmaß der Desensitivierung war jedoch für die verschiedenen Konzentrationen von Isoprenalin nicht unterschiedlich. Vermutlich ist die maximale Desensitivierung bereits durch 1 μM Isoprenalin erreicht.

Es ist bekannt, dass die GRK2 für die Desensitivierung des β -Adrenozeptors verantwortlich ist (Benovic et al. 1987). Paroxetin hemmt die GRK2 in isolierten Maus-Kardiomyozyten und in der Maus (hämodynamische Messungen) *in vivo* (Thal et al. 2012). Eine Hemmung der Desensitivierung

durch Paroxetin im isolierten Mausvorhof ist aber bisher nicht gezeigt worden. Auch dienten die Isoprenalin-Versuche dazu, das Modell für die Desensitivierung des Serotonin-Rezeptors zu definieren. Letztlich wurde die Desensitivierung des β -Rezeptors durch Paroxetin in der 1 μ M- und in der 3 μ M-Isoprenalin-Versuchsgruppe aufgehoben, während sich dieser Effekt in der 10 μ M-Isoprenalin-Gruppe nicht zeigte. Möglicherweise ist der hemmende Einfluss von Paroxetin auf die GRK2 also abhängig von der Konzentration des Agonisten. Die bereits in anderen Arbeiten verwendete Kontrollsubstanz Fluoxetin (Thal et al. 2012, Schumacher et al. 2015) zeigte keinerlei Einfluss auf die Desensitivierung.

5.2.4 Desensitivierung von 5-HT_{4a}-Rezeptoren

5-HT₄-Rezeptoren in Colliculi-Neuronen von Maus-Embryonen konnten mit 10 μ M Serotonin desensitiviert werden (Ansanay et al. 1992), linksatriale Trabekel vom Schwein mit 1 μ M und mit 10 μ M Serotonin (De Maeyer et al. 2009). Auch Trabekel von menschlichen linken Vorhöfen zeigten eine Kraftabnahme bei sehr hohen Konzentrationen Serotonin (bis zu 600 μ M, Sanders und Kaumann 1992). Für humane 5-HT_{4a}-Rezeptoren, exprimiert in der transgenen Maus wurde eine Desensitivierung durch 600 μ M Serotonin nach 60 Minuten demonstriert (Frenker 2013), wobei die üblichen positiv inotropen und chronotropen Effekten durch Serotonin anschließend ausblieben. In der vorliegenden Arbeit wurde hingegen versucht mit möglichst geringen Mengen Serotonin zu desensitivieren, einerseits um physiologisch relevante Konzentrationen zu testen. Andererseits weil das Auswaschen der Substanz bei Verwendung höherer Konzentrationen schwierig ist: In Vorversuchen zu dieser Arbeit mit 100 μ M Serotonin war die Substanz auch nach zehnmalem Badwechsel über mehr als 45 Minuten nicht auswaschbar (Daten nicht gezeigt). Reste von Serotonin, welches zur Desensitivierung benutzt worden war, können sicherlich die KWK2 beeinflussen.

Die Desensitivierung von linken Vorhöfen konnte sowohl mit 1 μ M als auch mit 10 μ M Serotonin erreicht werden. Dies deckt sich mit den Versuchsergebnissen an linksatrialen Trabekeln vom Schwein (De Maeyer et

al. 2009). Das Ausmaß der Desensitivierung an Vorhöfen von TG war mit 10 μM Serotonin deutlicher. Daher wäre diese Konzentration für eventuelle zukünftige Versuche zu empfehlen. Möglicherweise ist die vermutete höhere Rezeptordichte im Vorhof der transgenen Maus dafür verantwortlich, dass 1 μM Serotonin nur eine geringe Verschiebung der EC_{50} und keine Reduktion des maximalen Effekts bedingt. Für die rechten Vorhöfe konnte bei dieser Mauslinie erstmals eine Desensitivierung bei 1 μM Serotonin festgestellt werden, wobei es hier ebenfalls nur zur Reduktion der Potenz, nicht aber des maximalen Effekts kam.

