

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

**Charakterisierung eines transgenen Tiermodells mit
herzspezifischer Überexpression des humanen Serotonin-
Rezeptors vom Typ 4a**

Dissertation

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

vorgelegt

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

von Martin Baumann

geboren am 05.06.1982 in Staßfurt

Gutachter/Gutachterin: Herr Prof. Dr. med. J. Neumann
Herr Prof. Dr. med. F.-U. Müller / Münster
Herr Prof. Dr. med. W.-H. Zimmermann / Göttingen

26.06.2018

13.03.2019

Referat

In der vorliegenden Dissertation sollen die physiologischen und pathophysiologischen Eigenschaften des Serotonin-Rezeptors vom Typ 4a (5-HT_{4a}-Rezeptor) untersucht werden. Zunächst wurde ein Maus-Modell hergestellt, bei dem es unter Kontrolle des α -Myosin-heavy-chain Promoters in den Kardiomyozyten zu einer Überexpression des menschlichen 5-HT_{4a}-Rezeptors kam. In einer ersten Versuchsreihe erfolgten Echokardiographieuntersuchungen der transgenen Versuchstiere (TG) im direkten Vergleich mit genetisch unveränderten Mäusen (WT = Wildtyp). Dabei wurden bei den Tieren die Herzfrequenz, die linksventrikuläre Wanddicke sowie die Verkürzungsfraction (Fractional Shortening (FS)) erfasst. Die Basalmessungen in vivo zeigten keine Frequenzunterschiede zwischen den TG- und WT-Mäusen. Nach Applikation von Isoprenalin, einem β -Adrenozeptoragonisten, oder Serotonin kam es zu einer Steigerung der Herzfrequenz, der linksventrikulären Wanddicke und der FS bei den 5-HT_{4a}-transgenen Mäusen. Ein Anstieg der untersuchten Parameter konnte bei den WT-Mäusen nur nach Isoprenalingabe, jedoch nicht nach Serotoningabe registriert werden. In einer zweiten Versuchsreihe wurden mit Hilfe des „working heart“- Modells die Herzfrequenz, der linksventrikuläre Druck, die maximale Druckabfallgeschwindigkeit bzw. die maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit von isoliert perfundierten Herzen der TG- und WT-Tiere verglichen. Es zeigte sich bei der basalen Herzfrequenzmessung in vitro eine Tachykardie der transgenen Tiere im Vergleich zum WT. Nach Isoprenalingabe konnte ein deutlicher Anstieg aller gemessenen Parameter sowohl bei den TG- als auch bei den WT-Herzen dokumentiert werden. Nach der Serotoningabe kam es jedoch nur zu positiv inotropen und positiv chronotropen Effekten bei Herzen mit der 5HT_{4a}-Rezeptor-Überexpression. Dieser Unterschied konnte durch den 5-HT_{4a}-Rezeptorantagonisten GR 125487 aufgehoben werden. Vereinzelt kam es zu spontanen Arrhythmien in vitro, ausschließlich bei den transgenen Versuchstieren. Als weiteres wurde die Serotonin-induzierte Phosphorylierung von Phospholamban an Serin-16 und Threonin-17 mit Hilfe einer Western Blot-Analyse untersucht. Diese konnte in den transgenen Tieren nachgewiesen werden. Genau diese Phosphorylierung wird sehr häufig beschrieben, um den positiv inotropen Effekt und die relaxierende Wirkung einer β -adrenergen Stimulation zu erklären. Aus diesen Erkenntnissen heraus können nun weitere Experimente erfolgen, um das vorgestellte Tiermodell z.B. für die Untersuchung von Serotonin-bedingten Arrhythmien nutzen zu können.

Baumann, Martin: Charakterisierung eines transgenen Tiermodells mit herzspezifischer Überexpression des humanen Serotonin-Rezeptors vom Typ 4a, Halle (Saale), Univ., Med. Fak.; Diss., 73 Seiten, 2018

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Serotonin	1
1.2. Serotonin- Rezeptoren	2
1.3. Die elektromechanische Kopplung im Herzmuskel	3
1.4. Vergleich der 5-HT ₄ -Rezeptoren und β - adrenergen Rezeptoren	6
1.5. Serotonin-vermittelte Arrhythmien	7
2. Fragestellung der Dissertationsarbeit	8
3. Material und Methoden	9
3.1. Eigenschaften der transgenen Mäuse	9
3.2. Genotypisierung der Mäuse	10
3.2.1. Isolation der DNA	10
3.2.2. Konzentrationsbestimmung der DNA	11
3.2.3. PCR und Agarosegelelektrophorese	12
3.3. Histologische Untersuchungen	12
3.4. Echokardiographie von TG- und WT-Mäusen	12
3.4.1. Versuchsdurchführung und Erfassung der Messdaten	12
3.4.2. Berechnung der Daten	13
3.5. In vitro hämodynamische Messungen mit dem „working heart“-Modell	14
3.5.1. Versuchsaufbau	14
3.6. Biochemische Methoden	15
3.6.1. Homogenisierung der Proben	15
3.6.2. Bestimmung des Proteingehaltes der Homogenate	16
3.6.3. SDS-PAGE nach Porzio und Pearson	16
3.6.4. Western Blot	17
3.6.5. Immunologischer Nachweis von SR-Proteinen	17
3.7. Tryptophan-, Serotonin- und Katecholaminbestimmungen mittels HPLC	19
3.8. Behördliche Genehmigungen und Sicherheitsbestimmungen	20
3.9. Statistische Auswertung	20
4. Ergebnisse	21
4.1. Genotypisierung der Versuchstiere	21
4.2. Histologie	21
4.3. Auswertung der Echokardiographie	22
4.4. Auswertung Working heart	28
4.5. Western Blot	36

4.6.	HPLC-Auswertung	39
5.	Diskussion	41
5.1.	Funktionelle Bedeutung der 5-HT _{4a} -Rezeptoren für das Herz	41
5.2.	Der positiv inotrope Effekt und lusitrope Effekt in Abhängigkeit von Serotonin am Herzen	41
5.3.	Der positiv chronotrope Effekt in Abhängigkeit von Serotonin am Herzen	43
5.4.	Serotonin bedingte Arrhythmien	43
5.5.	Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen Serotonin-Rezeptoren und β -Adrenozeptoren	45
5.6.	Pathologische Herzmechanismen und ihre Verbindung zum 5-HT _{4a} -Rezeptor	45
6.	Zusammenfassung	47
7.	Literaturverzeichnis	48
8.	Anhang	60
9.	Thesen	68
X.	Lebenslauf	69
XI.	Selbstständigkeitserklärung	71
XII.	Erklärung zu weiteren Promotionsversuchen	72
XIII.	Danksagung	73

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
bpm	Beats per minute (Schläge pro Minute)
BSA	Albumin aus Rinderserum
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca ₂₊	Calciumionen
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CICR	Ca ₂₊ -induzierte Ca ₂₊ -Freisetzung
CSQ	Calsequestrin
d. h.	das heißt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
evtl.	eventuell
g	Gramm
h	Stunde
i.p.	intraperitoneal
Iso	Isoprenalin
Kg	Kilogramm
M	molar (Mol/Liter)
mg	Milligramm
Mg ₂₊	Magnesiumionen
µg	Mikrogramm
MHC	schwere Kette des Myosins
µl	Mikroliter
min	Minute
ml	Milliliter
MLC	leichte Kette des Myosins
mm	Millimeter
mM	Millimolar (Millimol/Liter)

mmol	Millimol
mN	Millinewton
ms	Millisekunden
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
n	Stichprobenumfang
NA	Noradrenalin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase A
PDE	Phosphodiesterase
PLB	Phospholamban
PLC	Phospholipase C
Primer	Oligonukleotid für die Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RyR	Ryanodin-Rezeptor (Ca ²⁺ -Freisetzungskanal)
s.	siehe
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardabweichung des arithmetischen Mittels
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
Tab.	Tabelle
TG	transgene Maus
Tn	Troponin
TnC	Calcium-bindendes Troponin
TnI	Troponin I (Troponin-Inhibitor)
tRNA	Transport-Ribonukleinsäure
u. a.	unter anderem
v. a.	vor allem
WT	Wildtyp-Maus
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)

1. Einleitung

1.1. Serotonin

Serotonin (= 5-HT = 5-Hydroxytryptamin) ist ein Gewebshormon und Neurotransmitter der seinen Ursprung im Tryptophan hat. Die Tryptophan-Hydroxylase, von der zwei Isoformen existieren, welche durch die Gene Tph 1 und 2 kodiert werden, stellt den Geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der 5-Hydroxytryptophansynthese dar. Im zweiten Schritt kommt es zur Synthese des Serotonins durch die Katalyse einer unspezifischen Decarboxylase für aromatische Aminosäuren. Dieser biochemische Prozess findet hauptsächlich in den enterochromaffinen Zellen des Gastrointestinaltraktes statt (Neumann et al. 2017). Da Serotonin die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann, kommt es auch im zentralen Nervensystem zur Serotoninsynthese (Yusuf et al. 2003). Gespeichert wird der Botenstoff u.a. in intrazellulären Vesikeln der Thrombozyten die sich im Blut befinden. Somit stellen die Blutplättchen eine bedeutende 5-HT-Quelle für das kardiovaskuläre System dar. Mittlerweile gibt es aber auch Hinweise darauf, dass auch im Herz selbst 5-HT gebildet werden kann (Pönicke et al. 2012). Das freigesetzte Serotonin hat viele verschiedene Wirkungsweisen. Es führt im Gastrointestinaltrakt zu einer Peristaltikwelle, beeinflusst zentral als Neurotransmitter den Schlaf-Wach-Rhythmus sowie die Wahrnehmung von Schmerzempfindung und Steuerung der Stimmungslage. Zusätzlich wird Serotonin mit der Apoptose von Herzmuskelzellen, Herzklappenfehlern und dem Karzinoidsyndrom in Verbindung gebracht (Robiolo et al. 1995). In Bezug auf diese Dissertation sind die verschiedenen Einflüsse von 5-HT auf das kardiovaskuläre System zu nennen. Zum einen kommt es zu vermehrter Plättchenaggregation, Vasokonstriktion bzw. Vasodilatation sowie zu einer Steigerung der Kontraktilität des Myokards (positiv inotroper Effekt). Zum anderen wird die Herzfrequenz erhöht (positiv chronotroper Effekt) und das Auftreten von Arrhythmien begünstigt (Kaumann AJ, 1994; Kaumann und Levy, 2006). Der Abbau von Serotonin erfolgt durch die Monoaminoxidase A und B. Monoaminoxidase A ist für den Abbau des Serotonins zu 5-Hydroxy-Indolyl-Acetaldehyd das dominierende Enzym (Popova et al. 2006). 5-Hydroxy-Indolyl-Acetaldehyd wird von einer Aldehyd-Dehydrogenase weiter zu 5-Hydroxyindolylessigsäure (5-HIAA) abgebaut. 5-Hydroxyindolylessigsäure wird mit dem Urin ausgeschieden und kann z.B. als Marker für Karzinoidtumoren genutzt werden.

1.2. Serotonin-Rezeptoren

Zurzeit sind 14 verschiedene Serotoninrezeptoren bekannt, die in 7 Hauptgruppen (5-HT₁ – 5-HT₇) eingeteilt wurden (Hoyer et al. 1994; Hoyer et al. 2002). Die erste Gruppe besteht aus 5-HT_{1a-1f}. Sie stellen zusammen die G_i/G_o-gekoppelten 5-HT-Rezeptoren dar, wobei hier durch Serotonin die Adenylylcyclase inhibiert wird und die anschließende Signaltransduktion nicht erfolgen kann (Raymond et al. 2001). Die Rezeptoren der 1. Gruppe wurden hauptsächlich in Blutgefäßen und im ZNS gefunden (Verbeuren et al. 1991). Ebenso wird die Signalkaskade der 5-HT_{5a} bzw. 5-HT_{5b}-Rezeptoren G_i-gekoppelt gesteuert. Diese befinden sich am häufigsten im ZNS (Nelson 2004). Die 5-HT_{2a-c}-Rezeptoren sind G_{q/11}-Proteingekoppelt und stimulieren über die Phospholipase C die IP₃- sowie DAG-Signaltransduktion (Hoyer et al. 1994). Die 5-HT₂-Familie ist im Gehirn, Herz, Magen-Darm-Trakt, Blutplättchen und der glatten Muskulatur des Menschen zu finden (Barnes et al. 1999, Mylecharane et al. 1990). Im Vergleich dazu stellen die 5-HT_{3a-e}-Rezeptoren Liganden-gesteuerte Ionenkanäle dar, welche die Natrium- und Kaliumpassage in den zentralen sowie peripheren Neuronen beeinflussen (Kelley et al. 2003). Die 5-HT₃-Antagonisten (z. B. Ondansetron und Tropisetron) werden überwiegend als antiemetische Medikamente eingesetzt. Die 5-HT₄, 5-HT₆ und 5-HT₇-Rezeptoren bilden die Gruppe der G_s-gekoppelten Rezeptoren, welche die Adenylylcyclase aktivieren und eine cAMP-abhängige Signaltransduktion auslösen (Bard et al. 1993; Monsma et al. 1993).

Da sich die vorliegende Promotionsarbeit mit der Charakterisierung von 5-HT₄-Rezeptoren auseinandersetzt, wird nun im Folgenden auf diese näher eingegangen. Als erstes pharmakologisch definiert wurde der 5-HT₄-Rezeptor im neuronalen Gewebe von Mäuseembryonen (Dumuis et al., 1988b). Später konnte der 5-HT₄-Rezeptor auch im humanen Myokard nachgewiesen werden (Kaumann et al. 1990; Ouadid et al. 1992). Aktuell sind neun Subtypen des humanen 5-HT₄-Rezeptors bekannt. Das humane 5-HT₄-Rezeptor-Gen ist auf Chromosom 5, Band 5q31-q33 lokalisiert (Claeyssen et al. 1997). Es wird zwischen den humanen 5-HT₄-Rezeptoren (h-5-HT_{4a-i}), sowie den vier Isoformen der Maus (m-5HT_{4a-f}) und der Ratte mit jeweils drei Untereinheiten (r-5HT_{4a-c}) differenziert. Die h-5-HT_{4a-i}-Rezeptor Isoformen sind alle im Atrium, Gehirn und Darm nachgewiesen worden, während in der Blase und den Nieren des Menschen nur die 5-HT_{4a} sowie die 5-HT_{4b}-Isoformen vorkommen sollen (Blondel et al. 1998).

Es sind eine Vielzahl möglicher physiologischer und pathophysiologischer Bedeutungen des 5-HT₄-Rezeptors beschrieben worden, wie zum Beispiel der Einfluss von 5-HT₄-Rezeptorliganden auf Gedächtnisleistungen oder die Beteiligung der 5-HT₄-Rezeptoren an der Entstehung des Morbus Alzheimer (Langlois M et al. 2003). Die Aktivierung des 5-HT₄-Rezeptors führt zur vermehrten Freisetzung von Acetylcholin, was in der glatten Muskulatur

des Magen-Darm-Traktes zu einer vermehrten Peristaltik und zu einem prokinetischen Effekt führt (Crowell et al. 2004).

Der humane 5-HT_{4a}-Rezeptor, der neben dem 5-HT_{4b}-Rezeptor hauptsächlich im menschlichen Herzen vorkommt, besteht aus 387 Aminosäuren (Bondel et al. 1997, Claeysen et al. 1997) und besitzt als letzte Aminosäuresequenz SCF im C-terminalen Ende. Die Ligandenbindungsstelle für das biogene Amin Serotonin befindet sich im Bereich der dritten transmembranären Domäne des 5-HT₄-Rezeptors, analog zum β -Adrenozeptor (Rivail et al. 2004). Von Pindon et al. 2002 wird die Hypothese vertreten, dass der 5-HT_{4a}-Rezeptor nicht nur die Adenylcyclase über das G_s-Protein aktivieren kann, sondern zusätzlich durch die G _{$\beta\gamma$} -Untereinheiten den L-Typ-Calcium-Kanal öffnet und damit die zytosolische Ca₂₊-Konzentration erhöht. Weiterhin wurde durch Kaumann et al. 2006 die Aktivierung von Phosphodiesterasen durch den 5-HT_{4a}-Rezeptor nachgewiesen.

1.3. Die elektromechanische Kopplung im Herzmuskel

Die elektromechanische Kopplung beschreibt den komplexen biologischen Prozess eines Aktionspotentials, das einen elektrischen Impuls auf der Zellmembran darstellt, und die Auslösung einer Kontraktion unter Aktivierung des Aktin-Myosin-Komplexes, was in den einzelnen Myokardzellen eine mechanische Energie zum Ergebnis hat.

Der Ort der Erregungsbildung befindet sich im Sinusknoten des rechten Vorhofs. Von dort aus erfolgt die Erregungsausbreitung über Gap Junctions, porenbildende Proteinkomplexe der Zellmembran, die die Kardiomyozyten miteinander verbinden. Dies wird als funktionelles Synzytium bezeichnet (Pape et al. 2012). Auf makroskopischer Ebene breitet sich die Depolarisierung von den Vorhöfen über AV-Knoten, His-Bündel, Tawara-Schenkeln, Purkinje-Fasern und am Ende über das gesamte Ventrikelmyokard aus. Die Kontraktion der Myokardzellen wird im Wesentlichen durch die zytosolische Ca₂₊-Konzentration bestimmt. Die Depolarisierung der Zellmembran führt zunächst zur Öffnung spannungsabhängiger L-Typ-Ca₂₊-Kanäle des Sarkolemm und einem Ca₂₊-Einstrom in die Zelle. Dieser Ca₂₊-Anstieg bewirkt die calciuminduzierte Calciumfreisetzung (CICR) (Fabiato und Fabiato, 1975). Die herzspezifischen Ryanodin-Rezeptoren Typ 2 sind Ca₂₊-Kanäle mit hoher Leitfähigkeit und werden durch das zytosolische Calcium aktiviert. Somit öffnen sie sich und lassen eine zusätzliche, quantitative noch größere Ca₂₊-Menge aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) in das Zytoplasma der Kardiomyozyten frei, woraufhin die Ca₂₊-Konzentration im Zellplasma von etwa 10⁻⁷ mol/L bis auf das Maximum von etwa 10⁻⁵ mol/L gesteigert werden kann (Tunwell et al. 1996). Der Ryanodin-Rezeptor bildet einen Proteinkomplex im junktionalen SR mit Junctin und Triadin, die wiederum Calsequestrin an den Komplex binden. Das herzspezifische Calsequestrin hat eine sehr hohe Affinität für Ca₂₊-Moleküle im

SR (Cala et al., 1990) und kann die Funktion des Ryanodin-Rezeptors regulieren. Dieser Einstrom aus dem SR stellt den größten Anteil der zytosolischen Ca_{2+} -Konzentration von mehr als 70% dar. Durch den Anstieg der zytoplasmatischen Ca_{2+} -Konzentration bindet das Ca_{2+} vermehrt an Troponin (Troponin C) wodurch eine Konformationsänderung des Troponinkomplexes eintritt, was die Wechselwirkung zwischen Tropomyosin und Aktin beeinflusst. Als Folge dessen kann sich das Myosinköpfchen an der hochaffinen Bindungsstelle des Aktins anlagern und der Querbrückenzyklus vollständig durchlaufen werden. Dieser Ablauf wird als Kontraktion in den Myokardzellen ersichtlich. Der Herzmuskel relaxiert, wenn die zytosolische Ca_{2+} -Konzentration unter etwa 10^{-7}mol/l gesunken ist. Hierfür sind hauptsächlich zwei Mechanismen in der Zelle verantwortlich. Zum einem erfolgt eine rasche Wiederaufnahme von Ca_{2+} -Ionen in das freie SR mit Hilfe einer membranständigen Ca_{2+} -ATPase (SERCA), nachdem das Ca_{2+} vom Troponin C dissoziiert ist. Dies ist ein ATP-abhängiger Prozess, wobei das Phospholamban durch die aktivierte Proteinkinase A am Serin 16 und durch eine Ca_{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II am Theronin 17 phosphoryliert wird, was im weiteren Verlauf zu einer Enthemmung der SERCA führt (Frank et al., 2003). Nachdem die Ca_{2+} -Pumpe aktiviert worden ist, fördert sie das zytosolische Ca_{2+} in das sarkoplasmatische Retikulum. Dabei unterstützt Calsequestrin diesen Austausch durch eine Verringerung des Ca_{2+} -Gradienten im SR (Kubalova et al., 2004). Im Gegensatz dazu kommt es bei dephosphoryliertem Phospholamban zu einer Hemmung der SERCA, die daraufhin weniger Ca_{2+} -Ionen in das SR transportiert (Tada et al., 1974). Der zweite Mechanismus zur Senkung der Ca_{2+} -Konzentration im Zytoplasma wird durch den $\text{Na}^+/\text{Ca}_{2+}$ -Austauscher im Sarkolemm bereitgestellt.

Um prinzipiell die Herzkraft zu beeinflussen, besteht die Möglichkeit β_1 -Adrenozeptoren zu aktivieren. Über stimulierende Gs-Proteine kommt es dann zur Aktivierung der Adenylcyclasen, zum cAMP-Anstieg und letztlich zur Aktivierung der PKA, die verschiedene Proteine in der Zelle phosphoryliert. Dazu gehören die in der Zellmembran zu findenden L-Typ- Ca_{2+} -Kanäle deren Offenwahrscheinlichkeit erhöht wird, sowie die Ca_{2+} -Freisetzungskanäle (Ryanodin-Rezeptoren, RyR) in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums. Diese Phosphorylierungsvorgänge bewirken, dass mehr Ca_{2+} in die Myokardzelle einströmen kann. Dieser Vorgang erhöht die Kontraktionskraft der Myokardzelle (positiv inotroper Effekt). Zum anderen kommt es zu einer Aktivierung der SERCA, die das zytosolische Ca_{2+} schneller in das sarkoplasmatische Retikulum pumpt, sodass die Herzmuskelzelle schneller relaxieren kann (lusitroper Effekt) (Bers et al. 2002).

