

DISSERTATION

Benedikt Käufler



MARTIN-LUTHER UNIVERSITÄT
HALLE-WITTENBERG

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Einfluss von Phosphodiesterasen auf kardiale Effekte nach 5-HT₄-
Rezeptorstimulation in transgenen Mäusen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr.med.)

Vorgelegt der medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Benedikt Käufler

geboren am 15.04.1984 in Rotenburg (Wümme)

Gutachter/Gutachterin:

Prof. J. Neumann

Prof. W.-H. Zimmermann, Göttingen

Prof. T. Eschenhagen, Hamburg

05.11.2019

25.08.2020

Referat

Funktionell wirksame Serotonin- (5-HT) Rezeptoren vom Typ 4 (5-HT₄) sind in chronisch insuffizienten Ventrikeln von Menschen und Ratten nachgewiesen worden. Die über diese Rezeptoren vermittelten inotropen Effekte sind mit zunehmender Schwere der Herzinsuffizienz erhöht. Die andauernde Stimulation von 5-HT₄-Rezeptoren während einer Herzinsuffizienz könnte zudem zu Herzrhythmusstörungen führen. Außerdem ergab die Behandlung mit einem 5-HT₄-Rezeptorantagonisten potentiell vorteilhafte Wirkungen. Es ist daher möglich, dass 5-HT₄-Rezeptoren von pathophysiologischer Relevanz für eine Herzinsuffizienz sind.

Phosphodiesterasen (PDEs) sind Enzyme, die cAMP abbauen und damit die cAMP-abhängigen Signalwege modulieren können. Durch unterschiedliche subzelluläre Verteilung verschiedener PDE-Isoenzyme kommt es zur Bildung von cAMP-Kompartimenten, in denen die durch Proteinkinase A (PKA) vermittelten Effekte unterschiedlich moduliert werden. Die Funktion von PDEs bei der Regulation von 5-HT₄-Rezeptor-abhängigen Signalen ist nicht genau verstanden. In dieser Arbeit wurde untersucht, welche der kardialen PDEs in der Regulation des positiv inotropen Effektes (PIE) und des positiv chronotropen Effektes (PCE) nach 5-HT₄-Rezeptorstimulation eine Rolle spielen.

Es sind Kontraktionskraft- und Frequenzmessungen an isolierten elektrisch gereizten linken bzw. spontan schlagenden rechten Herzvorhöfen von transgenen und Wildtyp (WT) Mäusen durchgeführt worden. Die transgenen Mäuse wiesen eine Herzmuskelzell-spezifische Überexpression des humanen 5-HT_{4a}-Rezeptors auf. Die transgenen Vorhöfe reagierten auf 5-HT positiv inotrop und positiv chronotrop, wohingegen die WT-Vorhöfe keine Reaktion auf 5-HT zeigten.

Der Einfluss von PDE2, PDE3 und PDE4 auf die 5-HT-vermittelte Inotropie und Chronotropie wurde einzeln und in Kombination durch spezifische Hemmstoffe (EHNA, Cilostamid, Rolipram) untersucht. Zum Vergleich wurde ein unselektiver PDE-Hemmstoff (IBMX) angewendet.