Die Desensitivierung durch beide Konzentrationen von Serotonin konnte durch Paroxetin verhindert werden. Fluoxetin hingegen verursachte keine signifikante Verschiebung der Kurvenverläufe beziehungsweise der EC_{50} . Diese Ergebnisse stützen die Vermutung, dass die GRK2 an der Regulation des 5-HT₄-Rezeptors beteiligt ist. Es lässt sich allerdings nicht sicher ausschließen, dass weitere Enzyme aus der GRK-Familie an der Desensitivierung beteiligt sind.

Es überrascht, dass Zinkchlorid nicht die Desensitivierung mit 10 μM Serotonin hemmen konnte, war doch in der Vergangenheit gezeigt worden dass es die GRK2 hemmt. Die zuvor zur Hemmung von GRK2 verwendeten Konzentrationen von Zinkchlorid reduzierten die Kräfte erheblich. Möglicherweise lag das an dem hemmenden Einfluss von Zn^{2+} auf Calicumkanäle (Mahaut-Smith 1989, Alvarez-Collazo et al. 2012) oder am hemmenden Einfluss auf die cAMP-Produktion (Klein et al. 2012). Nur die niedrigere Konzentration Zinkchlorid (2,5 μM) hatte keine negativ inotropen Effekte, allerdings ist eine Hemmung der GRK2 durch 2,5 μM unwahrscheinlich, da die Aktivität der GRK2 in Anwesenheit von 50 μM Zinkchlorid auf nur 55 % sinkt (Benovic et al. 1987). Nimmt man eine einfache sigmoidale Konzentrationsabhängigkeit für die Hemmung der GRK2 durch Zinkchlorid an, sollte die Hemmung durch 2,5 μM also weniger als 5% betragen.

5.2.5 Eigeneffekt von Paroxetin

Alle linken Vorhöfe (sowohl WT als auch TG) zeigten nach 30 Minuten Inkubation mit Paroxetin einen signifikanten Kraftanstieg, wohingegen Paroxetin in einer anderen Arbeit die Kontraktilität von isolierten Kardiomyozyten nicht beeinflusste (Thal et al. 2012). Möglicherweise liegt dies an der Dauer der Inkubation: in dieser Arbeit zeigten die Vorhöfe einen langsamen Anstieg der Kraft über 30 Minuten (siehe Abbildung 16). Thal et al. aber bestimmten die Kontraktilität der Myozyten bereits nach 10 Minuten.

Der Kraftanstieg während der Paroxetin-Inkubation ließ sich durch Gabe des β -Blockers Propranolol vollständig verhindern. Daher scheint am ehesten eine Freisetzung von Noradrenalin durch Paroxetin für dessen Eigeneffekt verantwortlich. Dies wird auch gestützt durch die Tatsache, dass nicht nur transgene Präparate, sondern auch Wildtyp-Vorhöfe eine Zunahme der Kraftentwicklung zeigten. Daher scheint die Hemmung der Serotonin-Wiederaufnahme nahezu ausgeschlossen, was auch erklären würde, warum Fluoxetin, in gleicher Konzentration und Dauer verwendet, keinen Kraftanstieg hervorrief.

Es wäre für die Zukunft zu empfehlen, Versuche mit Paroxetin immer in Anwesenheit von Propranolol auszuführen. Vorbehandlung mit Reserpin, Kokain oder auch Phenoxybenzamin sollten geeignet sein die Frage zu klären, ob der positiv inotrope Effekt von Paroxetin aus einer Freisetzung von Noradrenalin aus Nervenendigungen beruht.

5.3 Fazit

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen die Schlussfolgerungen zu, dass die Desensitivierung des humanen 5-HT_{4a}-Rezeptors im *in vitro*-Modell isolierter Vorhöfe von transgenen Mäusen durch die GRK2 vermittelt ist. Paroxetin scheint die GRK2 in den Muskelpräparaten effektiv hemmen zu können, obwohl es möglicherweise dazu in der Lage ist, Katecholamine freizusetzen. Daher könnten in Zukunft Versuchsprotokolle mit Paroxetin um Propranolol ergänzt werden. Die verwendeten Konzentrationen von Serotonin erwiesen

sich als geeignet, um die Desensitivierung der Rezeptoren zu erreichen, wobei die Effekte bei 10 μ M Inkubationsdosis ausgeprägter waren.