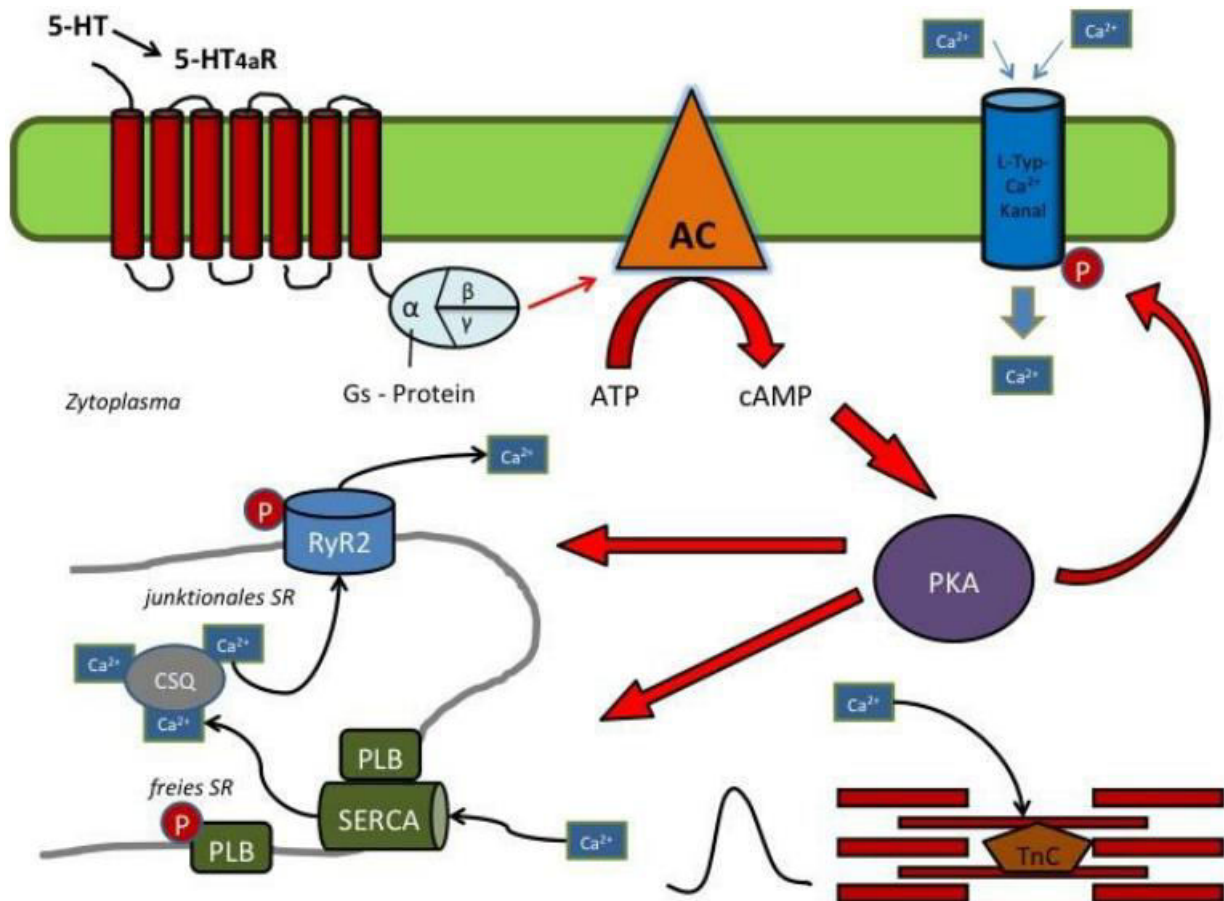


Abb. 1. Die schematisch dargestellte Signaltransduktion beschreibt die Bindung des biogenen Amins Serotonin am 5-HT_{4a}-Rezeptor und dessen Aktivierung der Myokardzelle. Nach der erfolgten Rezeptor-Liganden-Bindung kommt es zur Dissoziation eines G-Proteins in eine α -Untereinheit und Abspaltung der $\beta\gamma$ -Untereinheit. GDP wird durch GTP an der α -Untereinheit ersetzt. Dieser neu gebildete Komplex aktiviert die Adenylylcyclase (AC), woraufhin sich das zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP) bildet. Durch cAMP-Bindung kommt es zur Aktivierung der Proteinkinase vom A-Typ (PKA). Die PKA bewirkt durch Phosphorylierung des L-Typ-Ca²⁺-Kanals und dessen anschließender Öffnung eine Steigerung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration. Zusätzlich bewirkt die PKA eine Phosphorylierung des Ryanodin-Rezeptors Typ 2 (RyR) am sarkoplasmatischen Retikulum (SR), die eine Öffnung der Kanäle bewirkt und somit den Ca²⁺-Einstrom in die Myokardzelle weiter intensiviert. Der so entwickelte zytosolische Ca²⁺-Gradient bewirkt nun am Troponin C einen Querbrückenzyklus. Während der Diastole kommt es mit Hilfe der SERCA zum Wiedereinstrom des Ca²⁺ in das sarkoplasmatische Retikulum. Dieser Vorgang wird durch Phosphorylierung des Phospholambans (PLB) beschleunigt.

1.4. Vergleich der 5-HT₄-Rezeptoren und β -adrenergen Rezeptoren

Die 5-HT₄-Rezeptoren des humanen Myokards werden durch Serotonin aktiviert. Hierbei kommt es zu einer Gs-Protein vermittelten Bildung von cAMP mit anschließender Aktivierung der Proteinkinase A (Abb.1). Es sind mehrere Spleiß-Varianten der Serotoninrezeptoren im menschlichen Herzen bekannt, die sich bis zum Leucin 358 gleichen, aber auf unterschiedlichen C-Termini enden, die unterschiedlichen Funktionen dienen, wobei bis jetzt nicht alle im Detail analysiert werden konnten (Kaumann und Levy 2006). Die Aktivierung der Serotoninrezeptoren wirkt sich auf die Myokardzelle in Form einer Steigerung der Kontraktilität (positive Inotropie) sowie Steigerung der Relaxationsfähigkeit (positiv lusitroper Effekt) aus (Pau et al. 2003). Der positiv inotrope Effekt zeigt sich durch verlängerte bzw. erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit von phosphorylierten L-Typ-Ca₂₊-Kanälen und Ryanodin-Rezeptoren. Die Steigerung der Relaxationsfähigkeit mit schneller Rückaufnahme von Ca₂₊ durch die SERCA in das sarkoplasmatische Retikulum kommt durch eine Phosphorylierung des hemmenden Phospholambans am Serin 16 sowie Threonin 17 zustande (Gergs et al 2009). Damit zeigt sich im Wesentlichen eine identische Wirkungsweise zwischen den β ₁-adrenergen Rezeptoren und den 5HT_{4a}-Rezeptoren. Schematisch ist dies in der Abbildung 1 dargestellt. Dennoch gibt es Unterschiede:

Die zuvor beschriebenen Effekte durch die 5-HT_{4a}-Aktivität scheint auf die Myozyten des Atriums beschränkt zu sein. Die Arbeitsgruppe um Christ et al. (2014) stellte fest, dass es bei Patienten mit einem Sinusrhythmus zu einer Arrhythmie kommen kann, ausgelöst durch Katecholamine und Serotonin. Jedoch bei Patienten mit vorliegendem Vorhofflimmern diese Arrhythmien in deutlich reduzierter Form nur bei Aktivierung der 5-HT₄-Rezeptoren auftraten. Ein zusätzliches Unterscheidungsmerkmal konnte bei der Inotropie zwischen beiden Rezeptoren gefunden werden. Denn bei Patienten mit Vorhofflimmern zeigte sich die 5-HT₄-Rezeptor - vermittelte Inotropie deutlich reduziert im Vergleich zu β ₁-adrenergen Rezeptoren (Christ et al. 2014). Es wird vermutet, dass hier eine Entkopplung zwischen dem Ca₂₊-Einstrom über die L-Typ-Ca₂₊-Kanäle und dem Kontraktionsprozess vorliegt. Die deutlich niedrigere 5-HT₄-Rezeptor-Dichte im Vergleich zu den β ₁-adrenergen Rezeptoren (Kaumann et al. 1996), sowie die etwa 100fach kleineren Serotonin-vermittelten cAMP/PKA-Signale stellen ein weiteren Unterschied zwischen den beiden Rezeptortypen im menschlichen Herzen dar (Christ et al. 2014).

1.5. Serotonin-vermittelte Arrhythmien

Die intravenöse Gabe von Serotonin kann Arrhythmien am menschlichen Herzen auslösen (Hollander et al. 1957). Man nimmt an, dass über einen 5-HT₄-Rezeptor vermittelten cAMP-Anstieg eine Aktivierung von Kationenkanälen (Na⁺ und K⁺ = HCN-Kanäle) stattfindet und somit die Depolarisierung der Zellmembran beschleunigt wird, was daraufhin die Schrittmacherfrequenz am Sinusknoten erhöht (chronotroper Effekt). Dadurch können Tachykardien eingeleitet werden. Somit könnte auch die von Kaumann et al. 1994 beschriebene Einleitung eines Vorhofflimmerns und leichter ausgelösten Arrhythmien bei Patienten mit ischämischer Herzinsuffizienz durch Serotonin erklärt werden (Brattelid et al. 2004). Die Amplitudenerhöhung des Stroms durch die HCN-Kanäle (= *I_h*) der Schrittmacherzelle konnten mit spezifischen 5-HT₄-Rezeptor-Antagonisten blockiert werden (Pino et al. 1998). Die Therapie von Patienten mit β -Blockern zeigte einen potenzierten Effekt von 5-HT auf die Offenwahrscheinlichkeit der L-Typ-Ca₂₊-Kanäle und auf die arrhythmische Aktivität von Myozyten des Vorhofs (Pau et al. 2003).

Eine weitere Hypothese beschreibt die Serotonin-vermittelte Aktivierung der Calcium-Calmodulin Kinase II (CAMK II). CAMK II ist ein Vermittler der Ca₂₊-abhängigen Signalübertragung. Es handelt sich um eine multifunktionale Proteinkinase, die eine breite Palette von Substraten phosphorylieren und zahlreiche Zellfunktionen regulieren kann. Es kommt zu einer CAMK II abhängigen Phosphorylierung der Ryanodinrezeptoren Typ 2 im sarkoplasmatischen Retikulum. Aufgrund dieser Phosphorylierung entwickelt sich eine erhöhte Ca₂₊-Freisetzung aus dem SR, wobei es zu einem Anstieg der zytosolischen Ca₂₊-Konzentration kommt. Dieser Mechanismus hat womöglich einen Einfluss auf die Auslösung von Arrhythmien oder die Entstehung von gefährlichem Vorhofflimmern (Neef et al., 2010).

Außer am menschlichen Herzen zeigte Serotonin eine stimulierende Wirkung am Schweineherzen unter physiologischen Bedingungen (Parker et al. 1995). Am Vorhof von Schweineherzen konnten Rahme et al. 1999 Arrhythmien, vermittelt durch den 5-HT₄-Rezeptor, nachweisen. Nach einer induzierten ischämischen Herzinsuffizienz an Ratten konnte auch hier die Expression und Funktion von 5-HT₄-Rezeptoren nachgewiesen werden. Jedoch war dies nicht bei gesunden Myokardzellen der Ratte möglich (Qvigstad et al. 2005).

2. Fragestellung der Dissertationsarbeit

In der vorliegenden Dissertation sollen die physiologischen und pathophysiologischen Eigenschaften des 5HT_{4a}-Rezeptors näher untersucht werden. Dabei ist von entscheidender Bedeutung, dass ein positiv inotroper Effekt, ein positiv chronotroper Effekt, ein positiv lusitroper Effekt und ein positiv bathmotroper Effekt an humanen Kardiomyozyten wahrscheinlich auch durch Serotonin ausgelöst werden kann. Zusätzlich sind die serotoninbedingten Arrhythmien im menschlichen Herzen und das Vorhofflimmern wichtige Phänomene (Christ et al., 2014), die weiter untersucht werden müssen. Um dafür ein geeignetes Modellsystem zu schaffen, entwickelten wir das hier untersuchte transgene Mausmodell. Dazu wurden humane 5-HT_{4a}-Rezeptoren spezifisch im Herzgewebe der Maus überexprimiert (Gergs et al. 2010, 2013). Die Unterscheidung zwischen Wildtyp-Maus und transgener Maus erfolgt mittels PCR. Die weitere Charakterisierung des Modells erfolgt *in vivo* durch Echokardiographie, *in vitro* durch Versuche an isoliert perfundierten Herzen und Western Blot-Analysen, die die oben genannten Eigenschaften überprüfen sollten. Das neu geschaffene Mausmodell soll anschließend zur Untersuchung klinisch wichtiger pharmakologischer Stoffe eingesetzt werden, damit in Zukunft vielleicht eine Therapie kardialer Erkrankungen wie der chronischen Herzinsuffizienz oder Arrhythmien durch Beeinflussung u.a. von 5-HT_{4a}-Rezeptoren entwickelt werden kann.

3. Material und Methoden

3.1. Eigenschaften der transgenen Mäuse

Für die Experimente wurde eine transgene Mauslinie verwendet. Dazu wurde die α -MHC-5-HT_{4a}-Expressionskassette in befruchtete Eizellen der Mauslinie FVB/N (siehe Abb.2.) injiziert. Die entstandenen 5-HT_{4a}-Rezeptor-transgenen Tiere wurden in einen CD1-Hintergrund eingekreuzt und zeigten eine herzspezifische Überexpression dieses Rezeptors. Diese stand unter Kontrolle des Promotors der α -Isoform der schweren Kette des Myosins (α -MHC) (Gergs et al. 2010). Jeweils gleichaltrige Wildtyp-Geschwistertiere dienten als Kontrollen. Die Mäuse wogen zwischen 25 g und 35 g und wurden mit handelsüblichem Labortierfutter und Leitungswasser *ad libitum* versorgt. Beide Geschlechter waren gleich häufig vertreten und waren 12 - 14 Wochen alt.

Tab.1. Eigenschaften von Wildtyp (WT) und transgenen (TG) Versuchstieren

	WT Maus			TG Maus		
Körpergewicht [g]	42.8	±	5.4	40.8	±	5.2
Herzgewicht [mg]	222.2	±	36.2	213.8	±	26.3
Verhältnis Körpergewicht / Herzgewicht	5.18	±	0.27	5.26	±	0.44
Plasma						
Noradrenalin [pg/ml]	2412	±	279	3454	±	386*
Adrenalin [pg/ml]	585	±	127	590	±	84
Herz						
Noradrenalin [pg /ml]	423	±	18	418	±	24
Adrenalin [pg/ml]	15	±	4.2	11	±	1.5
5-HT [pg/ml]	570	±	280	580	±	480

* $p < 0,05$ versus WT

3.2. Genotypisierung der Mäuse

3.2.1. Isolation der DNA

Jeder Maus wurde im Alter von vier Wochen ein etwa 3-5 mm langes Schwanzstück abgetrennt. Zur Erkennung erhielten sie eine Ohrmarkierung. Das Gewebe wurde unter Zugabe von 700 µl TE- / SDS-Puffer und 30 µl Proteinase K bei 56°C ca. zwölf Stunden schüttelnd proteolytisch aufbereitet. Um die genomische DNA aus dem Lysat zu gewinnen, wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion vorgenommen (Sambrook et al. 1989). Durch diese Vorgehensweise wird erreicht, dass sich die Proteine und Nukleinsäuren durch Phenol und Chloroform trennen lassen, wobei jeweils eine obere wässrige und eine untere organische Phase entstehen. Proteine und andere Verunreinigungen reichern sich in der organischen Phase bzw. der Interphase an. Nach abgeschlossener enzymatischer Zersetzung des Schwanzstückes mittels Proteinase K wurde das Homogenat mit 700 µl puffergesättigtem Phenol versetzt und gut vermischt. Durch fünfminütige Zentrifugation bei 14000 rpm entstanden zwei Phasen, deren obere wässrige Phase unter Aussparung der Interphase vorsichtig abgenommen wurde. Anschließend wurden jeweils 350 µl Phenol und 350 µl Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (24:1) hinzu gegeben, gemischt, und erneut fünf Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Zu der abgenommenen oberen wässrigen Phase wurden 70 µl Natriumacetat (pH=6) und 700 µl abs. Ethanol gegeben, um die DNA zu fällen und Phenolreste zu beseitigen. Durch zehnminütige Zentrifugation bei 14000 rpm wurde die DNA sedimentiert. Nach Verwerfung des Überstandes wurde das DNA-Sediment mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und für weitere zehn Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Sediment sorgfältig vom Überstand befreit, bei Raumtemperatur getrocknet, in 50 µl TE-Puffer aufgenommen, und abschließend für 15 min bei 65 °C inkubiert. Bis zur Weiterverwendung wurden die Proben bei 4 °C gelagert.

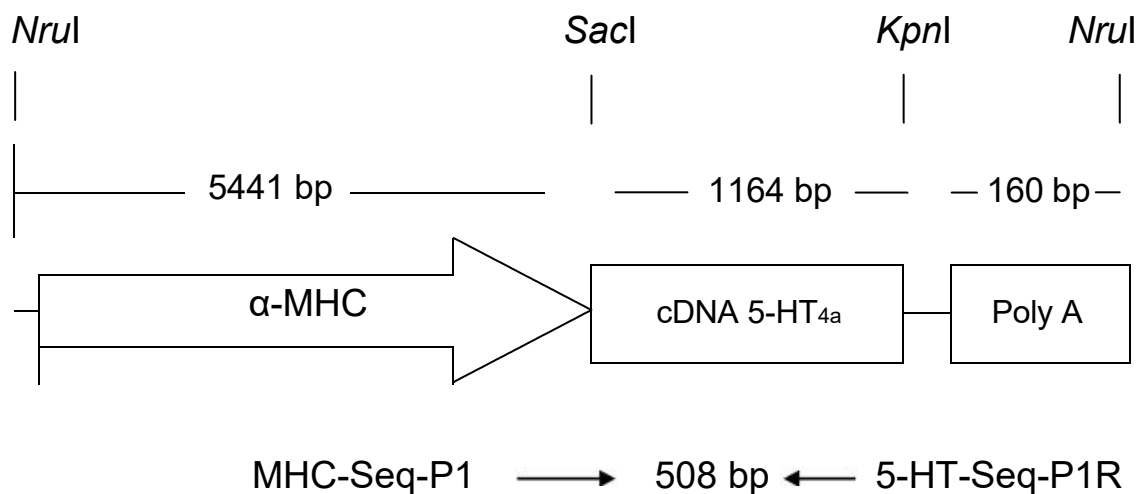


Abb.2. Schematische Darstellung der α -MHC-5-HT_{4a}-Rezeptor-Expressionskassette
Zur Generierung transgener Mäuse mit einer herzspezifischen Überexpression von humanen 5-HT_{4a}-Rezeptoren wurde die α -MHC-Expressionskassette in befruchtete Eizellen von Mäusen injiziert. Die kodierende Sequenz des humanen Rezeptors wurde zuvor mit Hilfe der Restriktionsendonucleasen KpnI und SacI geschnitten und in die Expressionskassette eingefügt. Die Transkription der Sequenz stand unter der gewebespezifischen Kontrolle des α -MHC-Promotors der Maus. Das Transgen konnte mittels spezifischer Primer (MHC-Seq-P1: forward primer, 5-HT-Seq-P1R: reverse primer) in der genomischen DNA der Maus nachgewiesen werden. Das erwartete PCR-Produkt hatte eine Größe von 508 bp.

3.2.2. Konzentrationsbestimmung der DNA

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch (Biophotometer) durch Messung der Extinktion bei 260 nm (E_{260}) bestimmt. Die optische Dichte (OD) mit dem Wert 1,0, bei einer Schichtdicke von 1 cm, entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$. Nach der Formel $E_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor} = X \mu\text{g/ml}$ kann man den DNA-Gehalt berechnen.

Außerdem wurde die optische Dichte bei 280 nm gemessen. Der Quotient aus der OD bei 260 nm und der OD bei 280 nm verweist auf den Reinheitsgrad des DNA-Produktes. Der Quotient sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

3.2.3. PCR und Agarosegelelektrophorese

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

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

3.3. Histologische Untersuchungen

Um mögliche histologische Veränderungen an den Herzen bzw. Kardiomyozyten sichtbar zu machen, wurden histologische Färbungen sowohl an Präparaten von Wildtyp-Mäusen als auch an transgenen Tieren vorgenommen. Dabei wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. med. Steffen Hauptmann (Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) entparaffinierte und rehydratisierte Gewebeschnitte von formaldehydfixierten ventrikulären Proben mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Außerdem erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Igor Buchwalow (zu der Zeit: Gerhard Domagk-Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Münster) die immunohistologische Untersuchung mit einem primären Antikörper gegen Serotoninrezeptoren (Gergs et al 2010). Dabei wurden fünf jeweils unabhängige Versuche durchgeführt.

3.4. Echokardiographie von TG- und WT-Mäusen

3.4.1. Versuchsdurchführung und Erfassung von Messdaten

Die Versuchstiere wurden jeweils in zwei Gruppen von 5 bis 7 WT - Mäusen und TG - Mäusen eingeteilt und waren zwischen 12- 14 Wochen alt.

Die Echokardiographie erfolgte unter Verwendung einer 10-MHz-Toshiba-Ultraschallsonde. In der Papillarmuskelebene wurden die klinisch relevanten Messungen durchgeführt, die zur Beurteilung der Morphologie und Funktion des linken Ventrikels eine Aussage erlaubten.