PDE2, PDE3 und PDE4 können den Serotonin-vermittelten inotropen Effekt nach 5-HT₄-Rezeptoraktivierung modulieren, wobei PDE4 den größten Einfluss hat. Bei der Regulierung der Frequenz könnte PDE4 ebenfalls beteiligt sein, allerdings nur in Kombination mit anderen PDEs.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Serotonin.....	1
1.2	Serotoninrezeptoren.....	2
1.3	Serotoninwirkung am Herzen.....	2
1.3.1	5-HT ₄ Rezeptor-Signalkaskade.....	3
1.4	Phosphodiesterasen.....	5
1.4.1	Phosphodiesterase-Inhibitoren.....	8
1.5	Transgenes Mausmodell.....	10
1.6	Klinische Relevanz und Zielsetzung der Arbeit.....	11
2	Material und Methoden.....	12
2.1	Versuchstiere und Tierhaltung.....	12
2.2	Generierung 5-HT _{4a} -Rezeptor überexprimierender Mäuse.....	12
2.3	Genotypisierung.....	12
2.3.1	Extraktion und Isolation der DNA.....	12
2.3.2	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	13
2.3.3	PCR-Amplifikation.....	13
2.3.4	Agarosegelelektrophorese.....	14
2.4	Versuchsaufbau.....	14
2.4.1	Das Organbad.....	14
2.4.2	Die Messanlage.....	14
2.4.3	Organentnahme und Präparation der Herzen.....	16
2.5	Versuchsdurchführung.....	16
2.6	Statistik.....	17
2.7	Anhang.....	18
3	Ergebnisse.....	21
3.1	Genotypisierung.....	21
3.2	Kontraktionskraft- und Frequenzmessungen der Herzvorhöfe.....	22
3.3	5-HT-Konzentrations-Wirkungskurve ohne PDE-Hemmstoffe.....	23
3.4	Experimente mit einzelnen PDE-Hemmstoffen.....	25
3.4.1	EHNA.....	25
3.4.2	Cilostamid.....	27
3.4.3	Rolipram.....	28

3.4.4	IBMX	31
3.5	Experimente mit PDE-Hemmstoffkombinationen	33
3.5.1	Cilostamid und Rolipram	34
3.5.2	EHNA und Rolipram	36
3.5.3	Cilostamid und EHNA	38
3.5.4	Cilostamid, EHNA und Rolipram	39
3.6	EC ₅₀ -Werte der Konzentrations-Wirkungs-Kurven	41
3.7	Anspannungs- und Relaxationszeiten der linken Vorhöfe von TG- und WT- Mäusen	42
4	Diskussion	44
4.1	Diskussion der Methoden	44
4.1.1	Transgenes Mausmodell	44
4.1.2	Kontraktionsexperimente	44
4.2	Einfluss PDE- Isoenzyme unter Basalbedingungen in rechten Vorhöfen	44
4.3	Einfluss PDE- Isoenzyme unter 5-HT Zugabe in rechten Vorhöfen	46
4.4	Einfluss PDE-Isoenzyme unter Basalbedingungen in linken Vorhöfen	46
4.5	Einfluss von 5-HT in Gegenwart von PDE-Isoenzymen in linken Vorhöfen	47
4.6	Fazit	48
4.7	Ausblick	52
5	Zusammenfassung	53
6	Literaturverzeichnis	54
7	Thesen	59
	Lebenslauf	VII
	Erklärungen	VIII
	Publikationen	IX
	Danksagung	X

Abkürzungsverzeichnis

5'AMP	Adenosin-5'-monophosphat
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
Abb.	Abbildung
AC	Adenylylcyclase
AKAP	A-Kinase-Ankerprotein
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bpm	Beats per minute (Herzschläge pro Minute)
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium ²⁺ -Ionen
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EC ₅₀	halbmaximale effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK2	extrazelluläre Signal-regulierte Kinase 2
EZR	Extrazellulärraum
fmol	Femtomol
g	Gramm
GAF	cGMP-specific phosphodiesterases, adenylyl cyclases and FhIA
Hz	Hertz
IBMX	3-Isobutyl-1-methyl-xanthin
IE	Internationale Einheit
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
Iso	Isoprenalin
IZR	Intrazellulärraum
Kg	Kilogramm
Ktr	Kontrolle

KWK	Konzentrations-Wirkungs-Kurve
Log	Logarithmus zur Basis 10
LTCC	spannungsabhängiger L-Typ-Calciumkanal
M	molar (Mol/Liter)
mA	Milliampère
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium ²⁺ -Ionen
MHC	schwere Kette des Myosins
min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µM	Mikromolar (Mikromol/Liter)
mm	Millimeter
mM	Millimolar (Millimol/Liter)
mmol	Millimol
mN	Millinewton
ms	Millisekunden
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
mV	Millivolt
n	Stichprobenumfang
Na ⁺	Natrium
n.b.	nicht berechenbar
nm	Nanometer
nM	Nanomolar (Nanomol/Liter)
O ₂	Sauerstoff
P	Phosphor
PCE	positiv chronotroper Effekt
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PIE	positiv inotroper Effekt
pEC ₅₀	negativer dekadischer Logarithmus der EC ₅₀
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase (Proteinkinase A)
PLB	Phospholamban
pmol	Pikomol