Leider waren die Messungen der spontanen Schlagfrequenz rechter Vorhöfe nicht geeignet eine Desensitivierung der 5-HT_{4a}-Rezeptoren aufzuzeigen, da dafür die Datenqualität nicht ausreichend war. Mögliche zukünftige Fragestellungen könnten aber sein, ob Paroxetin die Desensitivierung auch in Schrittmacherzellen hemmen kann und ob durch Hemmung der 5-HT_{4a}-Rezeptor-Desensitivierung womöglich eine Arrhythmie neigung auftritt.

Da es auch Hinweise gab, dass die Hemmung der GRK2 durch Paroxetin möglicherweise von der Konzentration des Rezeptor-Agonisten abhängig ist, sind weitere Versuche mit verschiedenen Konzentrationen denkbar. Interessant wäre dabei vor allem, ob Paroxetin die Desensitivierung in Konzentrationen beeinflusst, die therapeutisch im menschlichen Organismus erreicht werden (nM-Bereich).

5.4 Klinische Bedeutung und Ausblick

5.4.1 Rezeptor-Desensitivierung

Desensitivierungen von Rezeptoren spielen nicht nur in der experimentellen Grundlagenforschung, sondern auch in der klinischen Praxis eine Rolle. Zum Beispiel beim Einsatz von Medikamenten, die an den hier untersuchten Rezeptoren als Agonisten wirken, wie beispielsweise Dobutamin am β_1 -Adrenozeptor beim kardiogenen Schock oder Prucaloprid am 5-HT₄-Rezeptor bei chronischer Obstipation. In diesem Fall ist die Desensitivierung unerwünscht, da sie die Wirksamkeit des Medikaments abschwächen kann. Darüber hinaus können zum Beispiel die β_1 -Rezeptoren bei der chronischen Herzinsuffizienz desensitivieren, da sie durch ein dauerhaft aktives sympathisches Nervensystem hohen Katecholamin-Konzentrationen ausgesetzt sind.

5.4.2 5-HT₄-Rezeptoren

Neben den β -Adrenozeptoren sind auch die 5-HT₄-Rezeptoren in der Herz-Kreislauf-Forschung von großer Bedeutung. Langfristig hohe Serotonin-Spiegel im Blut, etwa bei Serotonin-produzierenden Karzinoiden, können zu Herzklappenschädigungen und Herzinsuffizienz führen (Robiolio et al. 1995). Auch fand man bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz erhöhte 5-HT₄-Rezeptor-mRNA im Vergleich zu gesundem ventrikulären Gewebe (Brattelid et al. 2004), weshalb die Autoren 5-HT₄-Rezeptor-Antagonisten als mögliche Therapie der Herzinsuffizienz vorschlugen. Darüber hinaus scheint Serotonin bei Vorhofflimmern involviert zu sein, wobei nach wie vor unklar ist, ob Serotonin über seine arrhythmogene Wirkung (siehe Kapitel 1.3.2) initiierend oder die Arrhythmie erhaltend wirkt. 5-HT₄-Rezeptor-Antagonisten werden auch zur Prävention von Vorhofflimmern nach herzchirurgischen Eingriffen vorgeschlagen, da sie im Gegensatz zu anderen Antiarrhythmika keine negative Inotropie und Bradykardie bewirken würden (Yusuf et al. 2003). Insgesamt gibt es aber noch viele Unklarheiten über die Bedeutung des 5-HT₄-Rezeptors bei verschiedenen Krankheitsbildern und seine Regulation. Die verschiedenen Isoformen des Rezeptors und seine unterschiedliche Reagibilität in Abhängigkeit von Spezies (Kaumann und Levy 2006), Gewebeart (De Maeyer et al. 2009) und Versuchsbedingungen erschweren die Forschungsarbeit. Trotzdem oder gerade deswegen ist es wichtig sich weiterhin mit der Thematik zu befassen, um zum Beispiel die Wirksamkeit der vorgeschlagenen pharmakologischen Therapien besser abschätzen zu können.