Durch die Dokumentation der Herzaktion mittels M-Mode kann das Bewegungsmuster des linken Ventrikels im zeitlichen Verlauf von Systole zur Diastole nachvollzogen werden (siehe Abb. 8). Der diastolische und systolische Durchmesser sowie die Wand- und Septumdicke werden dabei gemessen. Mit diesen erhobenen Daten wird die Verkürzungsfraction (FS) als Maß für die Pumpfunktion des linken Ventrikels errechnet. Während der Echokardiographie atmeten die Versuchsmäuse spontan unter dem Inhalationsanästhetikum Isofluran (1,5 %) auf einer Wärmeplatte (Ebelt et al. 2007). Es wurden jeweils drei Kontrollmessungen bei allen Versuchstieren in einem vorgeschriebenen Zeitfenster von 120 - 300 Sekunden durchgeführt. Im Anschluss wurden den Versuchstieren paarweise (TG-Maus und WT-Maus) am 1. Untersuchungstag intraperitoneal 100 µl Isoprenalin (Konzentration: 10 mM in physiologischer NaCl-Lösung) mittels einer Subcutannadel B. Braun Sterican 27G appliziert. Im Verlauf wurden drei Messpunkte innerhalb von maximal 300 Sekunden dokumentiert. Am 2. Untersuchungstag erfolgten die Serotoninapplikation mit 100 µl intraperitoneal und die erneute Dokumentation von drei Messungen in dem vorgegebenen Zeitfenster.

3.4.2. Berechnung der Daten

Die Verkürzungsfraction (Fractional Shortening) stellt einen relativen Wert dar, der beschreibt, um wie viel Prozent der linke Ventrikel während der Systole gegenüber der Diastole kleiner wird. Die Berechnung erfolgt durch $(LVEDD - LVESD) / LVEDD \times 100$ (Lang et al. 2005.). Dabei steht LVEDD für den linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser und LVESD für linksventrikulären endsystolischen Durchmesser. Zusätzlich erfolgte die Dokumentation der Herzfrequenz in Schlägen pro Minute (bpm) und die linksventrikuläre Wanddicke während der Systole gemessen in Millimeter.

3.5. In vitro hämodynamische Messung mit dem „working heart“- Modell

3.5.1. Versuchsaufbau

Mit Hilfe der „working heart“-Methode kann die linksventrikuläre Funktion an isoliert perfundierten Mäuseherzen bei kontrollierter Vor- und Nachlast unabhängig von neuralen, hormonellen oder hämodynamischen Einflüssen sowie anderen Kompensationen untersucht werden („working heart“-Modell; Grupp et al. 1998, Neely et al. 1967). Bei dieser Methode wird das Herz anterograd perfundiert, d.h. ebenso wie im Körperkreislauf erfolgt der Zustrom über die Pulmonalvene (siehe Abb.3.)

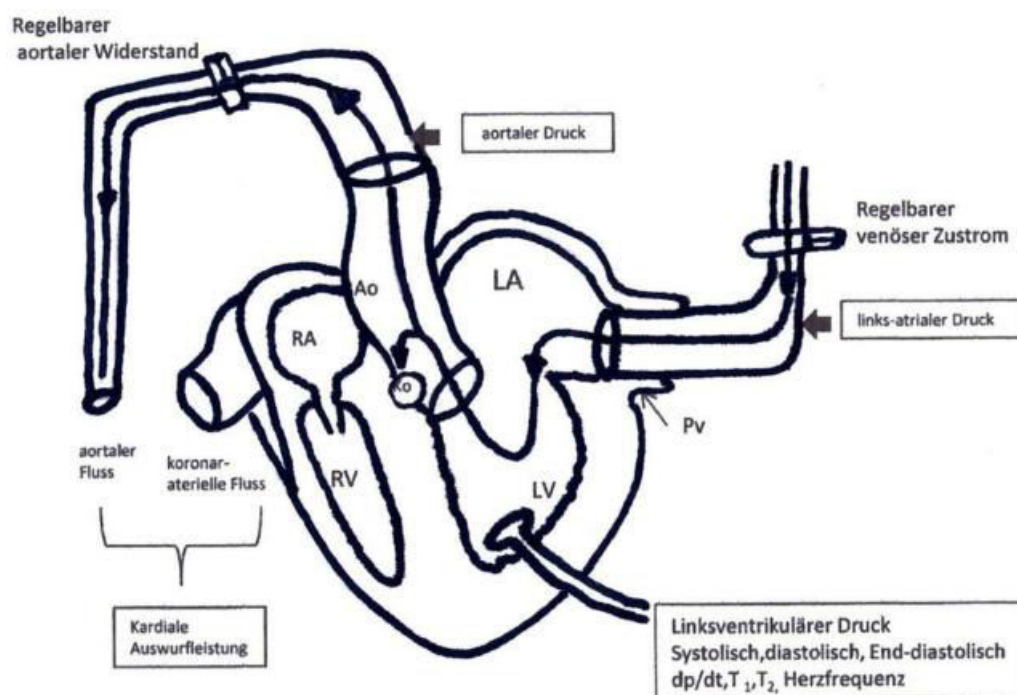


Abb.3. Schematische Darstellung einer „working heart“ Versuchsanordnung. „Arbeits-leistendes Herz“- Anterograde Perfusion des linken Vorhofs (LA) und des linken Ventrikels (LV) durch die Pulmonalvene. Registrierbare Parameter sind: Links-atrialer Druck, aortaler Druck, linksventrikulärer Druck (systolisch, diastolisch, End-diastolisch) und davon abgeleitet die maximalen Druckanstiegs- bzw. Druckabfallsgeschwindigkeiten (dp/dt), die Kontraktionszeiten (T_1), die Relaxationszeiten (T_2) sowie die Herzfrequenz. Das Perfusat wird über die Aorta (A) ausgeworfen (aortaler Fluß), ein Teil gelangt über die Koronararterien (KO) in den rechten Ventrikel (RV) (koronararterieller Fluß). Aortaler Fluß und koronararterieller Fluß bilden zusammen die kardiale Auswurfleistung. Da venöser Zustrom (= Vorlast) und aortaler Druck (= Nachlast) regelbar sind, kann die Leistung des Herzens (= Vorlast (ml/min) \times Nachlast (mmHg)) kontrolliert werden.

Dazu wurden die Mäuse mit 2 g/kg Urethan (Sigma, Deisenhofen) intraperitoneal anästhesiert (Kass et al. 1998), der Thorax eröffnet und die Herzen am Gefäßstamm abgetrennt. Kurz vor der Narkose wurde ihnen zur Antikoagulation 1,5 U Heparin i. p. verabreicht. Anhaftendes Gewebe wurde in warmen und mit Carbogen begasten Krebs-Henseleit-Puffer entfernt und die Aorta an einer Kanüle befestigt. Um das Herz zu versorgen wurde nach maximal acht Minuten zunächst mit einer retrograden Perfusion des Herzens begonnen. Das Herz wurde dabei durch die Aorta mit einem Perfusionsdruck von 50 mmHg mit 37,6°C warmen KHL-Puffer perfundiert. Ein sieben Zentimeter langer Polyethylenschlauch (Micromed, Houston TX) wurde über die Pulmonalvene durch die Mitralklappe in den linken Ventrikel eingeführt und nahe an der Herzspitze durch die Ventrikelwand gestoßen. Der Schlauch wurde durch das Gewebe nach außen gezogen bis das obere verbreiterte Ende an der Ventrikelwand anstieß (intraventrikulärer Katheter). Eine weitere Kanüle wurde in die Öffnung der Pulmonalvene eingeführt und befestigt. Anschließend wurde die retrograde Perfusion unterbrochen und auf eine anterograde Perfusion des Herzens (siehe Abb.3.) mit einem Puffer-Zustrom von 5 ml/min umgestellt. Das Herz pumpte gegen einen elastischen Widerstand, hervorgerufen durch etwa einen Milliliter Luft in einem Pufferreservoir („Windkessel“) direkt über dem Herzen. Der Zustrom und die Temperatur des Puffers wurden durch eine Flusssonde (Transonic, Ithaca, USA) bzw. durch einen Temperaturmessfühler (CONRAD Electronics, Hirschau) kontrolliert. Ein aortaler Widerstand von 50 mmHg wurde durch die Höhe einer hydrostatischen Säule eingestellt (Gauthier et al. 1998). Während der Perfusion wurden die Kontraktionsdaten mit der Computersoftware Chart™ 5 (PowerLab, ADInstruments, Spechbach, Deutschland) kontinuierlich aufgezeichnet und anschließend ausgewertet.

3.6. Biochemische Methoden

3.6.1. Homogenisierung der Proben

Die in der Working heart - Untersuchung verwendeten Herzen wurden am Ende des Versuchs in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für den Proteinnachweis im Westernblot benutzt und dazu bis zur weiteren Aufbereitung bei -80°C gelagert. Alle für die Homogenisation benötigten Geräte wurden mit flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Die Proben wurden in ein Teflongefäß gegeben, mit 100 µl Lysispuffer versetzt und anschließend bei 2.400 rpm im Mikrodismembrator für 60 Sekunden pulverisiert. Das tiefgekühlte Pulver wurde mit einem Spatel entnommen, in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und mit weiteren 100

µl Lysispuffer versetzt. Nach dem Auftauen wurden die Proben mit dem Rüttler gemischt und auf Eis gelagert. Es wurde 3 x 15 Sekunden eine Ultraschallhomogenisation auf Eis durchgeführt, worauf sich eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur anschloss. Um alle restlichen unlöslichen Bestandteile zu entfernen, wurde 30 Minuten lang bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand mit den gelösten Proteinen wurde in ein neues Gefäß überführt und bei -80°C gelagert.

3.6.2. Bestimmung des Proteingehaltes der Homogenate

Um den Proteingehalt der Proben zu ermitteln, wurde eine Dreifach-Bestimmung nach Lowry et al. (1951) durchgeführt. Als Proteinstandard wurde 1 mg Rinderserumalbumin/ml verwendet. Es wurde eine aufsteigende Verdünnungsreihe der Proben und des Standards mittels Aqua destillata hergestellt, diese jeweils mit 500 µl Lösung D (2% Na₂CO₃ in 0,1 NaOH; 1% Na⁺-K⁺-Tartrat; 0,5% CuSO₄) versetzt und anschließend 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde in jedes Röhrchen 0,1 ml der Lösung E (Folin-Ciocalteus) gegeben, gemischt und wieder 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Standard- und Probenlösungen wurden in Küvetten umgefüllt und bei 595 nm im Eppendorf BioPhotometer (Programm: Lowry) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit dem Microsoft Programm Excel.

3.6.3. SDS-PAGE nach Porzio und Pearson

Zur Vorbereitung der Gelelektrophorese wurden zunächst die nötigen Glasplatten mit Ethanol und Aqua destillata gesäubert, woraufhin die Gelapparatur zusammengebaut werden konnte. Es wurden 10%ige Trenngelle (Porzio und Pearson, 1977) verwendet, die in die Apparatur gegossen wurden und über Nacht bei 4°C (Kühlraum) auspolymerisieren konnten. Als Verdunstungsschutz wurde ein H₂O-Isopropanol-Gemisch und Parafilm als Abdeckung verwendet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde darauf ein 4%iges Sammelgel (Lämmli, 1970) gegossen, welches 1 Stunde bei Raumtemperatur zur Polymerisation stehen gelassen wurde. Die Proben wurden entsprechend ihres Proteingehaltes mit 2 x Ladepuffer und 10 mM NaHCO₃/20% SDS hergestellt, um die gewünschten Konzentrationen zu erzielen. Zur Denaturierung wurden Größenmarker und Proben 10 Minuten lang bei 95°C erhitzt. Nicht erhitzte Proben wurden bei Raumtemperatur verwendet. Pro Spur wurde das Gel mit 100 µl Probe beladen, sowie 25 µl des Markers. Die Gelelektrophorese erfolgte in einer vertikalen Elektrophoresekammer, die kontinuierlich auf

4°C gekühlt und mit Elektrophoresepuffer bestückt war. Zunächst wurde eine Stromstärke von 40 mA pro Gel angelegt, welche, nachdem die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten, auf 60 mA erhöht wurde. Nach ca. 240 Minuten hatte die Lauffront (Bromphenolblau) den unteren Rand des Trenngels erreicht und das Gel konnte für den Transfer verwendet werden (Puffer und Lösungen siehe Anhang).

3.6.4. Western Blot

Für den Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran wurde ein Aufbau, aus zwei Schwämmen, zwei Filterpapieren, der Nitrozellulose-Membran, des Gels, unter Zugabe von Transferpuffer (siehe Anhang), luftblasenfrei zusammengestellt. Dieses wurde für den Transfer mit dem entsprechenden Puffer in die Transferkammer überführt und über Nacht bei 4,5 Ah und 4°C stromkonstant laufen gelassen. Zur Erfolgskontrolle des Transfers wurden die Proteine auf der Nitrozellulose-Membran mit Ponceaurot angefärbt.

3.6.5. Immunologischer Nachweis von SR-Proteinen

Zum Nachweis der Proteine mit Antikörpern wurde zunächst die Nitrozellulosemembran den Proteingrößen (Tab.3.) entsprechend zugeschnitten. Die Membranstreifen wurden in Kunststoffgefäße überführt und 2 x 15 Minuten mit TBST gespült, um das Ponceaurot auszuwaschen. Zur Blockierung freier Bindungsstellen auf der Membran wurden die Membranstreifen für den Nachweis von SERCA, Triadin, Junctin, Serin-16P-PLB, Threonin-17P-PLB sowie CSQ mit 5% Milchpulver in TBST, eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Selbiges erfolgte mit den PLB-Streifen, hier wurde jedoch 2% Rinderserum-Albumin in TBST, anstelle des Milchpulvers, verwendet. Der Blockierungspuffer wurde abgegossen und der erste Antikörper (Tab. 2) auf die Membranstreifen gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach Dekantierung des ersten Antikörpers wurde jeder Streifen 3 x 10 Minuten mit TBST gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper für zwei Stunden bei Raumtemperatur, wobei für jeden Streifen eine Antikörperverdünnung von 1:1000 verwendet wurde (siehe Tab.2.). Danach wurde 3 x 10 Minuten mit TBST und 2 x 2 Minuten mit AP-Puffer gespült. Als semiquantitative Nachweismethode wurde die Farbreaktion mit NBT/BCIP verwendet. Die frisch hergestellte Farbstofflösung wurde auf die Membranstreifen gegeben bis Banden zu sehen waren. Anschließend wurden die Blots mit Aqua destillata gespült und zur Dokumentation eingescannt (Puffer und Lösungen siehe Anhang).

Tab.2. Übersicht der verwendeten Antikörper

Antikörper	Medium 1.Antikörper	Verdünnung 1.Antikörper	Medium 2.Antikörper	Verdünnung 2.Antikörper
anti-SERCA	5% (W/V) Milchpulver in TBST	1:3000	anti-mouse IgG 5% (W/V) Milchpulver in TBST	1:1000
anti-CSQ	5% (W/V) Milchpulver in TBST	1:1000	anti-rabbit IgG 5% (W/V) Milchpulver in TBST	1:1000
anti-TRD	5% (W/V) Milchpulver in TBST	1:1000	anti-rabbit IgG 5% (W/V) Milchpulver in TBST	1:1000
anti-JCN	5% (W/V) Milchpulver in TBST	1:1000	anti-rabbit IgG 5% (W/V) Milchpulver in TBST	1:1000
anti-PLB	2% (W/V) BSA in TBST	1:1000	anti-mouse IgG 5% (W/V) Milchpulver in TBST	1:1000

Tab.3. Größenbereiche für den Proteinnachweis im Western Blot

Protein	Größenbereich im Gel (kDa)
SERCA	ca. 96
CSQ	ca. 55
TRD	ca. 35 und 40 (glykosyliert)
JCN	ca. 26
PLB (erhitzt auf 95°C)	<12

3.7. Tryptophan-, Serotonin- und Katecholaminbestimmungen mittels HPLC

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (engl. high performance liquid chromatography, HPLC (Daul et al. 1995)) ist ein chromatografisches Trennverfahren, welches hier zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Tryptophan, Serotonin, Adrenalin und Noradrenalin im Herzgewebe von Mäusen genutzt wurde. Das Gewebe wurde durch die Entnahme des Herzens von narkotisierten Mäusen gewonnen, von denen die Hälfte 16 h vor Versuchsbeginn mit Reserpin i.p. behandelt wurde um die intrazellulären Katecholaminspeicher in den Nervenenden im Herzen zu leeren. Um die Koronararterien von Blut zu befreien, wurden die Herzen 20 min in einer Langendorffapparatur perfundiert. Danach wurden sie im flüssigen Stickstoff gefroren und bei -80°C bis zur Weiterbehandlung gelagert. Zur Messung des Substanzgehaltes im Gewebe wurden 100 mg gefrorenes Herzgewebe bei 0°C in 0,4 M HClO₄ mit 0,1% Ascorbinsäure, 0,1% Cystein, 3 mM Glutathion und 2 mM EDTA homogenisiert. Nach Zentrifugation (5 min, 6000 rpm, 0°C) wurden 20 µl des Überstandes mit 3 µl NaOH (2,5 M) neutralisiert und sofort in die HPLC-Säule überführt. Die Auftrennung durch HPLC wurde in einer Eurosphere 100-5C8 Säule (250 x 4,4 mm i.d. Knauer, BRD) bei 30°C durchgeführt. Diese Versuchsreihe erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Klaus Pönicke aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

3.8. Behördliche Genehmigungen und Sicherheitsbestimmungen

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

3.9. Statistische Auswertung

Aus den Versuchsergebnissen wurden das arithmetische Mittel und der zugehörige Standardfehler des Mittelwertes (SEM) errechnet. Mit n wurde die Anzahl der Einzelversuche bezeichnet. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurde mittels t-Test nach Student beurteilt. Bei einem Vergleich mehrerer Gruppen wurde die statistische Signifikanz durch eine Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur festgestellt (Wallenstein et al. 1980). P-Werte mit einem Betrag kleiner oder gleich 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1. Genotypisierung der Versuchstiere

Zur Überprüfung einer erfolgreichen Integration des 5-HT_{4a}-Rezeptor-Transgens in die DNA der Nachkommen, wurde aus Schwanzbiopsien der Tiere die genomische DNA isoliert und eine PCR durchgeführt. Das PCR-Programm und die verwendeten Primer sind im Anhang aufgeführt.

Im Vorfeld wurde die Qualität der extrahierten DNA überprüft. Hierfür wurde die optische Dichte (OD) bei jeweils 260 nm und 280 nm gemessen und der Quotient aus beiden Werten gebildet. Dieser lag bei allen Proben zwischen 1,75 und 1,92, was einen hohen Reinheitsgrad der DNA bestätigte.

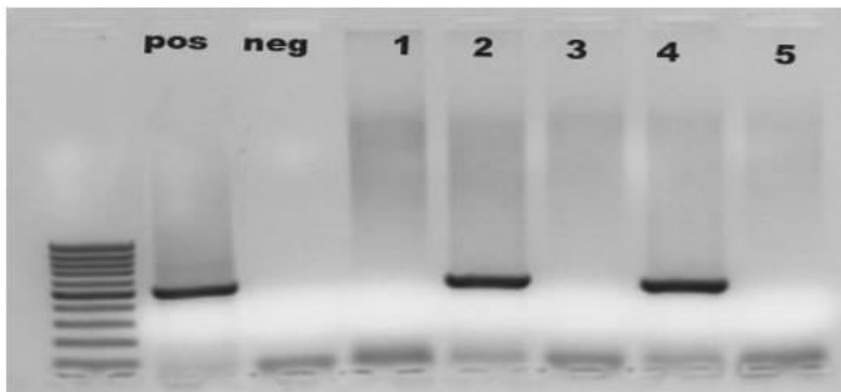


Abb.4. Genotypisierung durch PCR; Maus 2 und 4 sind TG-Mäuse und 1, 3 und 5 WT-Mäuse. Abgebildet sind die mittels Gelelektrophorese aufgetrennten PCR-Produkte. Die amplifizierte DNA-Sequenz hat eine Größe von 508 bp. Eine 100 bp-DNA-Leiter diente als Größenstandard; pos, Positivprobe; neg, Negativprobe

4.2. Histologie

Die Abbildung 5 zeigt die 5-HT_{4a}-Rezeptor-Expression in den Herzen von erwachsenen (Alter: 12-14 Wochen) transgenen Mäusen. Der Nachweis von 5-HT_{4a}-Rezeptoren (grün) in den Myokardzellen erfolgte mittels Immunhistologie. Man beachte die sarkolemmale Lokalisation des Rezeptors entsprechenden Signals und dessen Überexpression in histologischen Bildern der TG-Mäuse. Die histologische Präparate in Abb. 5B zeigen bei einer höheren Vergrößerung, das gestreifte Expressionsmuster, welches mit der Lokalisierung der 5-HT_{4a}-Rezeptoren mit dem T-Tubulus-System übereinstimmt.

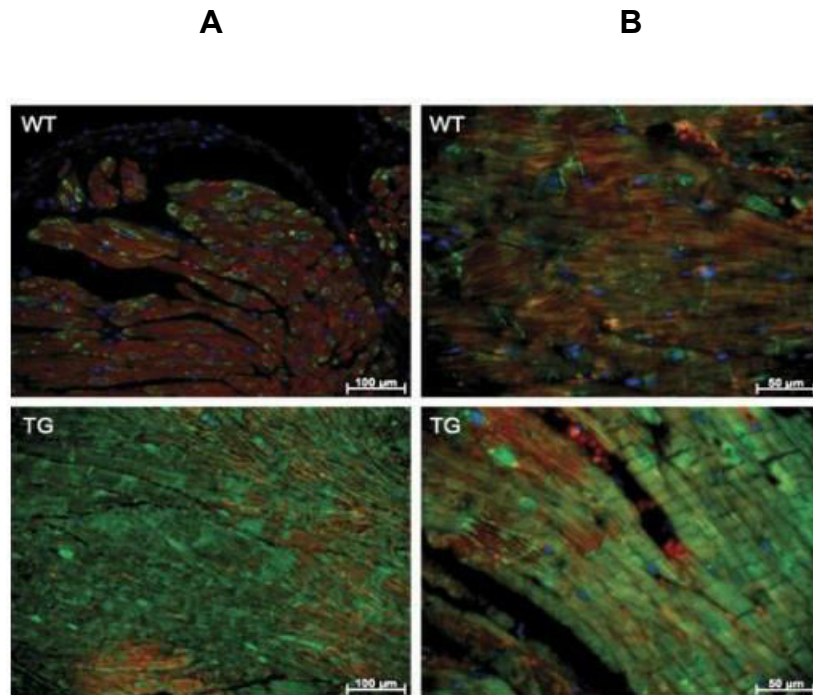


Abb.5. Immunhistologischer Nachweis des 5-HT₄-Rezeptors (grün) in Herzschnitten von transgenen Mäusen (TG) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (WT) (A und B). Bei höherer Vergrößerung (B) wird eine Querstreifung des Expressionsmusters sichtbar, was für eine Lokalisation des 5-HT₄-Rezeptors im Bereich der T-Tubuli spricht. Die Zellkerne wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) blau gefärbt.