Primer	Oligonukleotid für die Polymerase-Kettenreaktion
RIVA	Ramus interventricularis anterior
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RyR	Ryanodin-Rezeptor (Ca ²⁺ -Freisetzungskanal)
s.	siehe
s	Sekunde
Sac	Saccharose
s.c.	subkutan
SDS	Natrium-Laurylsulfat
SEM	Standardabweichung des arithmetischen Mittels
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer
TG	transgene Maus mit kardialer Überexpression humaner 5-HT _{4a} -Rezeptoren
TnC	Kalzium-bindendes Troponin
TnI	Troponin I (Troponin-Inhibitor)
u.a.	unter anderem
UCR	Upstream-conserved-regions
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	1. Volt 2. Volumen
v. a.	vor allem
vs.	versus
WT	Wildtyp-Maus
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Subzelluläre Verteilung von PDE-Isoenzymen und Signaltransduktion nach 5-HT ₄ - Rezeptorstimulation	4
Abb. 2: Struktur und Domänen der PDE-Isoenzyme	8
Abb. 3: Strukturformeln	10
Abb. 4: Versuchsausrüstung für Kontraktions- und Frequenzmessungen.....	15
Abb. 5: Schematische Darstellung der Experimente	17
Abb. 6: Genotypisierung	21
Abb. 7: Repräsentative Mechanogramme der Reaktion von TG und WT auf Serotonin.....	23
Abb. 8: 5-HT Konzentrationswirkungskurve ohne PDE-Hemmstoffe	24
Abb. 9: EHNA	26
Abb. 10: Cilostamid.....	28
Abb. 11: Rolipram	30
Abb. 12: IBMX.....	33
Abb. 13: Rolipram und Cilostamid	35
Abb. 14: Rolipram und EHNA	37
Abb. 15: Cilostamid und EHNA	39
Abb. 16: EHNA, Cilostamid und Rolipram	40
Abb. 17: Signalwege in Kardiomyozyten bei 5-HT ₄ - Rezeptorstimulation	50

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Struktur und Domänen der PDE-Isoenzyme	7
Tabelle 2: Übersicht über pEC ₅₀ -Werte von linken und rechten Vorhöfen von TG-Mäusen	41
Tabelle 3: Anspannungs- und Relaxationszeiten linker Vorhöfe	42
Tabelle 4: Synopsis der PDE-Effekte in TG	51

1 Einleitung

1.1 Serotonin

Der US-Amerikaner Irvine Page forschte um ca. 1950 an möglichen Ursachen der arteriellen Hypertonie. Im Rahmen dieser Arbeiten wurde erstmals Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) als ein Vasokonstriktor im Serum beschrieben (Rapport et al. 1948). Der italienische Pharmakologe Vittorio Erspamer entdeckte 5-HT im Magen-Darm-Trakt. Aus enterochromaffinen Zellen des Magens konnte er eine Substanz isolieren, die er „Enteramin“ nannte. Später erkannte Erspamer, daß es sich bei dieser Substanz um 5-HT handelte (Erspamer 1952).

5-HT ist ein Gewebshormon und Neurotransmitter. Es kommt nicht nur im Organismus der Menschen und Säugetiere vor, sondern ist in der Natur weit verbreitet. Beispielsweise wird es von Pflanzen synthetisiert und ist u.a. in Nüssen, Bananen, Orangen und Kaffee enthalten (Ramakrishna et al. 2011).

Phylogenetisch betrachtet ist 5-HT ein sehr altes Hormon (Peroutka und Howell 1994). Das könnte eine Erklärung dafür sein, warum 5-HT für so viele physiologische Systeme im menschlichen Körper von großer Bedeutung ist. Hohe 5-HT Konzentrationen findet man vor allem in Thrombozyten. Die Freisetzung von 5-HT aus Thrombozyten bedingt im Zuge der Blutgerinnung eine Steigerung der Thrombozytenaggregation (Takano 1995). Im Magen-Darm-Trakt nimmt 5-HT als Gewebshormon eine zentrale Stellung ein und steuert vor allem die Peristaltik (Verbeuren 1992). Im zentralen Nervensystem wird 5-HT ein regulierender Einfluss auf Stimmung, Aggression, Schlafverhalten, Lern- und Gedächtnisfunktionen, Essverhalten sowie Schmerzempfindung zugeschrieben (Popova 2006, Wilkinson und Dourish 1991).