5.4.3 GRK2-Hemmung

Die GRK2 wird seit längerem als möglicher Angriffspunkt in der Therapie der chronischen Herzinsuffizienz diskutiert (Rengo et al. 2011, Cannavo et al. 2013), da die Expression in menschlichem ventrikulären Gewebe bei chronischer Herzinsuffizienz erhöht ist (Ungerer et al. 1993). Bei erhöhter Aktivität der GRK2 können mehr β_1 -Adrenozeptoren desensitiviert werden, was letztlich die inotrope und chronotrope Reserve des Herzens reduzieren kann (Huang et al. 2014). Bevor aber Medikamente zur Hemmung des

Enzyms eingesetzt werden können, muss seine Funktion weiter abgeklärt werden, um zum Beispiel bedrohliche Nebenwirkungen ausschließen zu können.

Mit Paroxetin als selektivem GRK2-Hemmstoff eröffnen sich neue Möglichkeiten für die Forschung und möglicherweise auch für zukünftige Therapien. Bisher wurde die GRK2-Hemmung durch Paroxetin in folgenden Modellen getestet: *in vivo* in der Wildtyp-Maus (Thal et al. 2012, Schumacher et al. 2015) und *in vitro* in isolierten Maus-Kardiomyozyten (Thal et al. 2012). Dass Paroxetin die GRK2 auch in isolierten Vorhof-Präparaten hemmen kann, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, eröffnet eine weitere Methode. Besonders interessant wären in Zukunft auch Versuche an menschlichen Trabekeln.

6 Zusammenfassung

Serotonin kann am menschlichen Herzen über 5-HT₄-Rezeptoren positiv inotrop sowie positiv chronotrop und arrhythmogen wirken. Werden Zellen dauerhaft hohen Konzentrationen von Rezeptor-Agonisten ausgesetzt, können die Rezeptoren desensitivieren. Ein klinisches Beispiel ist die dauerhafte Aktivierung des sympathischen Nervensystems bei chronischer Herzinsuffizienz, woraufhin es zu einer reduzierten Antwort auf β_1 -Rezeptor-Stimulation kommt und die Rezeptoren herunterreguliert werden. Auch kardiale 5-HT₄-Rezeptoren können desensitivieren, jedoch waren die molekularen Signalwege in Herzmuskelzellen unklar. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Mechanismen der Rezeptorregulation genauer zu untersuchen. Für die Versuche wurde eine Mauslinie mit herzspezifischer Expression humaner 5-HT_{4a}-Rezeptoren verwendet. An elektrisch gereizten linken Vorhöfen wurde die Kontraktionskraft gemessen, wohingegen an spontan schlagenden rechten Vorhöfen die Frequenz bestimmt werden konnte.

Zunächst wurden an Wildtyp-Präparaten Versuche zur Desensitivierung von β_1 -Rezeptoren durch Exposition gegenüber Isoprenalin gemacht, wobei auch der Einfluss von zwei Pharmaka getestet wurde, die klinisch als selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI) verwendet werden: Paroxetin diente als Hemmstoff der GRK2, Fluoxetin als Kontrollsubstanz. Die isolierten Vorhöfe wurden in einer ersten Konzentrationswirkungskurve (KWK) steigenden Konzentrationen Isoprenalin ausgesetzt und die Potenz (pEC_{50}) sowie der maximale positiv inotrope beziehungsweise positiv chronotrope Effekt bestimmt. Anschließend erfolgte eine 60minütige Inkubation mit 1, 3 oder 10 μ M Isoprenalin. In der darauf folgenden zweiten KWK war die Potenz für den positiv inotropen Effekt reduziert, was eine Desensitivierung der Präparate bedeutete. Wenn vor der Desensitivierungsphase 10 μ M Paroxetin gegeben wurden, ließ sich die Desensitivierung in zwei Gruppen komplett verhindern (1 μ M und 3 μ M Isoprenalin). Fluoxetin hingegen, das die GRK2 nicht hemmt, beeinflusste die Kurvenverläufe nicht.