4.3. Auswertung der Echokardiographie

Es wurden 5-HT_{4a}-Rezeptor überexprimierende Tiere (TG, n=7) mit Wildtyp-Tieren (WT, n=5) verglichen. Unter Kontrollbedingungen *in vivo* unterschieden sich die Herzfrequenzen von WT (483 ± 12 bpm) und 5-HT_{4a}-Rezeptor überexprimierenden Tieren (466 ± 19 bpm) nicht (Abb.6.). Nach Applikation von Isoprenalin zeigte sich ein Frequenzanstieg sowohl bei WT mit 580 ± 14 bpm, wie auch bei den TG Mäusen mit 579 ± 9 bpm ($p < 0,05$; TG u. WT, Isoprenalin vs. Kontrolle; siehe Abb. 6). Wie zu erwarten war, kam es zu einer Steigerung der Herzfrequenz durch Stimulation mit Isoprenalin, das als nicht-selektiver Agonist die β_1 - und β_2 -Rezeptoren der TG und WT Mäuse aktiviert.

Die maximale Stimulation durch Serotonin führte nur bei den TG Mäusen zu einem Anstieg der Herzfrequenz mit 565 ± 10 bpm ($p < 0,05$; TG, Serotonin vs. Kontrolle; siehe Abb. 6). Dies war nicht bei den WT Tieren zu beobachten mit 498 ± 19 bpm ($p < 0,05$; Serotonin, WT vs. TG; siehe Abb.6.A).

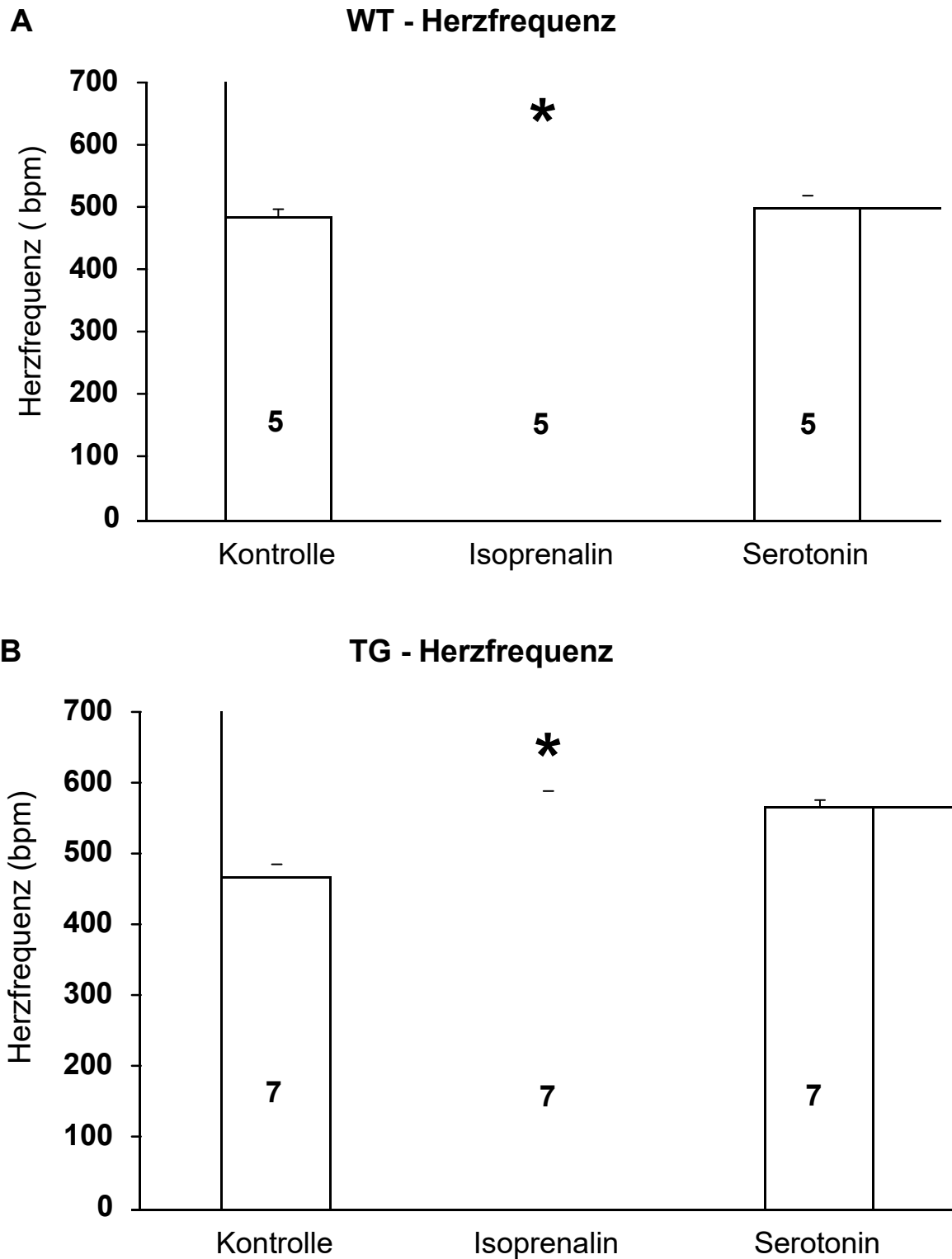


Abb. 6. Während der Echokardiographie erfasste Herzfrequenz unter Kontrollbedingungen, Isoprenalingabe und Serotoningabe bei WT (A) und TG (B) Tieren. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, + $p < 0,05$ vs. WT. Die Zahlen in den Säulen entsprechen der Anzahl der Versuchstiere.

Die FS (fractional shortening in %) wurde im Verlauf der M-Mode-Echokardiographie berechnet und aufgezeichnet. Unter Kontrollbedingungen konnte kein Unterschied zwischen den TG ($38 \pm 2\%$) und WT Tieren ($36 \pm 2\%$) gemessen werden. Nach Isoprenalingabe stellte sich bei beiden Versuchsgruppen eine Erhöhung der FS ein. Diese lag bei den WT bei $56 \pm 2\%$ und bei den TG Tieren bei $50 \pm 3\%$ ($p < 0,05$; WT; TG, Kontrolle vs. Isoprenalin; siehe Abb.7.). Nach Serotoningabe zeigte sich eine Erhöhung der FS bei TG-Mäusen ($55 \pm 2\%$), nicht aber bei WT-Versuchstieren ($44 \pm 2\%$) ($p < 0,05$; 5-HT; WT vs.TG; siehe Abb.7.).

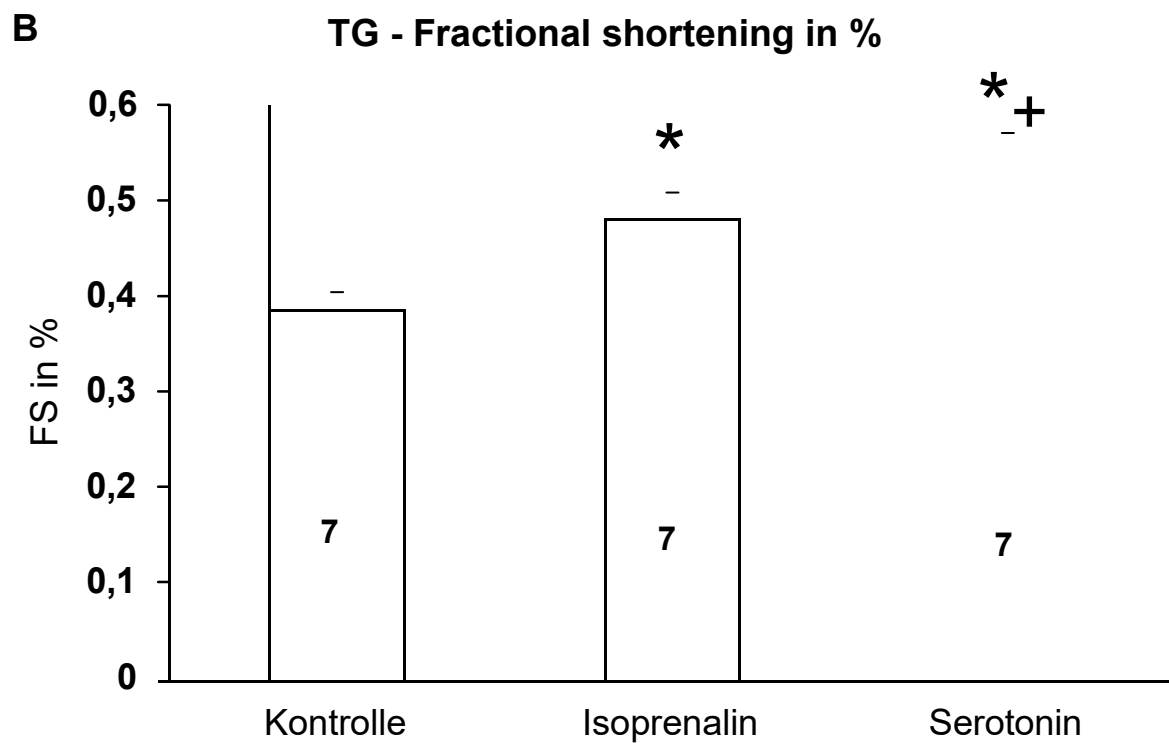
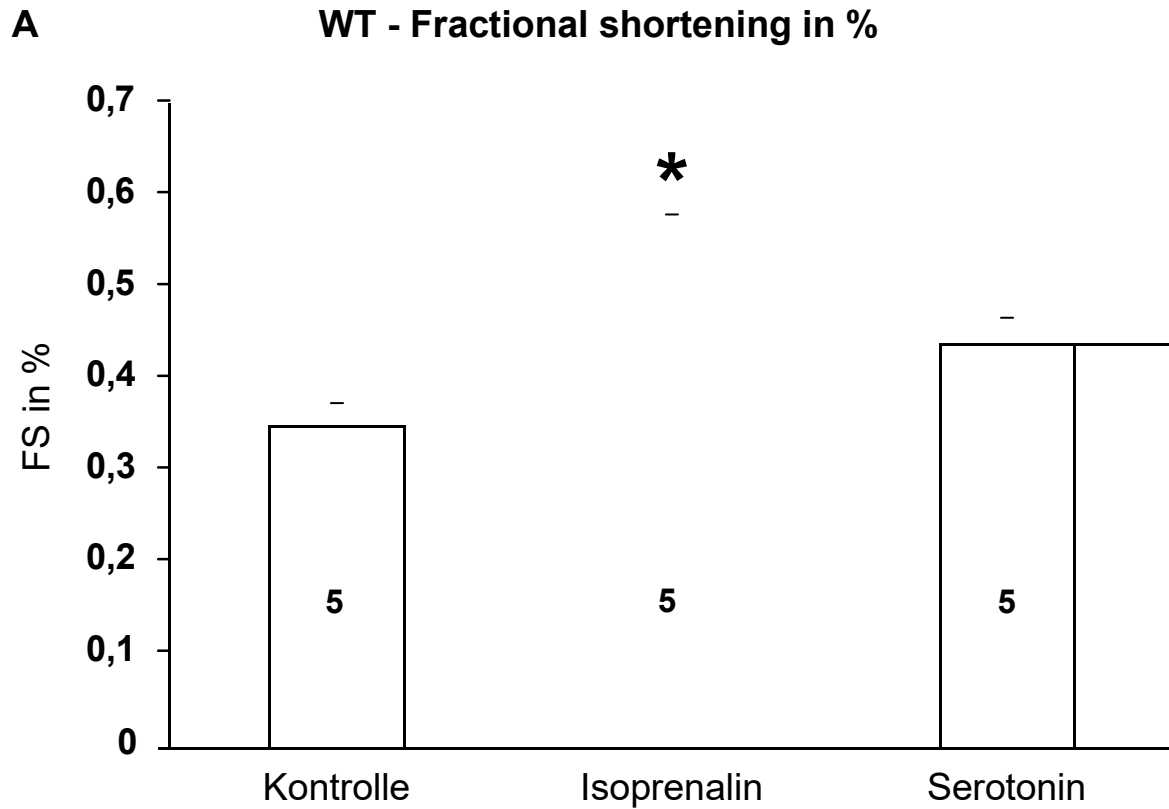


Abb.7. Echokardiographisch bestimmte kardiale Verkürzungsfraktion (Fractional Shortening = FS in %) unter Kontrollbedingungen, Isoprenalingabe und Serotoningabe bei WT (A) und TG Tieren (B). * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, + $p < 0,05$ vs. WT. Die Zahlen in den Säulen entsprechen der Anzahl der Versuchstiere.

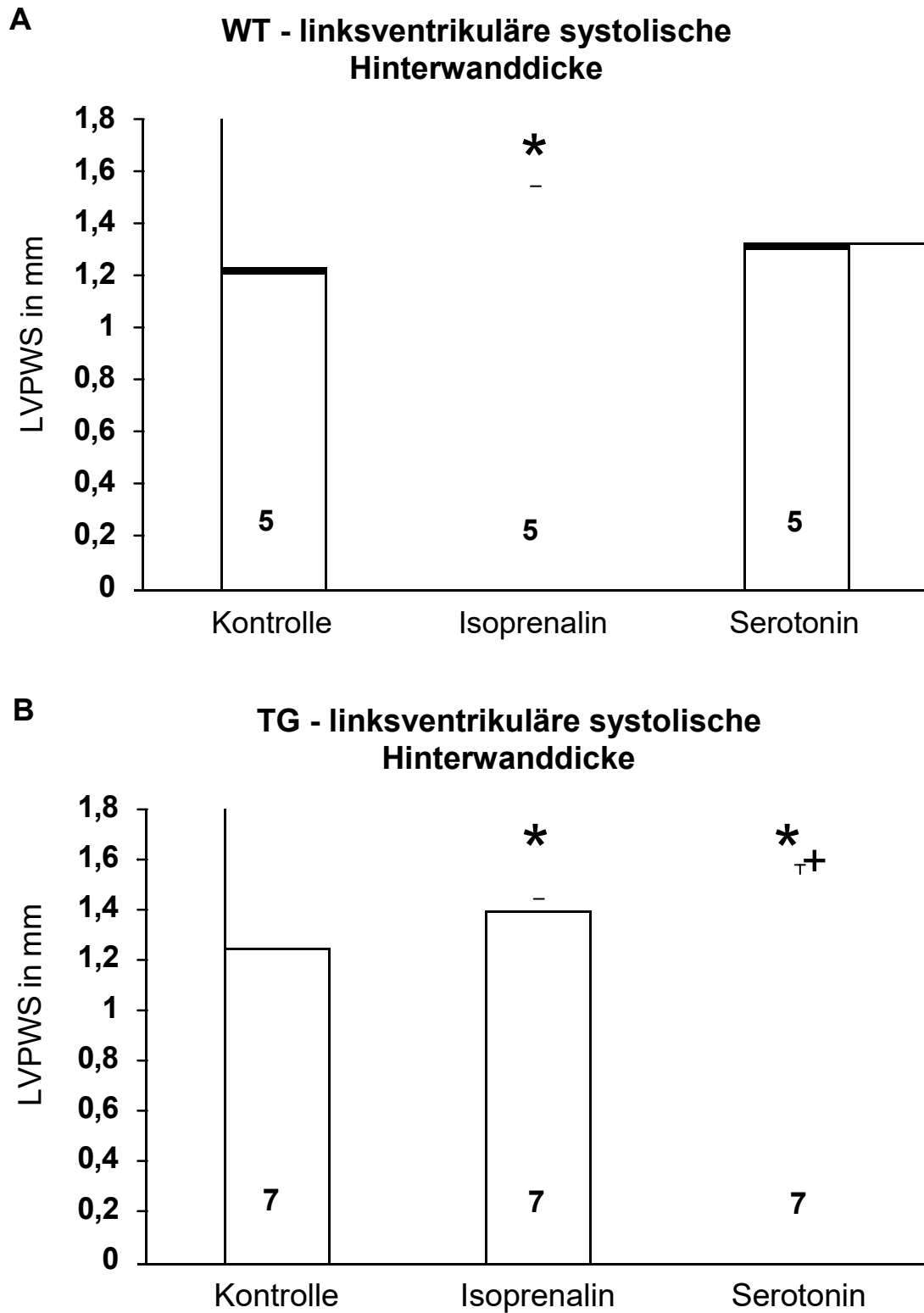


Abb.8. Linksventrikuläre Hinterwanddicke in der Systole (LVPWS, left ventricular posterior wall thickness at systole) in mm unter Kontrollbedingungen, Isoprenalingabe und Serotoningabe bei WT (A) und TG Tieren (B). * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, + $p < 0,05$ vs. WT. Die Zahlen in den Säulen entsprechen der Anzahl der Versuchstiere.

Die Kontrollmessung der linken, hinteren Ventrikelwand in mm während der Systole ergab keinen Unterschied zwischen WT ($1,23 \pm 0,03$) und TG ($1,25 \pm 0,04$), wie in Abb. 8 dargestellt ist. Nach Isoprenalingabe zeigte sich eine deutliche Zunahme der Myokarddicke bei den TG Tieren ($1,39 \pm 0,06$) und WT Tieren ($1,48 \pm 0,07$), ($p < 0,05$; TG; WT; Kontrolle vs. Isoprenalin; siehe Abb.8.). Nach der intraperitonealen Gabe von Serotonin stellte sich eine Veränderung der Wanddicke nur bei TG-Mäusen ($1,54 \pm 0,04$) im Vergleich zum Basalwert ein, nicht jedoch bei den WT-Mäusen ($1,32 \pm 0,03$), ($p < 0,05$; 5HT; WT vs.TG; siehe Abb.8.).



Abb. 9. B-Mode-Echokardiographie einer TG-Maus während der Serotoningabe. Dabei zeigt Bild A den linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser (LVEDD) und Bild B den linksventrikulären endsystolischen Durchmesser LVESD nach intraperitonealer Serotoninapplikation. Siehe dazu 3.3.2. Versuchsdurchführung und Erfassung von Messdaten

4.4. Auswertung „Working heart“

Bei den Untersuchungen mit Hilfe der „working heart“ – Methode wurden jeweils 13 Herzen von WT-Mäusen mit TG-Mäusen *in vitro* verglichen. Dabei zeigte sich zu Beginn der Versuchsdurchführung (basal) eine deutlich höhere Herzfrequenz bei den transgenen Versuchstieren (330 ± 20 bpm) im Vergleich zu den WT-Versuchstieren (272 ± 11 bpm) ($+p < 0,05$ TG vs. WT) (Abb.10.). Dieser Unterschied konnte jedoch nicht *in vivo* während der Echokardiographieversuchsreihe gezeigt werden. Auch kam es unter der GR 125487–Applikation zu keiner Veränderung der basalen Herzfrequenz der transgenen Herzen.

Erwartungsgemäß kam es zu einer Herzfrequenzsteigerung bei den TG–Herzen (385 ± 16 bpm) und WT–Herzen (404 ± 20 bpm) nach Isoprenalingabe ($*p < 0,05$ vs. Kontrolle). Nachdem die positiv chronotrope Wirkung des Isoprenalins ausgewaschen war, konnte im Anschluss die Serotoningabe erfolgen. Dabei zeigte sich eine Herzfrequenzsteigerung ausschließlich bei den transgenen perfundierten Herzen (420 ± 28 bpm) im Vergleich zur Kontrolle ($*p < 0,05$ vs. Kontrolle) und im direkten Vergleich zu den WT Herzen ($+p < 0,05$ vs. WT) (Abb.10.).

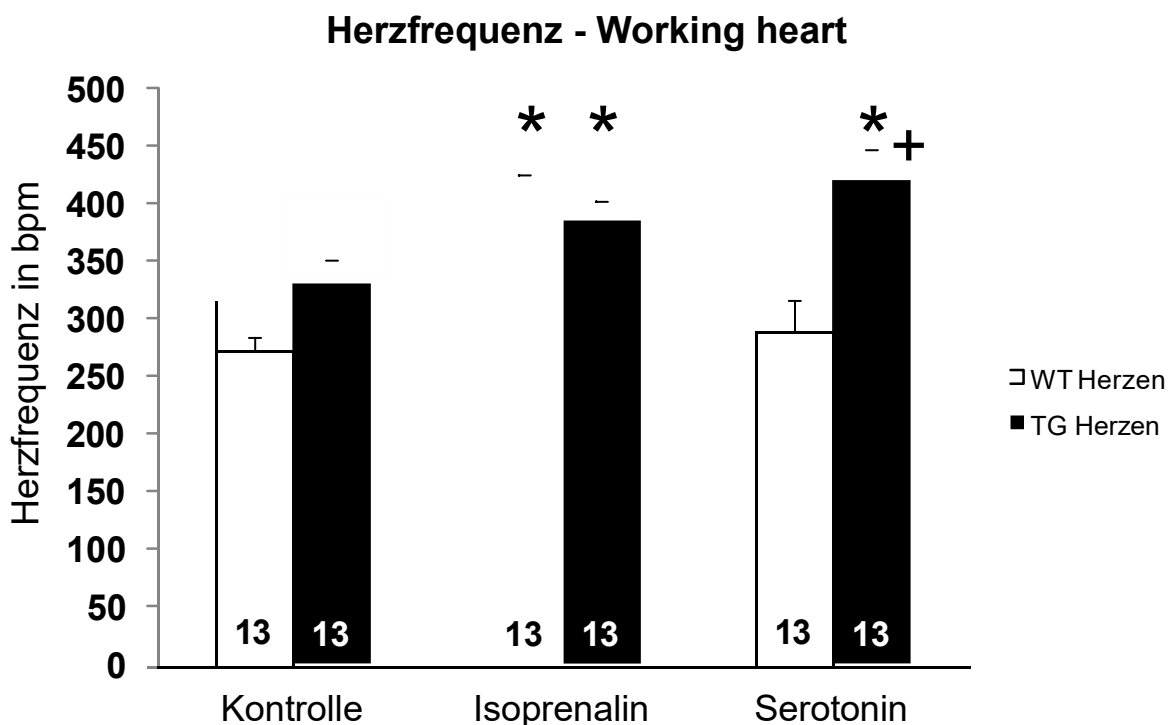


Abb.10. Herzfrequenz der perfundierten TG- und WT-Herzen unter Kontrollbedingungen, Isoprenalingabe und Serotoningabe. $*p < 0,05$ vs. Kontrolle, $+p < 0,05$ vs. WT, Die Zahlen in den Säulen entsprechen der Anzahl der Versuchstiere.

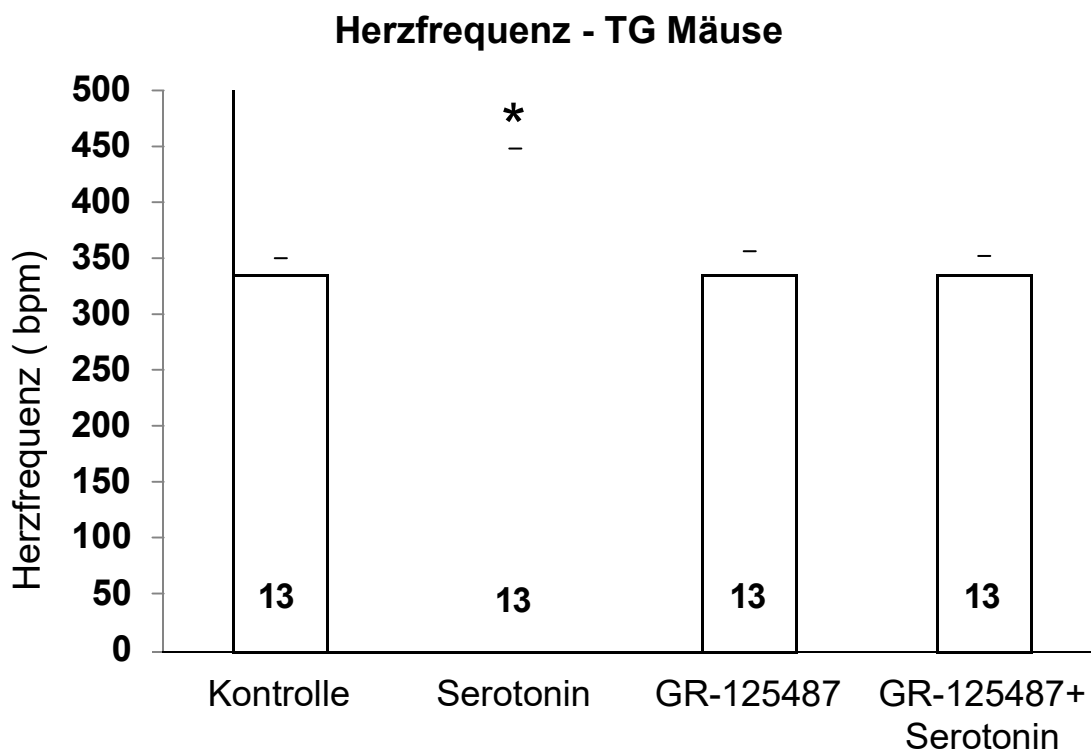


Abb.11. Herzfrequenz der perfundierten transgenen Herzen nach Applikation des 5-HT₄-Rezeptor Antagonisten GR 125487 und Serotoningabe. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, Die Zahlen in den Säulen entsprechen der Anzahl der Versuchstiere.

Zum weiteren Charakterisierung der 5-HT_{4a}-Rezeptoren wurde der 5-HT₄-Rezeptorantagonist GR 125487 (Schiavi et al., 1994) den transgenen Herzen verabreicht. Dabei kam es zu keiner Veränderung der Herzfrequenz bei den transgenen Herzen (335 ± 21 bpm). Auch bei der anschließenden Serotoningabe kam es zu keiner Herzfrequenzsteigerung (333 ± 19 bpm). Es konnte somit nachwiesen werden, dass die serotoninbedingte Frequenzerhöhung wahrscheinlich 5-HT_{4a}-Rezeptor-vermittelt war.

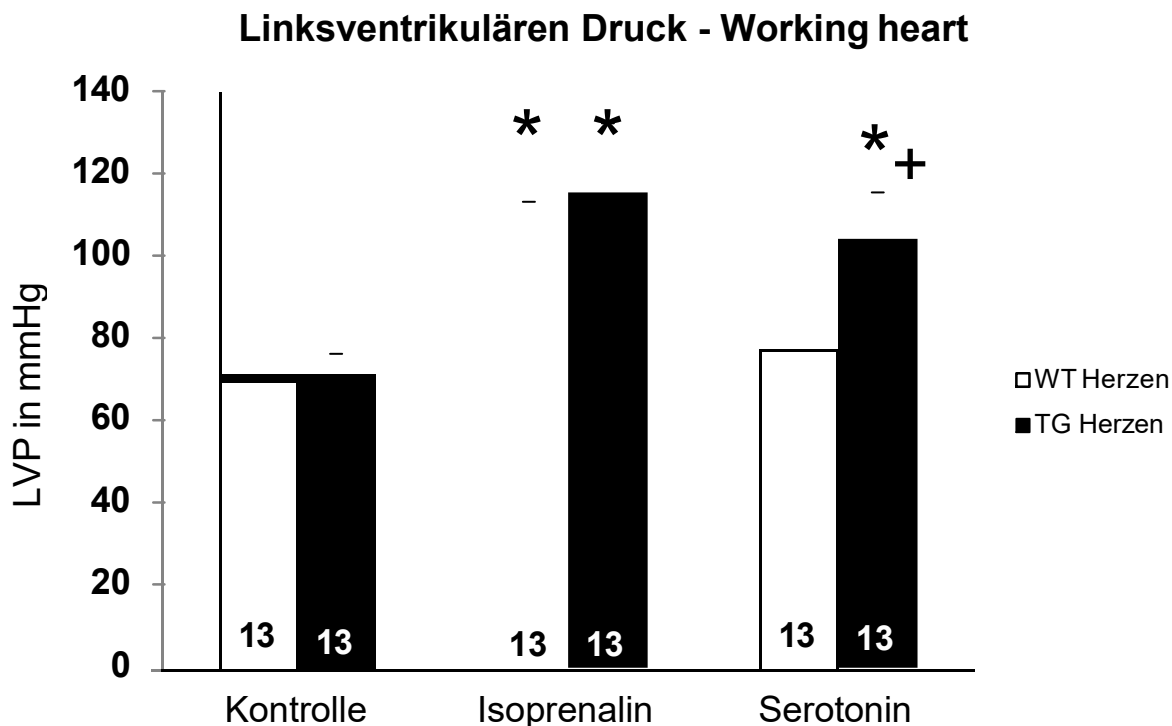


Abb.12. Linksventrikulärer Druck (LVP) der TG- und WT-Herzen unter Kontrollbedingungen, Isoprenalingabe und Serotoningabe. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, + $p < 0,05$ vs. WT, Die Zahlen in den Säulen entsprechen der Anzahl der Versuchstiere.

Unter Basalbedingungen glichen sich die Kontrollwerte des LVP von TG und WT (LVP; WT: $71,3 \pm 2,2$ mmHg; TG: $71,8 \pm 3,9$ mmHg; Abb.12). Nach Isoprenalingabe zeigten beide Versuchsgruppen eine Steigerung des LVP (LVP; WT: $102,5 \pm 10,2$ mmHg; TG: $115,2 \pm 17$ mmHg; Abb.12.).

Der systolische LVP transgener Herzen stieg unter 5-HT-Stimulation auf $103,9 \pm 11,5$ mmHg ($p < 0,05$; TG, 5-HT vs. basal; siehe Abb.12.). Im Vergleich zum Kontrollwert stieg der systolische LVP der TG unter maximaler Stimulation durch Serotonin um 31 %. Im Gegensatz dazu blieb der systolische LVP der WT-Herzen nach Gabe von Serotonin mit einem Anstieg von 7,8% im Vergleich zu den Kontrollbedingungen unverändert ($p < 0,05$; 5-HT, WT vs. TG siehe Abb.12.).

Die anschließende Untersuchung mit dem 5-HT₄-Rezeptorantagonisten GR 125487 zeigte eine vollständige Hemmung des positiv inotropen Effektes von Serotonin im TG-Herzen (siehe Abb.13.).

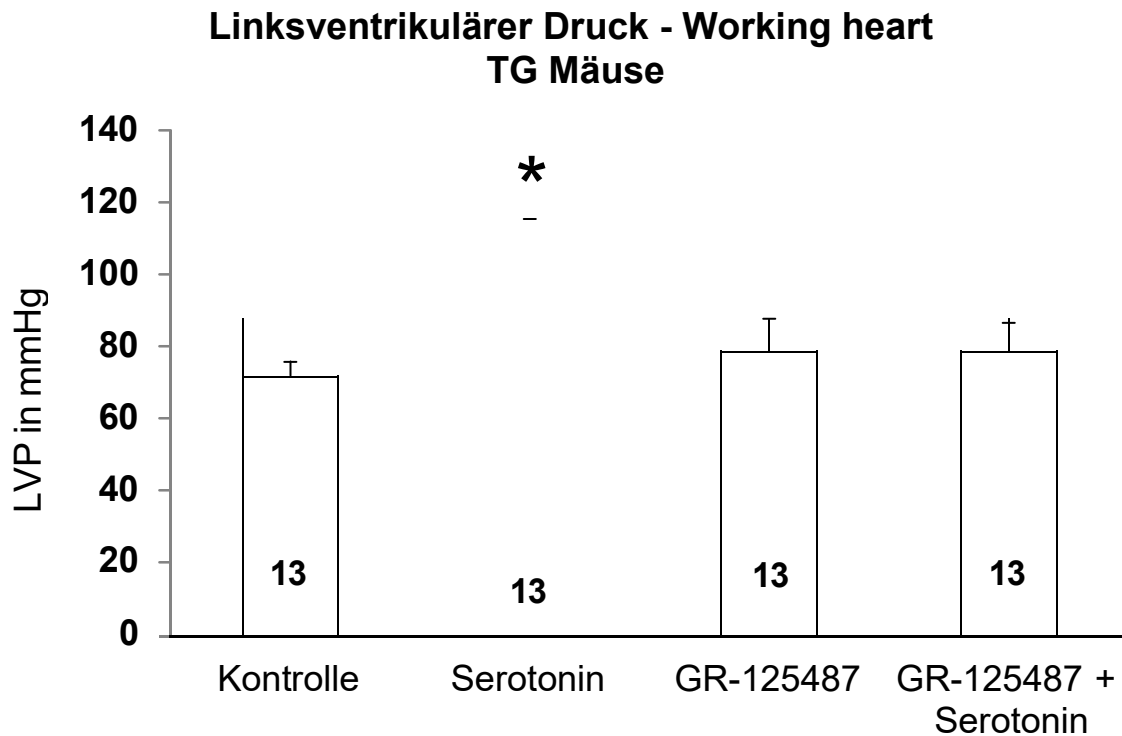


Abb.13. Darstellung des LVD der perfundierten transgenen Herzen unter Kontrollbedingungen, nach Serotoningabe, GR-12547 Gabe und zusätzlicher Serotoningabe. * $p < 0,05$ TG; 5-HT vs. GR 125487 + Serotonin. Die Zahlen in den Säulen entsprechen der Anzahl der Versuchstiere.

Die Parameter dp/dt_{min} und dp/dt_{max} stellen die minimalen bzw. maximalen Werte der 1. Ableitung der Druckkurve dar. Sie beschreiben die maximale Druckabfallgeschwindigkeit bzw. die maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit. Unter Kontrollbedingungen waren sowohl beim Kontraktilitätsparameter (dp/dt_{max}) als auch beim Relaxationsparameter (dp/dt_{min}) keine Unterschiede zwischen WT und TG zu erkennen (dp/dt_{max} ; WT: 2498 ± 173 mmHg/s; TG: 2293 ± 269 mmHg/s; dp/dt_{min} ; WT: -1234 ± 90 mmHg/s; TG: -1346 ± 185 mmHg/s; Abb. 14.). Es kam zu einer Erhöhung der maximalen Druckerhöhung- bzw. Druckabfallgeschwindigkeit beider Versuchstierreihen durch Isoprenalingabe (dp/dt_{max} ; WT: 5679 ± 576 mmHg/s; TG: 6328 ± 1620 mmHg/s; dp/dt_{min} ; WT: -3047 ± 277 mmHg/s; TG: -3607 ± 890 mmHg/s; * $p < 0,05$ Iso vs. Kontrolle Abb.14.).

Nach maximaler Stimulation mit Serotonin änderten sich die maximale Druckerhöhung- bzw. Druckabfallgeschwindigkeit bei WT nicht. Jedoch zeigten die TG-Hezen deutliche Erhöhungen in der Druckerhöhung- bzw. der Druckabfallgeschwindigkeit im Vergleich zu den Kontrollbedingungen und im Vergleich zu den WT-Hezen (Abb.14.). Die

Druckanstiegsgeschwindigkeit dP/dt_{\max} der TG beschleunigte sich unter 5-HT-Einwirkung um 130 % - von 2293 ± 269 mmHg/s auf 5299 ± 1297 mmHg/s. Die maximale Stimulation der TG durch 5-HT führte zugleich zu einer Zunahme der Druckabfallgeschwindigkeit dp/dt_{\min} um 93 % (dP/dt_{\min} Kontrolle: -1346 ± 185 mmHg/s; dP/dt_{\min} 5-HT: -2611 ± 665 mmHg/s; siehe Abb.14.).

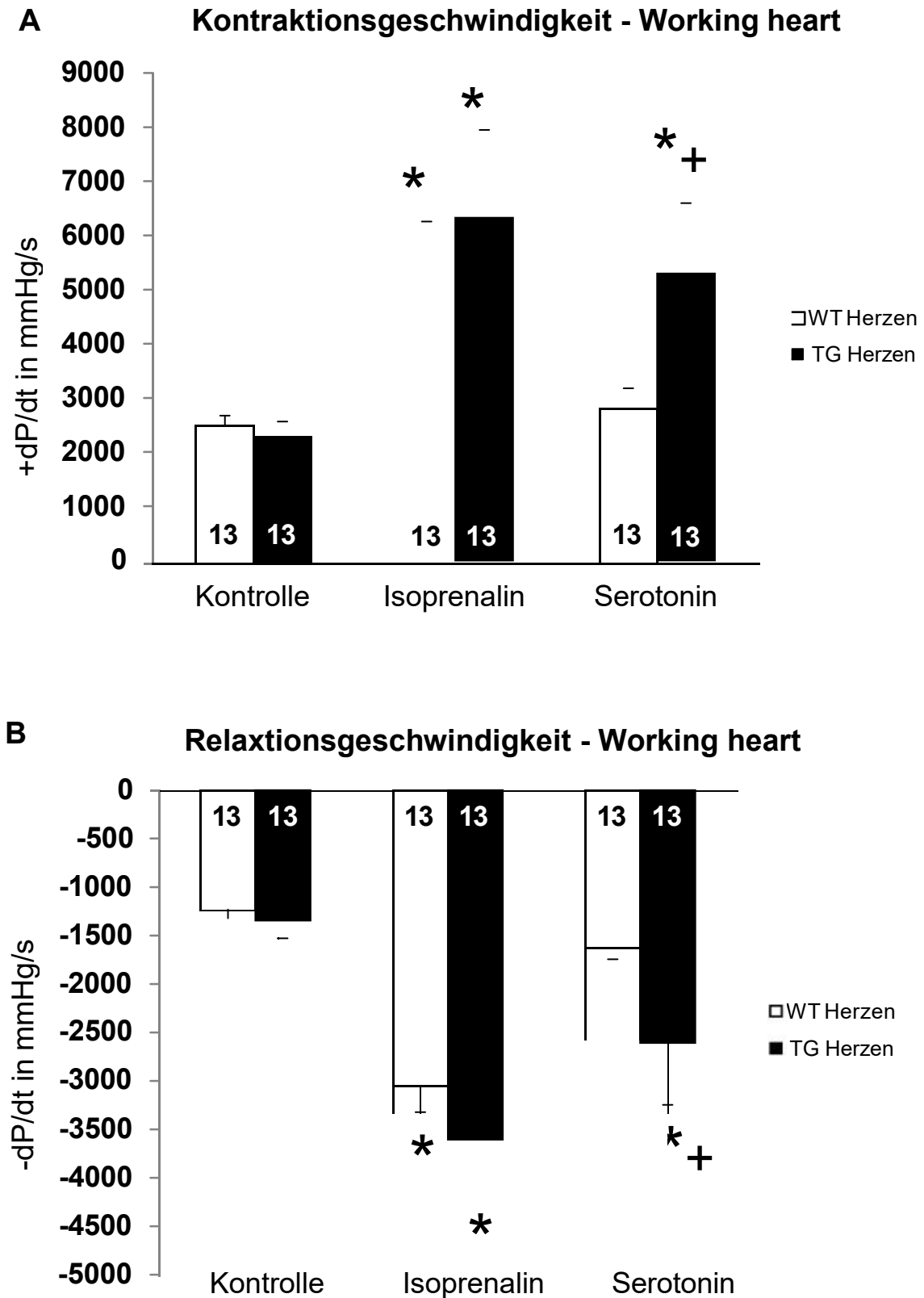


Abb. 14. Darstellung der Kontraktionsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}) (A) und Relaxationsgeschwindigkeit (dP/dt_{min}) (B) unter Kontrollbedingungen, Isoprenalingabe und Serotoningabe. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, + $p < 0,05$ vs. WT, Die Zahlen in den Säulen entsprechen der Anzahl der Versuchstiere.

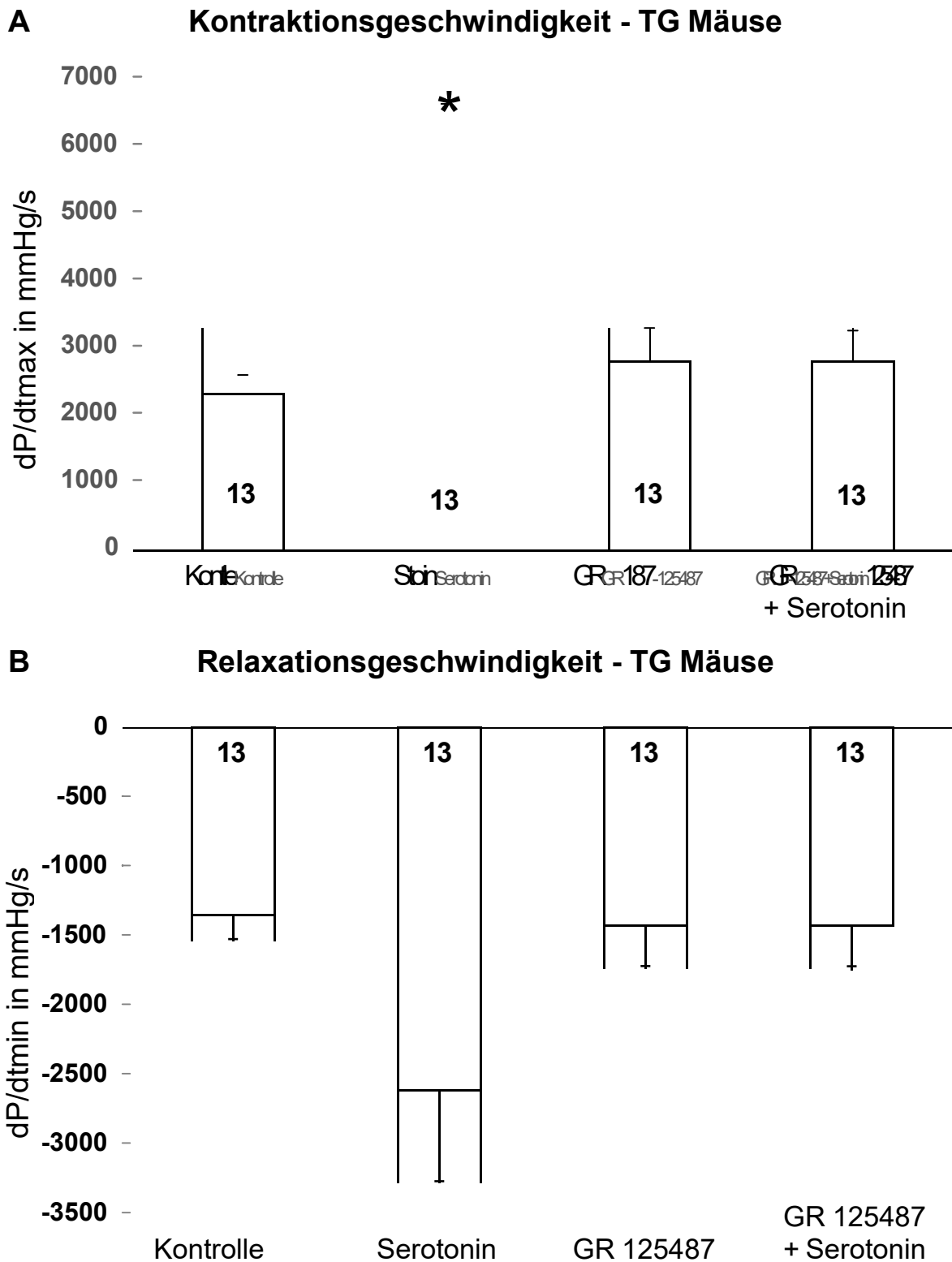


Abb.15. Hemmende Wirkung von GR 125487 auf den Serotonin-bedingten Anstieg von dP/dt_{max} (Abb.14.A) und dP/dt_{min} (Abb.14.B) in TG Herzen. (TG mit 5-HT: 5299 ± 1297 mmHg/s; TG/ GR 125487 + 5HT: 2757 ± 466 mmHg/s; dP/dt_{min} ; TG + 5HT: -2611 ± 665 mmHg/s; TG/ GR 125487 + 5HT: -1429 ± 298 mmHg/s)

Während der Working heart Untersuchungen zeigte sich bei 7 von 13 transgenen Herzen eine ventrikuläre Arrhythmie unter Basalbedingungen bevor das exogene Serotonin appliziert wurden ist ($p < 0,05$) siehe Abb.16.). Diese Herzrhythmusstörungen wurden im linken Ventrikel registriert. Diese Arrhythmie konnte bei den WT-Herzen nicht nachgewiesen werden.