Nachdem die Verhinderung der β_1 -Rezeptor-Desensitivierung durch Paroxetin als GRK2-Hemmer an Wildtyp-Präparaten gelungen war, erfolgten Versuche

zur Desensitivierung des Serotonin-Rezeptors. Wiederum wurden in einer ersten Konzentrationswirkungskurve für Serotonin die Kontraktionskraft an linken Vorhöfen und die Schlagfrequenz an rechten Vorhöfen transgener Tiere gemessen. Wildtyp-Kontrollen zeigten auf Serotonin hin weder einen Kraft- noch einen Frequenzanstieg. Präparate von transgenen Geschwistertieren reagierten positiv inotrop und positiv chronotrop. Es schloss sich eine 60minütige Phase der Desensitivierung mit 1 μM beziehungsweise 10 μM Serotonin an. Wurden die Vorhöfe dann erneut steigenden Serotonin-Konzentrationen ausgesetzt, war die Potenz gegenüber der Kontrolle verringert (beide Versuchsgruppen) und der Maximaleffekt teilweise reduziert (nur 10 μM). Es wurden weiterhin zwei Substanzen zur GRK2-Hemmung getestet: Paroxetin (10 μM) und Zinkchlorid (2,5 μM und 25 μM). Paroxetin konnte in beiden Gruppen die Desensitivierung verhindern. Zinkchlorid beeinflusste die Desensitivierung nicht, wirkte aber teilweise schädlich auf die Präparate. Fluoxetin (als SSRI ohne GRK2-Hemmung) hatte keinen Einfluss auf den Verlauf der zweiten Konzentrationswirkungskurve.

Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass die GRK2 an der Desensitivierung humaner 5-HT_{4a}-Rezeptoren in Herzvorhöfen transgener Mäuse beteiligt zu sein scheint.

5-HT₄-Rezeptoren gewinnen an Bedeutung bei der chronischen Herzinsuffizienz und sind bei Vorhofflimmern beteiligt. Daher werden Rezeptor-Antagonisten als Antiarrhythmika diskutiert. Agonisten am 5-HT₄-Rezeptor werden klinisch als Prokinetika genutzt und zeigen teilweise bedrohliche kardiale Nebenwirkungen. Untersuchungen am kardialen Serotonin-Rezeptor sind wichtig, um die Rolle von Serotonin in Gesundheit und Krankheit besser verstehen zu können und um möglicherweise neue Therapien von kardiovaskulären Erkrankungen zu finden. Da die GRK2 als Target der Herzinsuffizienz-Therapie diskutiert wird, ist es für die Entwicklung neuer Pharmaka hilfreich, die verschiedenen Funktionen des Enzyms genauer zu charakterisieren.

7 Literaturverzeichnis

Alvarez-Collazo J, Díaz García CM, López Medina AI, Vassort G, Alvarez JL (2012) Zinc modulation of basal and β -adrenergically stimulated L-type Ca^{2+} -current in rat ventricular cardiomyocytes: consequences in cardiac diseases. *Pflügers Archiv Eur J Physiol* 464: 459-470.

Ansanay H, Sebben M, Bockaert J, Dumuis A (1992) Characterization of homologous 5-hydroxytryptamine₄ receptor desensitization in colliculi neurons. *Molecular pharmacology* 42:808–816.

Barthet G, Gaven F, Framery B, Shinjo K, Nakamura T, Claeysen S, Bockaert J, Dumuis A (2005) Uncoupling and endocytosis of 5-hydroxytryptamine₄ receptors. Distinct molecular events with different GRK2 requirements. *The Journal of biological chemistry* 280:27924–27934.

Benovic JL, Mayor F, JR, Staniszewski C, Lefkowitz RJ, Caron MG (1987) Purification and characterization of the beta-adrenergic receptor kinase. *The Journal of biological chemistry* 262:9026–9032.

Bers DM (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415:198–205.

Böckler A (2013) Charakterisierung eines transgenen Tiermodells mit herzspezifischer Überexpression von humanen Serotoninrezeptoren Typ 4a. Dissertation, Halle (Saale).

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

Broadley KJ (1999) Review of mechanisms involved in the apparent differential desensitization of beta₁- and beta₂-adrenoceptor-mediated functional responses. *Journal of autonomic pharmacology* 19:335–345.