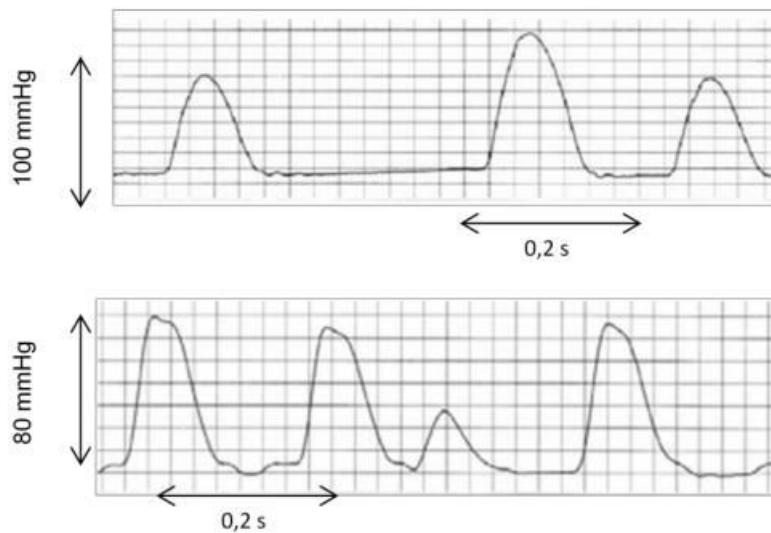


Abb.16. Aufzeichnung des linksventrikulären Druckes bei einem transgenen Herzen unter Basalbedingungen in der working heart Versuchsanordnung. Im oberen Bild zeigt sich nach dem ersten Schlag eine Pause gefolgt von einem größeren Schlag mit Entwicklung eines post-rest Potentials. Das untere Bild zeigt nach normalen Schlägen eine zusätzliche Kontraktion mit kleinerem Potential. Das könnte eine späte Depolarisierung darstellen.

4.5. Western Blot

Der positiv inotrope Effekt von 5-HT in Herzen der 5-HT₄-Rezeptor-Tiere wird wahrscheinlich durch erhöhte cAMP-Spiegel und einer damit verbundenen gesteigerten Aktivität der PKA induziert. Ein entscheidender Mechanismus hierbei stellt die Phosphorylierung des Phospholambans dar, welches als regulierendes Protein der SERCA fungiert. Es wurde geprüft, ob die gesteigerte Inotropie mit einer vermehrten Phosphorylierung des PLB korrelierte.

Mit Hilfe von Western Blot-Versuchen konnte die Expression wichtiger Ca₂₊-regulatorischer Proteine in TG-Mäusen mit der in den WT-Tieren verglichen werden. Wie in Abb.17. dargestellt ist, konnte kein Unterschied der Proteinexpression von PLB, SERCA, CSQ, TRD und JCN gefunden werden. Das Verhältnis der mittleren Expressionsniveaus von TG- zu WT-Tieren waren wie folgt: SERCA, 1,13; CSQ, 1,05; TRD, 1,03; JCN, 0,90; und PLB, 0,94 (n = 3-6). Die Phosphorylierung von PLB an Serin-16 und Threonin-17 wurde durch Isoprenalin in perfundierten Herzen von TG- wie auch von WT-Mäusen verstärkt (siehe Abb.18.A). Dagegen erhöhte 5-HT die PLB-Phosphorylierung ausschließlich in Herzpräparaten von TG-Mäusen, jedoch nicht von WT-Mäusen. Dieser Effekt wurde durch den 5-HT₄-Antagonisten GR 125487 blockiert (siehe Abb.18.B). Bemerkenswert war die höhere basale Threonin-17-Phosphorylierung von PLB in TG-Herzen (siehe Abb.18.B). In Gegenwart des 5-HT₄-Rezeptor-selektiven Antagonisten GR 125487 (1 µM) betrug die 5-HT-induzierte (1 µM) Phosphorylierung von PLB an Serin-16 oder Threonin-17 $109 \pm 13\%$ bzw. $105 \pm 11\%$ des Kontrollwerts in perfundierten Herzen von TG-Mäusen. Daher kann die Wirkung von exogen zugegebenem 5-HT auf die doppelte PLB-Phosphorylierung als 5-HT₄-Rezeptor-vermittelt angesehen werden. Darüber hinaus betrug die Phosphorylierung von PLB an Serin-16 oder Threonin-17 mit GR 125487 (1 µM) alleine $108 \pm 13\%$ oder $107 \pm 12\%$ in perfundierten Herzen von TG-Mäusen. Die cAMP-abhängige PLB-Phosphorylierung an Serin-16 war wie die PLB-Phosphorylierung an Threonin-17 erhöht (siehe Abb.18.B). Dies unterstützt die Vermutung, dass der überexprimierte 5-HT_{4a}-Rezeptor die gleiche Kaskade wie der endogene Rezeptor des menschlichen Herzens nutzt. Im Einklang mit der fehlenden Kontraktionskraftänderung der WT-Herzen unter 5-HT, steigerte sich hier auch der Phosphorylierungszustand von PLB nicht (siehe Abb.18.).

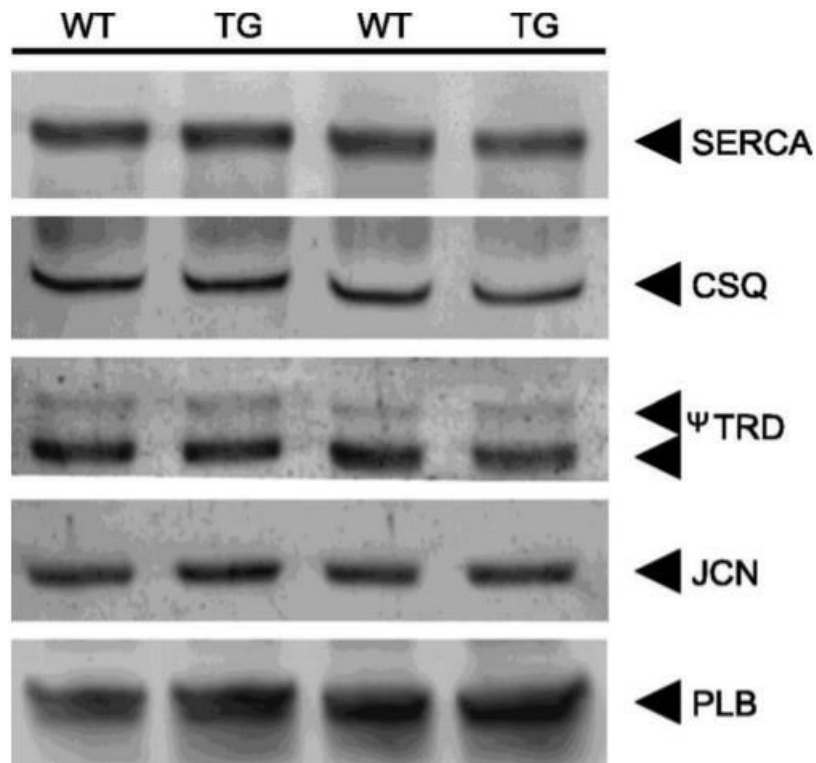


Abb.17. Darstellung der Expression wichtiger Ca^{2+} -regulatorischer Proteine des sarkoplasmatischen Retikulums in TG-Herzen und WT-Herzen. Dabei zeigte sich kein Unterschied in der Expression von SERCA (sarko (endo) plasmatisches Retikulum Ca^{2+} -ATPase), CSQ (Calsequestrin), TRD (Triadin (Ψ glykosylierte Form von TRD)), JCN (Junctin) oder PLB (Phospholamban).

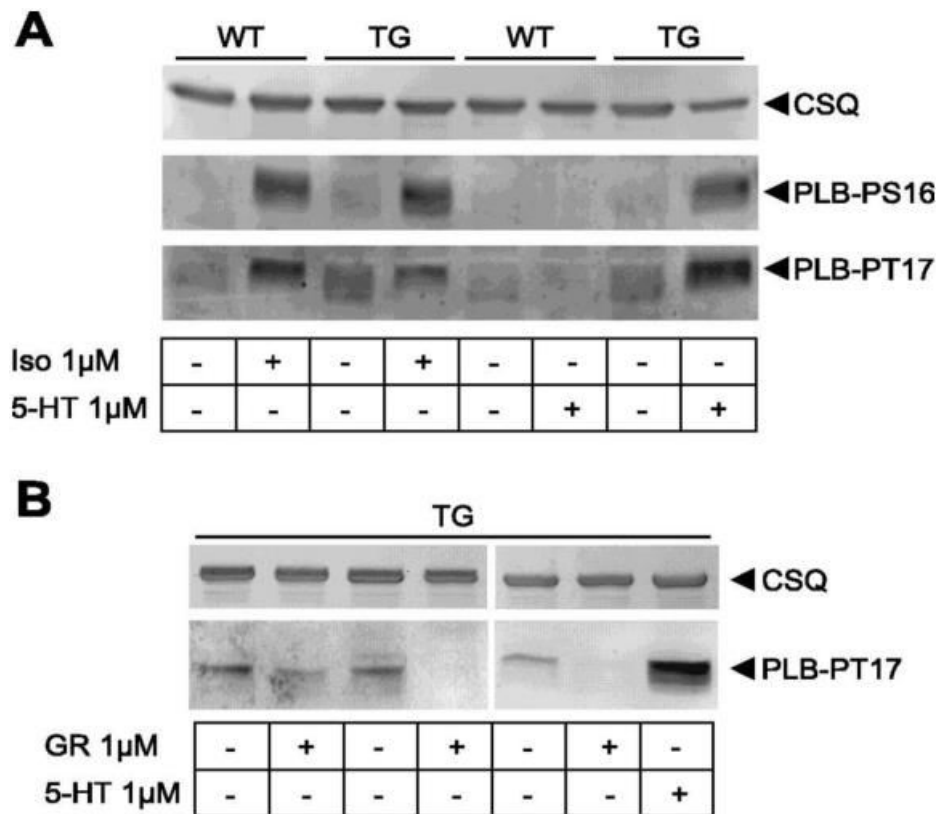


Abb.18. Darstellung der Phospholamban (PLB)-Phosphorylierung in isolierten perfundierten Herzen von WT (A)- und TG-Mäusen (A und B) (Alter: 12-14 Wochen). Die perfundierten Herzen wurden entsprechend den angegebenen Konzentrationen mit Isoprenalin (Iso), Serotonin (5-HT) oder GR 125487 (GR) behandelt bevor sie eingefroren wurden. Im Anschluss erfolgte eine SDS-PAGE- und Western-Blot-Analyse. Die Phosphorylierung von PLB an Serin-16 (PLB-PS16) sowie an Threonin-17 (PLB-PT17) wurde mit Phosphorylierungs-spezifischen Antikörpern analysiert. Die Expression von Calsequestrin (CSQ) diente als Beladungskontrolle.

4.6. HPLC-Auswertung

Um einen Überblick über das Vorhandensein von inotrop und chronotrop wirkenden Substanzen im Mausherz zu gewinnen, wurden die Konzentrationen von Adrenalin und Noradrenalin sowie dem Serotoninvorläufer Tryptophan (TRP) und 5-HT selbst in pg/mg Feuchtgewebe mittels HPLC ermittelt. Hier wurden ausschließlich WT-Mäuse verwendet, da nicht von einem Unterschied zu TG-Mäusen auszugehen ist. 16 h vor Versuchsbeginn wurde einem Teil der Versuchstiere 0,5 mg Reserpin i.p./kg Körpergewicht gespritzt um endogene Katecholaminspeicher (auch Serotoninspeicher) in den Nervenenden im Herzen zu entleeren. Die Messungen erfolgten an mit Tyrode perfundierten, d.h. blutfreien Ventrikelgeweben.

Die Abbildung 19 zeigt beispielhaft die Konzentrationen von Adrenalin und Noradrenalin sowie TRP und 5-HT im Ventrikelgewebe. Durch Reserpinbehandlung konnte der Gehalt an Adrenalin (unterhalb der Nachweisgrenze), Noradrenalin und Serotonin deutlich gesenkt werden, während immer noch eine große Menge an TRP nachweisbar war. Interessanterweise wurde der 5-HT-Gehalt relativ betrachtet weniger vermindert als die Katecholamine.

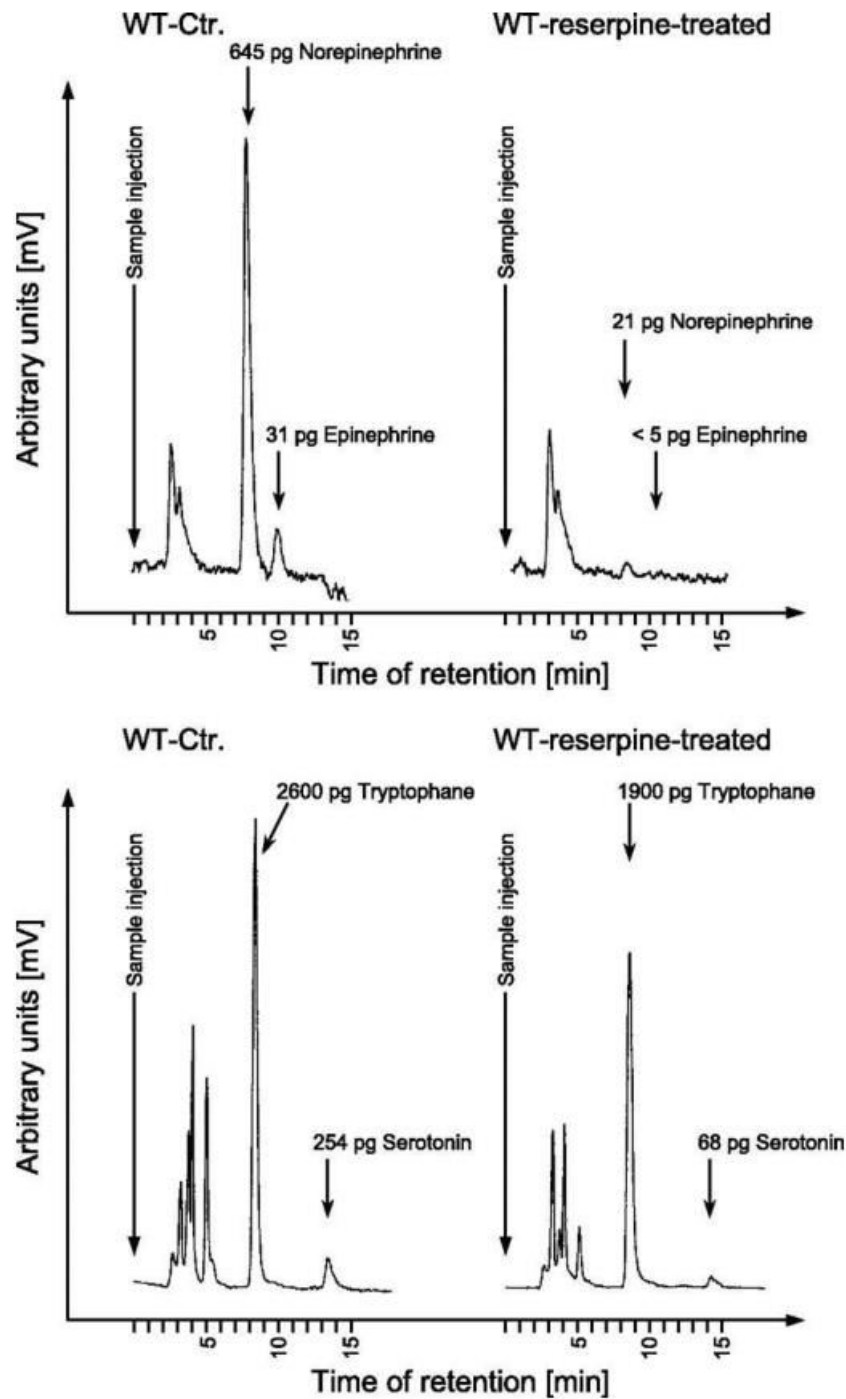


Abb.19. Typische HPLC-Aufzeichnungen. Die Proben wurden aus perfundierten Herzen von WT-Mäusen vergleichend mit und ohne Reserpinbehandlung (Alter der Tiere: 12-14 Wochen) gewonnen und in das HPLC-System injiziert. Die Spannung des Detektors (Ordinaten) war proportional zur Menge des gemessenen organischen Materials. Die Abszissen geben die Retentionszeit an. Die Pfeile zeigen die Mengen in pg der nachgewiesenen Verbindungen an. Das obere Chromatogramm zeigt Noradrenalin und Adrenalin, das untere 5-HT und Tryptophan (seine Vorstufe).

5. Diskussion

5.1. Funktionelle Bedeutung der 5-HT_{4a}-Rezeptoren für das Herz

Das 5-HT_{4a}-transgene Maus-Modell wurde generiert, um die physiologischen und pathophysiologischen Eigenschaften von 5-HT₄-Rezeptoren im Herzen von Säugetieren genauer zu verstehen. Der 5-HT_{4a}-Rezeptor stellt neben dem 5-HT_{4b}-Rezeptor eine der wichtigsten humanen Isoformen mit klinischer Relevanz für die Myokardzelle dar (Bondel et al. 1997). Hinzu kommt, dass dieser als erstes kloniert (Gerald et al. 1995) und zusätzlich gut untersucht worden ist. Aufgrund dieser Tatsachen sollte diese Arbeit Erkenntnisse gewinnen inwiefern der 5-HT_{4a}-Rezeptor durch pharmakologische Substanzen beeinflusst wird. Somit ist das vorgestellte Maus-Modell ideal, um neue pharmakologische Produkte (Agonisten und Antagonisten des 5-HT₄-Rezeptors) an diesem einzusetzen und ihre Wirkungsweisen zu erforschen.

Mit Hilfe einer α -MHC-Expressionskassette wurde die Überexpression des menschlichen 5-HT_{4a}-Rezeptors in Kardiomyozyten von transgenen Mäusen ermöglicht. Die Unterscheidung der Versuchstiere in Wildtypiere und transgene Versuchstiere erfolgte durch eine Genotypisierung mittels PCR.

Zwischen TG- und WT-Mäusen zeigte sich makroskopisch kein Unterschied hinsichtlich der Morphologie oder einer Hypertrophie der Herzmuskulatur. Zusätzlich gab es keinen Unterschied zwischen dem Körpergewicht bzw. dem Herzgewicht (Gergs et al. 2010). Mit Hilfe der immunhistologischen Analyse konnte jedoch mikroskopisch die Überexpression der von 5-HT_{4a}-Rezeptoren in den Herzen von transgenen Tieren visualisiert werden. Histologische Färbungen ergaben keine Anzeichen von Fibrose oder Gewebenekrosen bei den Tieren mit der Überexpression des 5-HT_{4a}-Rezeptors (Gergs et al 2013).

5.2. Der positiv inotrope und lusitrope Effekt in Abhängigkeit von Serotonin am Herzen

Der positiv inotrope Effekt (PIE) und positiv lusitrope Effekt wird durch exogenes 5-HT im Herzvorhof der transgenen Mäuse durch den humanen 5-HT₄-Rezeptor hervorgerufen (Kaumann et al. 1994, Sanders et al. 1995, Brattelid et al. 2004a.). Es schließt sich eine intrazelluläre Signaltransduktion, wie unter 1.3 ausführlich beschrieben, an. Hierbei kommt

es zu einer Gs-gekoppelten cAMP-Erhöhung die eine PKA-Aktivierung herbei führt (Pindon et al. 2002). Die PKA ermöglicht dann u.a. eine Phosphorylierung der spannungsabhängigen L-Typ- Ca_2+ -Kanäle und es kommt zu einem starken Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Zusätzlich findet eine Phosphorylierung des Phospholambans an Serin-16 und Threonin-17 statt. Durch die PLB-Phosphorylierung wird während der Diastole mehr Ca_2+ durch die SERCA in das SR transportiert. Dadurch verkürzt sich die Relaxationszeit und es kann in der folgenden Systole mehr Ca_2+ freigesetzt und damit die Kontraktionskraft gesteigert werden (Gergs et al. 2009). Dieser PIE konnte in vielen verschiedenen Spezies nachgewiesen werden, wie z.B. bei Katzen, Meerschweinchen, Hunden, Schweinen und Ratten (Benfey et al. 1974). In diesem Zusammenhang konnte festgestellt werden, dass bei Ratten der PIE im linken Vorhof auftritt jedoch nicht im Ventrikel (Läer et al. 1998). Serotonin hat eine stimulierende Wirkung auf den L-Typ-Calcium Kanal des Vorhofs (Ouadid et al. 1992) jedoch nicht am Ventrikel (Jahnel et al. 1992, Ouadid et al. 1995) zur Folge. Ähnliche Erkenntnisse vertrat man bis dahin auch am humanen Herzen, bis nachgewiesen wurde, dass bei Patienten mit Herzinsuffizienz doch eine Wirkung von Serotonin am Ventrikel vorlag. Dieser Effekt konnte durch die Gabe von 3-Isobutyl-1-methylxanthin, einem Phosphodiesterase-Inhibitor verstärkt werden (Brattelid et al. 2004a). Bei den Echokardiographieversuchen dieser Dissertation konnte der positiv inotrope Effekt des 5-HT_{4a}-Rezeptors erfolgreich in vivo nachgewiesen werden. Dabei wurde in den Versuchen deutlich gezeigt, dass nur in transgenen Tieren ein Anstieg der Verkürzungsfraction (Pumpfunktion des linken Ventrikels) sowie eine Zunahme der Wanddicke des linken Ventrikels unter Serotoningabe als Zeichen einer Steigerung der Kontraktionskraft des Herzen stattfand. Bei den Wildtyptieren hingegen konnte diese Reaktion ausschließlich bei der Isoprenalinapplikation nachgewiesen werden. Der positiv inotrope und lusitrope Effekt am menschlichen Vorhof ging mit einer Zunahme der Kraftanstiegsgeschwindigkeit und der Erschlaffungsgeschwindigkeit sowie Verkürzung der Anspannungszeit und Erschlaffungszeit ausgelöst durch 5-HT einher (Brattelid et al. 2004a, Kaumann 1991). Dies konnte in der Working heart – Versuchsreihe in Herzen transgener Mäuse anhand des linksventrikulären Druckes, des dP/dt_{max} sowie dP/dt_{min} ebenfalls beobachtet werden. Nach Gabe des spezifischen 5-HT₄-Rezeptor Antagonisten GR 125487 in der Working heart-Versuchsreihe blieb nach erneuter Serotoninapplikation ein positiv inotroper Effekt aus. Somit konnte bei dem von uns verwendeten Mausmodell der PIE von 5-HT nur via spezifischen 5-HT_{4a}-Rezeptor in den transgenen Tieren ausgelöst werden. Mit Hilfe der Western Blot Versuche konnte die Phosphorylierung von PLB an Serin-16 und Threonin-17 in den transgenen Herzen nach Stimulation mit 5-HT nachgewiesen werden. Und wie zu erwarten blieb ein Nachweis in den WT-Tieren aus. Die zusätzliche Verwendung von GR 125487 bestätigte dies, aufgrund fehlender Phosphorylierung von Phospholamban.