Brodie BB, Shore PA (1957) A concept for a role of serotonin and norepinephrine as chemical mediators in the brain. *Annals of the New York Academy of Sciences* 66:631–642.

Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Molinoff PB, Ruffolo RR, JR, Trendelenburg U (1994) International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacological reviews* 46:121–136.

Cannavo A, Liccardo D, Koch WJ (2013) Targeting cardiac beta-adrenergic signaling via GRK2 inhibition for heart failure therapy. *Frontiers in physiology* 4:264.

DiFrancesco D, Mangoni M (1994) Modulation of single hyperpolarization-activated channels (i(f)) by cAMP in the rabbit sino-atrial node. *The Journal of physiology* 474:473–482.

DiFrancesco D, Tortora P (1991) Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 351:145–147.

Emorine LJ, Marullo S, Briend-Sutren MM, Patey G, Tate K, Delavier-Klutchko C, Strosberg AD (1989) Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science (New York, N.Y.)* 245:1118–1121.

Erspamer V, Asero B (1952) Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature* 169:800–801.

Ford AP, Clarke DE (1993) The 5-HT₄ receptor. *Medicinal research reviews* 13:633–662.

Francis SH, Blount MA, Corbin JD (2011) Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases; Molecular mechanisms and physiological functions. *Physiological reviews* 91:651–690.

Frenker J (2013) Desensitivierung humaner 5-HT₄a-Rezeptoren in Vorhöfen von Herzen transgener Mäuse. Dissertation, Halle (Saale).

Gaddum JH, Picarelli ZP (1957) Two kinds of tryptamine receptor. *British journal of pharmacology and chemotherapy* 12:323–328.

Gergs U, Baumann M, Bockler A, Buchwalow IB, Ebel H, Fabritz L, Hauptmann S, Keller N, Kirchhof P, Klockner U, Ponicke K, Rueckschloss U, Schmitz W, Werner F, Neumann J (2010) Cardiac overexpression of the human 5-HT₄ receptor in mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 299:H788-98.

Gergs U, Bockler A, Ebel H, Hauptmann S, Keller N, Otto V, Ponicke K, Schmitz W, Neumann J (2013) Human 5-HT₄receptor stimulation in atria of transgenic mice. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 386:357–367.

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

Herepath ML, Broadley KJ (1990) Desensitization of beta-adrenoceptor-mediated functional responses of guinea pig atria by in vitro incubation with isoprenaline. *Journal of cardiovascular pharmacology* 15:259–268.

Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP (1994) International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacological reviews* 46:157–203.

Huang ZM, Gao E, Chuprun JK, Koch WJ (2014) GRK2 in the heart; A GPCR kinase and beyond. *Antioxidants & redox signaling* 21:2032–2043.

Kamel R, Garcia S, Lezoualc'h F, Fischmeister R, Muller S, Hoebek 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 (1994) Do human atrial 5-HT₄ receptors mediate arrhythmias? *Trends in pharmacological sciences* 15:451–455.

Kaumann AJ, Birnbaumer L (1976) Desensitization of kitten atria to chronotropic, inotropic and adenylyl cyclase stimulating effects of (-)-isoprenaline. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 293:199–202.

Kaumann AJ, Sanders L (1994) 5-Hydroxytryptamine causes rate-dependent arrhythmias through 5-HT₄ receptors in human atrium; Facilitation by chronic beta-adrenoceptor blockade. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 349:331–337.

Kaumann AJ, Sanders L, Brown AM, Murray KJ, Brown MJ (1990) A 5-hydroxytryptamine receptor in human atrium. *British journal of pharmacology* 100:879–885.

Kaumann AJ (2013) Surprises from a cardiac 5-HT₄TG mouse; Spontaneous atrial arrhythmias by endogenous 5-HT of atrial origin? Different mechanism of arrhythmias through 5-HT₄ receptors and β -adrenoceptors? *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 386:353–356.

Kaumann AJ, Levy FO (2006) 5-hydroxytryptamine receptors in the human cardiovascular system. *Pharmacology & therapeutics* 111:674–706.

Klein C, Sunahara RK, Hudson TY, Heyduk T, Howlett AC (2002) Zinc inhibition of cAMP signaling. *J. Biol. Chem.* 277:11859–11865.

Laer S, Remmers F, Scholz H, Stein B, Muller FU, Neumann J (1998) Receptor mechanisms involved in the 5-HT-induced inotropic action in the rat isolated atrium. *British journal of pharmacology* 123:1182–1188.

- Le Messurier DH, Schwartz CJ, Whelan RF (1959) Cardiovascular effects of intravenous infusions of 5-hydroxytryptamine in man. *British journal of pharmacology and chemotherapy* 14:246–250.
- Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990) beta-Arrestin; A protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science (New York, N.Y.)* 248:1547–1550.
- Maeyer JH de, Schuurkes JAJ, Lefebvre RA (2009) Selective desensitization of the 5-HT₄ receptor-mediated response in pig atrium but not in stomach. *British journal of pharmacology* 156:362–376.
- Maeyer JH de, Aerssens J, Verhasselt P, Lefebvre RA (2008) Alternative splicing and exon duplication generates 10 unique porcine 5-HT₄ receptor splice variants including a functional homofusion variant. *Physiological genomics* 34:22–33.
- Maeyer JH de, Straetemans R, Schuurkes JAJ, Lefebvre RA (2006) Porcine left atrial and sinoatrial 5-HT₄ receptor-induced responses; Fading of the response and influence of development. *British journal of pharmacology* 147:140–157.
- Mahaut-Smith MP (1989) The Effect of Zinc on Calcium and Hydrogen Ion Currents in Intact Snail Neurones. *Journal of Experimental Biology* 145: 455-464
- McMartin L, Summers RJ (1999) Functional analysis of desensitization of the beta-adrenoceptor signalling pathway in rat cardiac tissues following chronic isoprenaline infusion. *British journal of pharmacology* 127:1012–1020.
- Mohammad-Zadeh LF, Moses L, Gwaltney-Brant SM (2008) Serotonin; A review. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 31:187–199.
- Oliver G, Schäfer EA (1894) Proceedings of the Physiological Society, March 10, 1894. No. I. *The Journal of physiology* 16:i–viii.
- Ouadid H, Seguin J, Dumuis A, Bockaert J, Nargeot J (1992) Serotonin increases calcium current in human atrial myocytes via the newly described 5-hydroxytryptamine₄ receptors. *Molecular pharmacology* 41:346–351.
- Peroutka SJ, Howell TA (1994) The molecular evolution of G protein-coupled receptors; Focus on 5-hydroxytryptamine receptors. *Neuropharmacology* 33:319–324.
- 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. *Cardiovascular research* 40:516–522.

- Rapport MM, Green AA, Page IH (1947) Purification of the substance which is responsible for the vasoconstrictor activity of serum. *Federation proceedings* 6:184.
- Rapport MM, Green AA, Page IH (1948) Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *The Journal of biological chemistry* 176:1243–1251.
- Rengo G, Lympopoulos A, Leosco D, Koch WJ (2011) GRK2 as a novel gene therapy target in heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology* 50:785–792.
- Robiolio 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, Kaumann AJ (1992) A 5-HT₄-like receptor in human left atrium. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 345:382–386.
- Sanders L, Lynham JA, Bond B, del Monte F, Harding SE, Kaumann AJ (1995) Sensitization of Human Atrial 5-HT₄ Receptors by Chronic β -Blocker Treatment. *Circulation* 92:2526–2539.
- Schumacher SM, Gao E, Zhu W, Chen X, Chuprun JK, Feldman AM, Tesmer JJG, Koch WJ (2015) Paroxetine-mediated GRK2 inhibition reverses cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Science translational medicine* 7:277ra31.
- Solaro RJ, Rarick HM (1998) Troponin and Tropomyosin; Proteins That Switch on and Tune in the Activity of Cardiac Myofilaments. *Circulation Research* 83:471–480.
- Strosberg AD (1993) Structure, function, and regulation of adrenergic receptors. *Protein science: a publication of the Protein Society* 2:1198–1209.
- Summers RJ, Kompa A, Roberts SJ (1997) Beta-adrenoceptor subtypes and their desensitization mechanisms. *Journal of autonomic pharmacology* 17:331–343.
- 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. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie* 330:297–308.
- Thal DM, Homan KT, Chen J, Wu EK, Hinkle PM, Huang ZM, Chuprun JK, Song J, Gao E, Cheung JY, Sklar LA, Koch WJ, Tesmer JJG (2012) Paroxetine is a direct inhibitor of G protein-coupled receptor kinase 2 and increases myocardial contractility. *ACS chemical biology* 7:1830–1839.
- Tyrode, MV (1910) The Mode of Action of some Purgative Salts. *Arch Internat Pharmacodyn* 20:205–223.