5.3. Der positiv chronotrope Effekt von Serotonin am Herzen

Der positiv chronotrope Effekt konnte an isolierten Vorhofpräparaten von Ratten (Docherty et al. 1988), Katzen (Saxena et al. 1985), Meerschweinchen (Walter et al. 1984) und Schweinen (Bom et al. 1998) nachgewiesen werden. Auch am Menschen konnte durch eine intravenöse Injektion von Serotonin ein positiv chronotroper Effekt ausgelöst werden (Hollander et al. 1957, Le Mesurier et al. 1959, Parks et al. 1960). Aber es konnte auch eine Bradykardie durch Serotonin über den Bezold-Jarisch-Reflex ausgelöst werden (Paintal et al. 1973). Zurzeit wird davon ausgegangen, dass 5-HT über den 5-HT₄-Rezeptor das G_s-Protein aktiviert, welches im Anschluss die Adenylylcyclase zur Produktion vom cAMP anregt. Dadurch wird der durch Hyperpolarisation aktivierte und durch zyklische Nukleotide regulierte Kationenkanal (HCN, I_f-funny) im Sinusknoten angeregt, was zu einer beschleunigten Depolarisation des Membranpotentials führt und dann letztlich in einer erhöhten Herzfrequenz mündet (De Maeyer et al. 2006).

Diese Erkenntnisse ließen sich in der Echokardiographie bestätigen. Durch Serotoninapplikation konnte ein Anstieg der Herzfrequenz bei den transgenen Tieren ausgelöst werden. Dieser Effekt blieb jedoch bei den WT-Tieren aus. Zusätzlich kam es auch zu einer Herzfrequenzsteigerung in den Working heart-Analysen der transgenen Tiere nach Serotoningabe. Mit Hilfe eines 5-HT₄-Rezeptorantagonisten (GR 125487) konnte der positive chronotrope Effekt von Serotonin unterdrückt werden, so dass von einer 5-HT_{4a}-Rezeptor-gekoppelten Kaskade ausgegangen werden kann.

Die niedrigere Herzfrequenz der in vivo (Echokardiographieversuche) TG-Versuchstiere in Bezug auf die Frequenz isolierter Herzen in vitro (working heart) kann von uns bis jetzt nicht ausreichend geklärt werden. Dabei ist zu beachten, dass Isofluran als Anästhetikum u.a. eher die unerwünschte Wirkung hat Tachykardien auszulösen (Striebel et al. 2017). Die Unterschiede zwischen working heart- und Echokardiographie-Versuchen könnten allerdings auch durch die fehlende Gegenregulation des Gesamtorganismus in vitro zustande kommen.

5.4. Serotonin bedingte Arrhythmien

In den Working heart-Versuchen zeigten sich auffällig häufig Herzrhythmusstörungen bei den transgenen Herzen unter basalen Bedingungen, d.h. ohne eine Serotoninapplikation (Gergs et al. 2010). Das Serotonin nicht nur inotrop und lusitrop an den Kardiomyozyten wirkt (Kaumann et al. 1990; Sanders und Kaumann 1992; Brattelid et al. 2004a), sondern zusätzlich Arrhythmien an Vorhoftrabekeln (Kaumann und Sanders 1994) und

Kardiomyozyten (Sanders et al. 1995) sowie an ventrikulären Trabekeln (Brattlid et al 2004) auslösen kann, ist seit längerem bekannt. Unter Verwendung des Prokinetikums Cisaprid, ein Agonist am 5-HT₄-Rezeptor, ist die Verlängerung des QT-Intervalls im EKG bis hin zu ventrikulären Arrhythmien, inklusive der gefürchteten Torsade de pointes Ereignisse beschrieben worden (Meyer R. 2000). Katecholamine und Serotonin führen zu Arrhythmien an atrialen Trabekeln durch eine diastolische Ca₂₊-Freisetzung in den humanen Kardiomyozyten bei vorliegendem Sinusrhythmus (Christ et al 2013). Schon 1957 konnten Hollander et al. zeigen, dass Serotonin Tachykardien auslösen kann und es wurden nach Serotonin-Infusionen am Menschen Arrhythmien registriert. Experimentell wurde nachgewiesen, dass sich bei der Anwendung von Serotonin eine gesteigerter Offenwahrscheinlichkeit des L-Typ-Calciumkanals und arrhythmische Aktivität an humanen Myozyten des Vorhofs entwickelte (Pau et al. 2003). Es wird außerdem angenommen, dass es durch Aktivierung des I_r-Stroms (= Schrittmacherkanal) zu Vorhofflimmern kommen kann (Pino et al. 1998) und aufgrund einer Serotonin-induzierten Zunahme des zytosolischen Kaliumstromes supraventrikuläre Arrhythmien ausgelöst werden (Rahme et al. 1999). Bemerkenswert ist noch die erhöhte Inzidenz von supraventrikulären Arrhythmien bei Patienten mit β -Blocker Einnahme. Hierbei wird von einer späten Nachdepolarisation ausgegangen (Sanders et al. 1995). Diese entsteht durch eine gesteigerte Phosphorylierung von Phospholamban und der daraus resultierenden gesteigerten Ca₂₊-Konzentration im sarkoplasmatischen Retikulum der Myokardzelle. Der erhöhte Ca₂₊-Gradient kann nun Arrhythmien hervorrufen. Diese gesteigerte Phosphorylierung von PLB konnten wir im Western blot bei den transgenen Tieren nach Serotoningabe durch den Nachweis von phosphoryliertem Serin-16 und Threonin-17-PLB erbringen.

Keine dieser Hypothesen ist bis heute endgültig geklärt und es bleibt weiterhin die Frage offen, ob Serotonin primär die Arrhythmien hervorrufft oder ob durch freigesetztes Serotonin aus geschädigten Thrombozyten die Arrhythmien aufrecht erhalten werden (Yusuf et al. 2003). Zumindest bei Schweinen konnten mit Serotonin keine Arrhythmien ausgelöst werden, da wahrscheinlich die Rezeptordichte zu niedrig war (Parker et al. 1995). Somit erscheint das vorliegende 5-HT₄-überexprimierende Maus-Modell eine gute Möglichkeit, um weitere Untersuchungen zum Mechanismus von Serotonin-verursachten Arrhythmien durchzuführen.

5.5. Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen Serotonin-Rezeptoren und β – Adrenozeptoren

Biochemisch und funktionell haben die 5-HT_{4a}-Rezeptoren und β_1 - sowie β_2 -Rezeptoren viele Gemeinsamkeiten, bedingt durch ihre ähnliche evolutionäre Entwicklung. Beide Rezeptorarten bestehen aus sieben Transmembran-Domänen und verwenden das G_s-Protein zur Entwicklung einer Signalkaskade. In Bezug auf die Kardiomyozyten bewirkt die Aktivierung der beiden Rezeptor-Gruppen einen zytosolischen cAMP-Anstieg, der die Proteinkinase A und im Anschluss u.a. den L-Typ-Calcium-Kanal aktiviert. Zusätzlich bewirken beide Rezeptoren eine Phosphorylierung von Phospholamban an Serin-16 und Threonin-17, die im Western Blot an den transgenen Versuchstieren nach Isoprenalingabe sowie Serotoningabe nachgewiesen wurden. Sie wirken somit beide positiv chronotrop, dromotrop, inotrop und lusitrop am Vorhof der transgenen Maus. Im Gegensatz zu den 5-HT₄-Rezeptor-überexprimierenden Versuchstieren zeigten die β -Rezeptor-überexprimierenden Mäuse eine histologisch gesicherte Fibrose, Herzmuskelhypertrophie sowie auffällig häufig Herzfehler und eine verkürzte Lebenszeit (Engelhardt et al. 1999, 2001). Die Frage warum es zu diesen deutlichen pathologischen Veränderung nur bei den β -Rezeptor-Versuchstieren kommt, obwohl beide Rezeptoren die gleiche Signaltransduktion über cAMP nutzen, ist weiterhin nicht hinreichend geklärt. Jedoch ist es möglich, dass die 5-HT₄-transgenen Versuchstiere über G $\beta\gamma$ -Proteine direkt an L-Typ Ca₂₊-Kanäle und andere Ionen-Kanäle koppeln (Cardenas et al., 1997; Bickmeyer et al., 2002; Pindon et al., 2002) und so deren Öffnungswahrscheinlichkeit erhöhen. Hinzu kommt eine deutlich geringere 5-HT_{4a}-Rezeptordichte im Vergleich zur β -Rezeptordichte im menschlichen Herzen (Kaumann et al. 1996) sowie zu einer 100mal kleineren serotoninabhängigen Signalübertragung durch cAMP/PKA aufgrund eines wesentlich niedrigeren Serumspiegels von 5-HT im Vergleich zu dem von Adrenalin (Christ et al. 2014).

5.6. Pathologische Herzmechanismen und ihre Verbindung zum 5-HT_{4a}-Rezeptor

Bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz konnte ein erhöhter Serotoninspiegel im Plasma nachgewiesen werden (Nigmatullina et al. 2009, Selim et al. 2016). In der Untersuchung von Nigmatullina zeigte sich, dass es durch die Steigerung der 5-HT-Plasma-Konzentration zu einer Verstärkung des positiv inotropen und positiv chronotropen Effekts kam, was zusammen eine Erhöhung des Herzzeitvolumens hervorrufen konnte. Weitere Untersuchungen zeigten eine erhöhte Expression von 5-HT_{4a}-Rezeptor-mRNA und eine

gesteigerte positive Inotropie bei einer Herzinsuffizienz des Menschen (Brattelid et al. 2004b, Bondel et al. 1997). Bemerkenswert war der zunehmende positiv inotrope Effekt durch 5-HT bei steigender NYHA-Klasse im Vergleich zum β -adrenergen Rezeptor, bei dem eine Abnahme des positiv inotropen Effektes zu sehen war (Brattelid et al. 2004).

Seit längerem ist bekannt, dass β -Blocker eine Mortalität-senkende Wirkung haben und somit einen hohen Stellenwert bei der Therapie der Herzinsuffizienz haben (Cohn, 1999). Da Serotonin auf ähnliche Weise wirkt, wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch einen 5-HT₄-Rezeptorantagonisten die Herzinsuffizienz therapiert werden könnte. In Tierexperimenten mit Ratten (Birkeland et al. 2007) und bei Menschen konnte nach Gabe eines Antagonisten die Symptomatik der Herzinsuffizienz durch Steigerung der Ejektionsfraktion verbessert werden (Kjekshus et al. 2009).

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

6. Zusammenfassung

Die vorgestellte Dissertation dient der Charakterisierung eines neuen transgenen Mausmodells. Dazu wurde der humane 5-HT_{4a}-Rezeptor in Mäusen, unter Kontrolle der α -Isoform der schweren Kette des Myosins, herzspezifisch überexprimiert. Diese Überexpression führte zu keiner Veränderung der Lebenserwartung, der Herzgröße und der Herzleistung (Gergs et al., 2010). Die Echokardiografie- und Working heart-Untersuchungen wurden im Vergleich mit transgenen Tieren (TG) und Wildtyptieren (WT) durchgeführt. Hierbei zeigte sich während der Echokardiografie kein Unterschied der basalen Herzfrequenz zwischen beiden Genotypen. Anschließend konnte bei beiden Gruppen ein Anstieg der Herzfrequenz durch Isoprenalin ausgelöst werden. Jedoch nach Applikation von Serotonin war ein positiv chronotroper Effekt nur an den transgenen Tieren *in vivo* erkennbar. Auch kam es ausschließlich bei den transgenen Mäusen nach Serotoningabe zu einer Steigerung der Verkürzungsfraktion (FS) (positiv inotroper Effekt).

Die kardialen Einflüsse von 5-HT auf die Tiere wurden *in vitro* mittels Working heart untersucht. Dabei wurden Herzfrequenz, systolischer linksventrikulärer Druck, sowie dp/dt_{min} (Druckabfallgeschwindigkeit) und dp/dt_{max} (Druckanstiegsgeschwindigkeit) gemessen. Die Herzen der TG-Mäuse zeigten unter basalen Bedingungen eine erhöhte Herzfrequenz im Vergleich zu den Herzen der WT Mäuse ($p < 0,05$). Dies konnte in der Echokardiographie nicht bestätigt werden. Ein Serotonin-vermittelter Anstieg der Herzfrequenz sowie der Kontraktionskraft der TG -Herzen im Vergleich zu den -WT-Herzen ließ die erfolgreiche Überexpression des 5-HT_{4a}-Rezeptors vermuten. Bestätigt wurde dies auch die Hemmung der Effekte von 5-HT mit dem spezifischen 5-HT₄-Rezeptor-Antagonisten GR 125487.

Die vorgestellten Daten haben eindeutig die erfolgreiche Herstellung eines Tiermodells für die Untersuchung 5-HT₄-Rezeptor-vermittelter Effekte am Säugerherzen gezeigt. Dieses Tiermodell kann nun sowohl für die grundsätzliche Untersuchung der Funktion von 5-HT₄-Rezeptoren im Herzen genutzt werden, als auch für die Untersuchung kardialer Effekte von Pharmaka, die über 5-HT₄-Rezeptoren wirken.

7. Literaturverzeichnis

Bard, J. A.; Zgombick, J.; Adham, N.; Vaysse, P.; Branchek, T. A.; Weinschank, R. L. (1993): Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT₇) positively linked to adenylate cyclase. In: *The Journal of biological chemistry* 268 (31), S. 23422–23426.

Barnes, N. M.; Sharp, T. (1999): A review of central 5-HT receptors and their function. In: *Neuropharmacology* 38 (8), S. 1083–1152.

Benfey, B. G.; Cohen, J.; Kunos, G.; Vermes-Kunos, I. (1974): Dissociation of 5-hydroxytryptamine effects on myocardial contractility and cyclic AMP accumulation. In: *British journal of pharmacology* 50 (4), S. 581–585.

Bers, D.M. (2002). Cardiac excitation-contraction Coupling. *Nature* 415, 198-205.

Bickmeyer, Ulf; Heine, Martin; Manzke, Till; Richter, Diethelm W. (2002): Differential modulation of I(h) by 5-HT receptors in mouse CA1 hippocampal neurons. In: *The European journal of neuroscience* 16 (2), S. 209–218.

Birkeland JA, Sjaastad I, Brattelid T, Qvigstad E, Moberg ER, Krobert KA, et al. (2007a): Effects of treatment with a 5-HT₄ receptor antagonist in heart failure. *Br J Pharmacol.* 150:143–152

Blondel O., Gastineau M., Dachmoune Y. Langlois M., Fischmeister R., *J. Neurochem.*, 1998, 70, 2252 – 2261.

Blondel, O.; Vandecasteele, G.; Gastineau, M.; Leclerc, S.; Dahmoune, Y.; Langlois, M.; Fischmeister, R. (1997): Molecular and functional characterization of a 5-HT₄ receptor cloned from human atrium. In: *FEBS letters* 412 (3), S. 465–474.

Bom AH, Duncker DJ, Saxena PR, Verdouw PD. 5-Hydroxytryptamine-induced tachycardiam in the pig: Possible involvement of a new type of 5-hydroxytryptamine receptor. *British Journal of Pharmacology*. 1998;93:663-671 (1998).

Brattelid, Trond; Kvingedal, Ane M.; Krobert, Kurt A.; Andressen, Kjetil W.; Bach, Trond; Hystad, Marit E. et al. (2004a): Cloning, pharmacological characterisation and tissue distribution of a novel 5-HT₄ receptor splice variant, 5-HT₄(i). In: *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 369 (6), S. 616–628.

Brattelid ,T, Qvigstad E, Lynham JA, Molenaar P, Aass H, Geiran O, Skomedal T; Osnes JB, Levy FO, Kaumann AJ (2004b) Functional serotonin 5-HT₄receptors in porcine and human ventricular myocardium with increased 5-HT₄mRNA in heart failure. In: *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 370 S. 157-166.

Cala, S. E.; Scott, B. T.; Jones, L. R. (1990): Intralumenal sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-binding proteins. In: *Seminars in cell biology* 1 (4), S. 265–275.

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

Christ, Torsten; Rozmaritsa, Nadiia; Engel, Andreas; Berk, Emanuel; Knaut, Michael; Metzner, Katharina et al. (2014): Arrhythmias, elicited by catecholamines and serotonin, vanish in human chronic atrial fibrillation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (30), S. 11193–11198.

Claeyssen, S.; Faye, P.; Sebben, M.; Lemaire, S.; Bockaert, J.; Dumuis, A. (1997): Cloning and expression of human 5-HT₄S receptors. Effect of receptor density on their coupling to adenylyl cyclase. In: *Neuroreport* 8 (15), S. 3189–3196.

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

Creighton, Thomas E. (Hg.) (1989): Protein structure. A practical approach. 1. publ. Oxford u.a.: IRL-Pr (The practical approach series).

Crowell, Michael D. (2004): Role of serotonin in the pathophysiology of the irritable bowel syndrome. In: *British journal of pharmacology* 141 (8), S. 1285–1293.

Daul A, Elter-Schulz M, Poller U, Jockenhovel F, Pönicke K, Boomsma F, Man in't Veld AJ, Schäfers RF, Brodde OE (1995) Dose-dependent separation of dopaminergic and adrenergic effects of epinine in healthy volunteers. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 352:429-437.

De Maeyer JH, Straetemans R, Schuurkes JA, Lefebvre RA. (2006): Porcine left atrial and sinoatrial 5-HT(4) receptor-induced responses: Fading of the response and influence of development. *British Journal of Pharmacology*. 2006;147:140-157.

Docherty, J. R. (1988): Investigations of cardiovascular 5-hydroxytryptamine receptor subtypes in the rat. In: *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 337 (1), S. 1–8.

Dumuis, A.; Sebben, M.; Bockaert, J. (1989): The gastrointestinal prokinetic benzamide derivatives are agonists at the non-classical 5-HT receptor (5-HT₄) positively coupled to adenylate cyclase in neurons. In: *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 340 (4), S. 403–410.

Ebelt, Henning; Jungblut, Mirco; Zhang, Ying; Kubin, Thomas; Kostin, Sawa; Technau, Antje et al. (2007): Cellular cardiomyoplasty: improvement of left ventricular function correlates with the release of cardioactive cytokines. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25 (1), S. 236–244.

Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F, Lohse MJ (1999) Progressive hypertrophy and heart failure in b1-adrenic receptor transgenic mice. *Pharmacol* 99:7059-7064.

Engelhardt, S.; Grimmer, Y.; Fan, G. H.; Lohse, M. J. (2001): Constitutive activity of the human beta(1)-adrenergic receptor in beta(1)-receptor transgenic mice. In: *Molecular pharmacology* 60 (4), S. 712–717.

Fabiato, A.; Fabiato, F. (1975): Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. In: *The Journal of physiology* 249 (3), S. 469–495.

Frank, Konrad F.; Bölck, Birgit; Erdmann, Erland; Schwinger, Robert H. G. (2003): Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase modulates cardiac contraction and relaxation. In: *Cardiovascular research* 57 (1), S. 20–27.

Gauthier, N. S.; Matherne, G. P.; Morrison, R. R.; Headrick, J. P. (1998): Determination of function in the isolated working mouse heart: issues in experimental design. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 30 (3), S. 453–461.

Gerald, C.; Adham, N.; Kao, H. T.; Olsen, M. A.; Laz, T. M.; Schechter, L. E. et al. (1995): The 5-HT₄ receptor: molecular cloning and pharmacological characterization of two splice variants. In: *The EMBO journal* 14 (12), S. 2806–2815.

Gergs U, Böckler A, Ebelt H, Hauptmann S, Keller N, Otto V, Pönicke K, Schmitz W, Neumann J. (2013): Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 2013 May;386(5):357-67.

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

Gergs, Ulrich; Baumann, Martin; Böckler, Anne; Buchwalow, Igor B.; Ebelt, Henning; Fabritz, Larissa et al. (2010): Cardiac overexpression of the human 5-HT₄ receptor in mice. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 299 (3), H788-98.

Gergs, Ulrich; Boknik, Peter; Buchwalow, Igor; Fabritz, Larissa; Matus, Marek; Justus, Isabel et al. (2004): Overexpression of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A impairs cardiac function. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (39), S. 40827–40834.

Grupp, I. L.; Lorenz, J. N.; Walsh, R. A.; Boivin, G. P.; Rindt, H. (1998): Overexpression of alpha1B-adrenergic receptor induces left ventricular dysfunction in the absence of hypertrophy. In: *The American journal of physiology* 275 (4 Pt 2), H1338-50.

Hollander, W., Michelson, A. L., & Wilkins, R. W. (1957). Serotonin and antiserotonins: I. Their circulatory, respiratory and renal effects in man. *Circulation* 16, 246–255

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

Hoyer, Daniel; Hannon, Jason P.; Martin, Graeme R. (2002): Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. In: *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 71 (4), S. 533–554.

Jahnel, Ulrich; Rupp, Johanna; Ertl, Rudolf; Nawrath, Hermann (1992): Positive inotropic response to 5-HT in human atrial but not in ventricular heart muscle. In: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 346 (5).

Kass DA, Hare JM, Georgakopoulos D. Murine cardiac function: a cautionary tail. *Circulation Research*. 1998; 82:519–522.

Kaumann, A. J. (1994): Do human atrial 5-HT₄ receptors mediate arrhythmias? In: *Trends in pharmacological sciences* 15 (12), S. 451–455.

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

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

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

Kelley SP, Dunlop JI, Kirkness EF, Lambert JJ, Peters JA. (2003) A cytoplasmic region determines single-channel conductance in 5-HT₃ receptors. *Nature*; 424:321–324.

Kjekshus JK, Torp-Pedersen C, Gullestad L, Køber L, Edvardsen T, Olsen IC, Sjaastad I, Qvigstad E, Skomedal T, Osnes JB, Levy FO. (2009): Effect of piboserod, a 5-HT₄ serotonin receptor antagonist, on left ventricular function in patients with symptomatic heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2009 Aug;11(8):771-8.

Kubalova Z, Gyorke I, Terentyeva R, Viatchenko-Karpinski S, Terentyev D, Williams SC, Gyorke S. (2004): Modulation of cytosolic and intra-SR calcium waves by calsequestrin in cardiac myocytes. *J Physiol*. 2004;561:515–524.

Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685.

Läer, S.; Remmers, F.; Scholz, H.; Stein, B.; Müller, F. U.; Neumann, J. (1998): Receptor mechanisms involved in the 5-HT-induced inotropic action in the rat isolated atrium. In: *British journal of pharmacology* 123 (6), S. 1182–1188.

Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, Picard MH, Roman MJ, Seward J, Shanewise JS, Solomon SD, Spencer KT, Sutton MS, Stewart WJ; Chamber Quantification Writing Group; American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee; European Association of Echocardiography (2005) Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of

Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr* 18(12):1440-1463.

Langlois, M., & Fischmeister, R. (2003). 5-HT₄ receptor ligands: application and new prospects. *J Med Chem* 46, 319–344

Le Messurier, D. H.; Schwartz, C. J.; Whelan, R. F. (1959): Cardiovascular effects of intravenous infusions of 5-hydroxytryptamine in man. In: *British journal of pharmacology and chemotherapy* 14 (2), S. 246–250.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. In: *The Journal of biological chemistry* 193 (1), S. 265–275.

Meyer, Rüdiger Arzneimittelsicherheit - USA: Cisaprid wird zurückgezogen. *Dtsch Arztebl* 2000; 97(16): A-1028 / B-876 / C-796.

Monsma, F. J.; Shen, Y.; Ward, R. P.; Hamblin, M. W.; Sibley, D. R. (1993): Cloning and expression of a novel serotonin receptor with high affinity for tricyclic psychotropic drugs. In: *Molecular pharmacology* 43 (3), S. 320–327.

Mylecharane, E. J. (1990): Agonists and antagonists of 5-HT₂ receptors. In: P. R. Saxena, D. I. Wallis, W. Wouters und P. Bevan (Hg.): *Cardiovascular Pharmacology of 5-Hydroxytryptamine*. Dordrecht: Springer Netherlands, S. 81–100.

Neef, Stefan; Dybkova, Nataliya; Sossalla, Samuel; Ort, Katharina R.; Fluschnik, Nina; Neumann, Kay et al. (2010): CaMKII-dependent diastolic SR Ca²⁺ leak and elevated diastolic Ca²⁺ levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation. In: *Circulation research* 106 (6), S. 1134–1144.

Neely, J. R.; Liebermeister, H.; Battersby, E. J.; Morgan, H. E. (1967): Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart. In: *The American journal of physiology* 212 (4), S. 804–814.

Nelson DL (2004). 5-HT5 receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 3: 53–58.

Neumann J, Ebel H, Klöckner U, Böckler A, Günther S, Baumann M, Schulz N, Werner F, Gergs U (2008): The human serotonin 5-HT4a receptor. *Circulation* 117:8-9.

Nigmatullina, Razina R.; Kirillova, Venera V.; Jourjikiya, Roen K.; Mukhamedyarov, Marat A.; Kudrin, Vladimir S.; Klodt, Petr M.; Palotás, András (2009): Disrupted serotonergic and sympathoadrenal systems in patients with chronic heart failure may serve as new therapeutic targets and novel biomarkers to assess severity, progression and response to treatment. In: *Cardiology* 113 (4), S. 277–286.

Ouadid, H.; Albat, B.; Nargeot, J. (1995): Calcium currents in diseased human cardiac cells. In: *Journal of cardiovascular pharmacology* 25 (2), S. 282–291.

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. In: *Molecular pharmacology* 41 (2), S. 346–351.

Pape, Hans-Christian; Kurtz, Armin; Silbernagl, Stefan; et al. (2012): *Physiologie* S.70.

Parker, S. G., Taylor, E. M., Hamburger, S. A., Vimal, M., & Kaumann, A. J. (1995): Blockade of human and porcine myocardial 5-HT4 receptors by SB203186. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 335, 28–35

Parks, V. J.; Sandison, A. G.; Skinner, S. L.; Whelan, R. F. (1960): The stimulation of respiration by 5-hydroxytryptamine in man. In: *The Journal of physiology* 151, S. 342–351.

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

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

Pino, R.; Cerbai, E.; Calamai, G.; Alajmo, F.; Borgioli, A.; Braconi, L. et al. (1998): Effect of 5-HT₄ receptor stimulation on the pacemaker current I(f) in human isolated atrial myocytes. In: *Cardiovascular research* 40 (3), S. 516–522.

Pönicke, Klaus; Gergs, Ulrich; Buchwalow, Igor B.; Hauptmann, Steffen; Neumann, Joachim (2012): On the presence of serotonin in mammalian cardiomyocytes. In: *Mol Cell Biochem* 365 (1-2), S. 301–312.

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

Porzio MA, Pearson AM (1977): Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate-polyamide gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* 490:27-34.

Qvigstad, E. (2005): Dual Serotonergic Regulation of Ventricular Contractile Force Through 5-HT_{2A} and 5-HT₄ Receptors Induced in the Acute Failing Heart. In: *Circulation research* 97 (3), S. 268–276.

Rahme, M. M.; Cotter, B.; Leistad, E.; Wadhwa, M. K.; Mohabir, R.; Ford, A. P. et al. (1999): Electrophysiological and antiarrhythmic effects of the atrial selective 5-HT(4) receptor antagonist RS-100302 in experimental atrial flutter and fibrillation. In: *Circulation* 100 (19), S. 2010–2017.

Raymond JR, Turner JH, Gelasco A, et al (2006): 5-HT receptor signal transduction pathways. In: Roth B, cd. *The Serotonin Receptors: From Molecular Pharmacology to Human Therapeutics*, Totowa, NJ: Humana

Rivail, Lucie; Giner, Mireille; Gastineau, Monique; Berthouze, Magali; Soulier, Jean-Louis; Fischmeister, Rodolphe et al. (2004): New insights into the human 5-HT₄ receptor binding site: exploration of a hydrophobic pocket. In: *British journal of pharmacology* 143 (3), S. 361–370.

Robiolio, P. A.; Rigolin, V. H.; Wilson, J. S.; Harrison, J. K.; Sanders, L. L.; Bashore, T. M.; Feldman, J. M. (1995): Carcinoid heart disease. Correlation of high serotonin levels with valvular abnormalities detected by cardiac catheterization and echocardiography. In: *Circulation* 92 (4), S. 790–795.

Roth, Bryan L. (2006): *The serotonin receptors. From molecular pharmacology to human therapeutics*. Totowa, N.J: Humana Press (The receptors).

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

Sanders, L.; Kaumann, A. J. (1992): A 5-HT₄-like receptor in human left atrium. In: *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 345 (4), S. 382–386.

Saxena, P. R.; Mylecharane, E. J.; Heiligers, J. (1985): Analysis of the heart rate effects of 5-hydroxytryptamine in the cat; mediation of tachycardia by 5-HT₁-like receptors. In: *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 330 (2), S. 121–129.

Saxena, P.R; Wallis, D.I; Wouters, W. (Hg.) (1990): *Cardiovascular pharmacology of 5-hydroxytryptamine. Prospective therapeutic applications*. Dordrecht: Kluwer Academic (Developments in cardiovascular medicine, 106).

Saxena, P. R.; Wallis, D. I.; Wouters, W.; Bevan, P. (Hg.) (1990): Cardiovascular Pharmacology of 5-Hydroxytryptamine. Dordrecht: Springer Netherlands.

Schiavi, G. B.; Brunet, S.; Rizzi, C. A.; Ladinsky, H. (1994): Identification of serotonin 5-HT₄ recognition sites in the porcine caudate nucleus by radioligand binding. In: *Neuropharmacology* 33 (3-4), S. 543–549.

Selim AM, Sarswat N, Kelesidis I, Iqbal M, Chandra R, Zolty R. (2016): Plasma serotonin in heart failure: Possible marker and potential treatment target. *Heart, Lung and Circulation*. 2016;S1443-9506:31583-31589.

Striebel H. W. Prof. Dr. med: Anästhesie-Intensivmedizin-Notfallmedizin Schattauer, 2017.

Tada M, Kirchberger MA, Repke DI, Katz AM. The stimulation of calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 1974;249:6174–6180. (1974).

Tunwell, R. E.; Wickenden, C.; Bertrand, B. M.; Shevchenko, V. I.; Walsh, M. B.; Allen, P. D.; Lai, F. A. (1996): The human cardiac muscle ryanodine receptor-calcium release channel: identification, primary structure and topological analysis. In: *The Biochemical journal* 318 (Pt 2), S. 477–487.

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

Wallenstein, S.; Zucker, C. L.; Fleiss, J. L. (1980): Some statistical methods useful in circulation research. In: *Circulation research* 47 (1), S. 1–9.

Walter, M.; Lemoine, H.; Kaumann, A. J. (1984): Stimulant and blocking effects of optical isomers of pindolol on the sinoatrial node and trachea of guinea pig. Role of beta-adrenoceptor subtypes in the dissociation between blockade and stimulation. In: *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 327 (2), S. 159–175.

Yusuf, Shamil; Al-Saady, Naab; Camm, A. John (2003): 5-Hydroxytryptamine and Atrial Fibrillation. In: *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 14 (2), S. 209–214

8. Anhang

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

8.1. Tierexperimentelle Versuche

Narkose bei Echokardiographie 1,5 Vol.-% Isofluran, Sauerstoff Fluss 1,5l/min
Isoprenalinkonzentration und Serotoninkonzentration 100µl Isoprenalin bzw. Serotonin
(Konzentration: 10 mM in physiologischer NaCl-Lösung); i.p. Applikation.

8.2. Biochemische Untersuchungen

8.2.1. Genotypisierung

TE/SDS	Tris-HCl	50 mM
	EDTA	100 mM
	SDS	0,5%
	pH	8,0
TE-Puffer	Tris-HCl	10 mM
	EDTA	0,25 mM
	pH	8,0
Natriumacetat-Lösung	Natriumacetat	3 M
	pH	6,0
DEPC-Wasser	DEPC	0,1% (V/V)
	Über Nacht rühren, dann autoklavieren	
Agarosegel	Agarose	1%
	TAE-Puffer	
	Ethidiumbromid	0,01%

TAE-Puffer	Tris-Base	1,99 M
	EDTA	59,5 mM
	Eisessig	0,99 M
	gelöst in Aqua destillata	

Ladepuffer	TAE-Puffer	50%
	Glycerol	50%
	Bromphenolblau	

8.2.2. Homogenisierung (Lysispuffer)

NaHCO ₃ /SDS	NaHCO ₃	10 mM
	SDS	20%
	pH	7,4

8.2.3. Quantitative Proteinbestimmung nach Lowry (*Lowry et al., 1951*)

Stamm A	Na ₂ CO ₃ 2% in NaOH 0,1
Stamm B	K ⁺ -Na ⁺ -Tartrat 1%
Stamm C	CuSO ₄ 0,5%
Lösung D	Stamm A 99%
	Stamm B 0,5%
	Stamm C 0,5%
Lösung E	Folin-Ciocalteus (1:2)
Proteinstandard	1mg Rinderserum-Albumin/1 ml Aqua destillata

Der Proteinstandard wurde vor Gebrauch 1:100 verdünnt.

8.2.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Probenpuffer	Tris-Base	0,125 M
	SDS	4%
	Glycerol	20%
	Bromphenolblau	0,002%
	pH	6,8

Die Proben wurden entsprechend ihres spezifischen Proteingehaltes und der gewünschten Endkonzentration, mit Probenpuffer und NaHCO₃/SDS aufgearbeitet.

Trenngel 10%	Porziopuffer	47,39%
	Acrylamid 30%	31,6%
	Glycerol	7,9%
	H ₂ O	12,64%
	TEMED	0,08%
	APS	0,38%
Sammelgel 4%	Sammelgelpuffer	24,73%
	Acrylamid 30%	13,16%
	H ₂ O	61,05%
	TEMED	0,06%
	APS	1%
Porziopuffer (2x)	Tris-Base	0,2 M
	Glycin	0,6 M
	EDTA	0,12 mM
	SDS	0,2%
	Glycin	10%
	Polyacrylamid	0,4%
	pH	8,8
Sammelgelpuffer (4x)	Tris-Base	0,5 M
	SDS	0,4%
	pH	8

APS (10%)

Ammoniumpersulfat gelöst in Aqua destillata

Elektrophoresepuffer
(10x)

Tris-Base 0,4 M
Glycin 1,2 M
SDS 0,4%
pH 8,8
gelöst in 1l Aqua destillata

Der Elektrophoresepuffer wurde in einer 1:10 Verdünnung verwendet.

Transferpuffer

Na₂HPO₄ 40 mM
NaH₂PO₄ 7,9 mM
pH 8
gelöst in 5l Aqua destillata

Ponceau-Rot

Ponceau S 0,2%
Trichloressigsäure 2%

8.2.5. Immunologischer Nachweis von SR-Proteinen

TBST

Tris-Base 10 mM
NaCl 150 mM
Tween 20 0,1% (V/V)
pH 7,4

Milchpulver-Blockierungspuffer: Magermilchpulver (5% W/V) in TBST gelöst

BSA-Blockierungspuffer: Rinderserum-Albumin (2% W/V) in TBST gelöst

AP-Puffer

Triethanolamin 100 mM
NaCl 100 mM
MgCl₂ 5 mM
pH 9,4

NBT	NBT	50 mg/ml
	In Dimethylformamid	
BCIP	Toluidin-Salz	50 mg/ml
	In Dimethylformamid	

8.3. Primer, PCR-Programm und Antikörper

Primer

Forward	MHC-SEQ-P1, biomers.net GmbH, Ulm ACC CTT ACC CCA CAT AGA CC
Reverse	5HT-SEQ-P1R, biomers.net GmbH, Ulm AAA CAC CTC CCC ATA AAT CC

PCR-Programm

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

Antikörper

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

8.4 Substanzen

Agarose, Typ SeaKem	FMC bioproducts, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Acrylamid 30%: Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
L (+) –Ascorbinsäure	Merck, Darmstadt

5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	MBI Fermentas, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
CaCl ₂ x 2H ₂ O	Merck, Darmstadt
Carbaminsäure-Ethylester (Urethan)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloroform	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
dNTP	MBI fermentas, Heidelberg
Essigsäure 100%	(Eisessig) Merck, Darmstadt
Ethanol 100%	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Fluka Chemie GmbH
GR 125487	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Isoprenalin	Sigma-Aldrich, Steinheim
KCl	Roth, Karlsruhe
MgCl ₂ x 6H ₂ O	Merck, Darmstadt
Milchpulver	TSI GmbH, Zeven
Natriumacetat	C. Roth GmbH, Karlsruhe
NaCl	Merck, Darmstadt
Na ₂ -EDTA	C. Roth GmbH, Karlsruhe
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Nitro-Blau-Tetrazolium (NBT)	MBI Fermentas, Heidelberg
N,N-Dimethylformamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Phenol	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Polyacrylamid	Roth, Karlsruhe
Ponceau S-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Steinheim
Reserpin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rinderserumalbumin	Merck, Darmstadt
Serotonin	Sigma-Aldrich, Steinheim
10x Standard-Buffer	15mM MgCl ₂ ; Ampliqon
Taq-DNA-Polymerase	Ampliqon

Trichloressigsäure

Triethanolamin

Tris-HCl

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)

Tween 20

Merck, Darmstadt

Roth, Karlsruhe

C. Roth GmbH, Karlsruhe

Fluka AG, Buch

Merck, Darmstadt

8.5. Geräte und Bezugsquellen

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

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

Biophotometer; Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

Elektrophoresekammer Typ Horizon 58; Life Technologies, Gaithersburg, USA

Alphamager HP Geldokumentation; Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf

Waage Typ AT61 DeltaRange; Mettler Instruments GmbH, Gießen Mikro-

Dismembrator S Typ 8531609; Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen

Ultraschallhomogenisator Typ UW 2070; Bandelin, Berlin

Nitrocellulosemembran Typ Amersham Hybond-N+ ; GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg

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

Trans-Blot Cell, Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Powerlab-System; ADInstruments, Spechbach

Chart 5 Software; ADInstruments, Spechbach

Prism 5; GraphPad Software, San Diego, CA

9. Thesen

1. Es konnte ein transgenes Maus-Modell mit kardialer Überexpression von humanen Serotonin-Rezeptoren vom Typ 4a entwickelt werden.
2. Die in das Genom integrierte cDNA-Sequenz für den 5-HT_{4a}-Rezeptor konnte mittels PCR in den transgenen Tieren nachgewiesen werden.
3. Serotonin bewirkt einen positiv inotropen Effekt am transgenen Tiermodell.
4. Serotonin bewirkt einen positiv chronotropen Effekt am transgenen Tiermodell.
5. Es wurden spontane Arrhythmien an linken Vorhöfen der transgenen Tiere beobachtet.
6. Die Wildtyp-Herzen zeigten keine Reaktion auf Serotonin.
7. Auf Proteinebene bewirkte Serotonin eine Phosphorylierung von Phospholamban an Serin16 und Threonin17 in rechten und linken Vorhöfen von transgenen Tieren.
8. Die Ergebnisse weisen auf eine funktionelle Expression des humanen Serotonin-Rezeptors vom Typ 4a hin und somit auf die erfolgreiche Etablierung eines Tiermodells zur Untersuchung kardialer Serotonineffekte.

X. Lebenslauf

Name, Vorname	Baumann, Martin
Geburtsdatum/-ort	05.06.1982 / Staßfurt
Familienstand	verheiratet, 2 Kinder (Moritz und Marlene)
Konfession	römisch-katholisch
Wohnort	Reiterstaffelplatz 21, 50968 Köln

Schullaufbahn

Aug. 1989 - Juni 2002	Grundschule und Gymnasium in Staßfurt
Juni 2002	Abitur

Zivildienst

Aug. 2002 – Mai 2003	Berufsförderungswerk Sachsen-Anhalt zur Rehabilitation körperlich behinderter Menschen
----------------------	--

Studium

Okt. 2003 - Nov. 2009	Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther- Universität Halle-Wittenberg
Juli 2005	1.Staatsexamen
November 2009	2.Staatsexamen

Ärztliche Tätigkeit

Dezember 2009 -
Mai 2010

Assistenzarzt in der HNO-Abteilung
Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg

15. Juni 2010 -
September 2013

Assistenzarzt in der HNO-Abteilung
Klinikum Martha-Maria Halle / Dölau

Oktober 2013 -
19. März 2015

Assistenzarzt in der HNO-Abteilung
St. Franziskus Hospital Köln-Ehrenfeld

20. März 2015 -
Juli 2016

Facharzt in der HNO-Abteilung
St. Franziskus Hospital Köln-Ehrenfeld

Ab August 2016

Funktionsoberarzt in der HNO-Abteilung
St. Franziskus Hospital Köln-Ehrenfeld

XI. Selbstständigkeitserklärung

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

Charakterisierung eines neuen transgenen Tiermodells mit herzspezifischer Überexpression von humanen 5-Hydroxytryptamin-Rezeptoren Typ 4a

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

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

Köln, den 13.03.2019

Martin Baumann

XII. Erklärung zu weiteren Promotionsversuchen

Hiermit erkläre ich, Martin Baumann, keine weiteren Promotionsversuche unternommen zu haben.

Köln, den 13.03.2019

Martin Baumann

XIII. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. J. Neumann möchte ich ganz herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und das in mich gelegte Vertrauen in die sachgerechte Umsetzung danken. Seine gute Betreuung und ständige Ansprechbarkeit waren eine große Hilfe. Für seine Geduld mir gegenüber möchte ich mich sehr herzlich bedanken!

Ein besonderer Dank geht an Herrn Dr. U. Gergs für die intensive Betreuung. Er stand mir bei jeglichen Problemen und Fragen immer hilfsbereit zur Seite. Für die vielen motivierenden Telefonate bin ich ihm sehr dankbar.

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

Als weiteres möchte ich mich vielmals bei Herrn Prof. Dr.med. H. Ebelts für die freundliche Zusammenarbeit während der Echokardiographie bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Frau, die mir den Zeitraum geschaffen hat, damit ich diese Arbeit beenden konnte. Ich bin glücklich mit ihr und unseren Kindern zusammen leben zu können.