Ungerer M, Kessebohm K, Kronsbein K, Lohse MJ, Richardt G (1996) Activation of β -Adrenergic Receptor Kinase During Myocardial Ischemia. *Circulation Research* 79:455–460.

Wachter SB, Gilbert EM (2012) Beta-adrenergic receptors, from their discovery and characterization through their manipulation to beneficial clinical application. *Cardiology* 122:104–112.

Workman AJ, Rankin AC (1998) Serotonin, I(f) and human atrial arrhythmia. *Cardiovascular research* 40:436–437.

Wysocki DK, Corken A, Gallo-Torres H, Talarico L, Rodriguez EM (2001) Postmarketing reports of QT prolongation and ventricular arrhythmia in association with cisapride and Food and Drug Administration regulatory. *The American journal of gastroenterology* 96:1698–1703.

Yusuf S, Al-Saady N, Camm AJ (2003) 5-hydroxytryptamine and atrial fibrillation; How significant is this piece in the puzzle? *Journal of cardiovascular electrophysiology* 14:209–214.

8 Thesen

1. Isoprenalin wirkt über β_1 -Adrenozeptoren an isolierten Vorhöfen von Wildtyp-Mäusen positiv inotrop und positiv chronotrop.
2. Durch 60minütige Inkubation mit 1 μM , 3 μM oder 10 μM Isoprenalin lassen sich die linken Vorhöfe desensitivieren, was sich in einer Reduktion der Potenz und teilweise in einer Reduktion des maximalen Effekts zeigt.
3. Die Hemmung der G-Protein-Rezeptor-Kinase 2 (GRK2) mittels 10 μM Paroxetin kann die Desensitivierung der linken Vorhöfe durch 1 μM und durch 3 μM Isoprenalin vollständig verhindern.
4. Serotonin wirkt an isolierten Vorhöfen von Mäusen, die den humanen 5-HT_{4a}-Rezeptor herzspezifisch exprimieren, positiv inotrop und positiv chronotrop.
5. Serotonin hat keine Wirkung auf Kontraktionskraft oder Frequenz an isolierten Vorhöfen von Wildtyp-Tieren.
6. Der 5-HT_{4a}-Rezeptor lässt sich durch Inkubation der Präparate mit 1 μM oder 10 μM Serotonin für 60 Minuten desensitivieren. Die EC₅₀ wird verschoben und der maximale Effekt teilweise reduziert.
7. Die Inkubation mit 10 μM Serotonin führt zu einer stärkeren Desensitivierung des 5-HT_{4a}-Rezeptors.
8. Wird die GRK2 durch 10 μM Paroxetin gehemmt, kann die Desensitivierung des 5-HT_{4a}-Rezeptors an linken Vorhöfen verhindert werden.
9. Fluoxetin hemmt weder die Desensitivierung des β_1 -Adrenozeptors noch die Desensitivierung des 5-HT_{4a}-Rezeptors.
10. Der kardiale 5-HT₄-Rezeptor ist wichtig in der Erforschung von chronischer Herzinsuffizienz, Vorhofflimmern und Karzinoid-Herzerkrankung.

9 Lebenslauf

entfällt in der Online-Version aus datenschutzrechtlichen Gründen

10 Selbstständigkeitserklärung

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

Halle (Saale), den

11 Erklärung über frühere Promotionsversuche

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

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

Halle (Saale), den

Danksagung

entfällt in der Online-Version aus datenschutzrechtlichen Gründen