Veränderungen des Serotoninstoffwechsels haben möglicherweise Einfluss auf die Entstehung und den Verlauf von vielen Krankheiten wie z.B. Depressionen, Schizophrenie, Migräne, Angst- und Panikstörungen, Bluthochdruck, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und Zöliakie (Shajib und Khan 2015). Am Herzen kann es insbesondere bei sehr hohen 5-HT-Plasmakonzentrationen, wie es zum Beispiel im Rahmen des Karzinoid-Syndroms vorkommt, zu strukturellen Veränderungen wie Insuffizienz der Aorten- und Pulmonalklappe kommen (Robiolio et al. 1995).

Des Weiteren wirkt 5-HT proarrhythmogen und wird mit der Entstehung von Vorhofflimmern in Verbindung gebracht (Kaumann 1994). Vorhofflimmern ist eine der häufigsten Arrhythmien und erhöht das Risiko für Tod, kongestive Herzinsuffizienz und Schlaganfall (Llod- Jones et al. 2004).

Die 5-HT-Synthese findet hauptsächlich in den enterochromaffinen Zellen des Darmes (>90%), zu kleinem Anteil in Neuronen des Darmes (ca. 5%) und den intracerebral gelegenen Raphe-Kernen (<5%) statt (Shajib und Khan 2015, Baganz und Blakely 2013). Eine Passage von 5-HT durch die Blut-Hirn-Schranke ist nicht möglich. Nach Freisetzung in die Blutbahn wird 5-HT von zirkulierenden Thrombozyten aufgenommen. Diese können 5-HT speichern und bei Aktivierung

wieder freisetzen. Der Abbau von 5-HT erfolgt durch Monoaminoxidasen bevorzugt im Darm, Leber und in serotoninerger Neuronen (Yusuf et al. 2003).

1.2 Serotoninrezeptoren

5-HT vermittelt seine Wirkung über membrangebundene Rezeptoren. Es werden sieben 5-HT Rezeptor-Subtypen (5-HT₁₋₇) unterschieden, die sich entsprechend ihrer Signaltransduktion in vier Klassen unterteilen lassen (Hoyer et al. 1994). Bis auf den 5-HT₃-Rezeptor gehören alle übrigen 5-HT Rezeptoren zur Superfamilie der G- Protein- gekoppelten Rezeptoren. Die 5-HT₃ Rezeptoren aktivieren direkt Kationenkanäle und haben Ähnlichkeit zu nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (Hoyer et al. 1994). Die Gruppe der 5-HT_{4,6,7} Rezeptoren aktivieren die Adenylylcyclase (AC), 5-HT_{1,5} Rezeptoren hemmen die AC und die 5-HT₂ Rezeptoraktivierung stimuliert eine Phospholipase C (Xu et al. 2002).

1.3 Serotoninwirkung am Herzen

5-HT gelangt im wesentlichen über die Gefäße des Herzkreislaufsystems und letztendlich über die Koronararterien zum Herzen. Darüber hinaus findet eine 5-HT-Synthese auch direkt im Herzen statt (Gergs et al. 2013). Eine besondere Stellung haben die 5-HT₄ Rezeptor-Subtypen. Durch das sogenannte alternative Spleißen, ein besonderer Vorgang im Rahmen der Transkription, existieren verschiedene Isoformen. Der 5-HT_{4a}-Rezeptor ist die häufigste Isoform am menschlichen Herzen (Lezoualc'h et al. 2007). Über diese Rezeptoren wird an elektrisch stimulierten Präparaten linker Vorhöfe der positiv inotrope Effekt (PIE) und am Sinusknoten im rechten Vorhof der positiv chronotrope Effekt (PCE) von 5-HT vermittelt (Kaumann et al. 1990, Pino et al. 1998).

Die 5-HT₄-Rezeptorstimulation geht mit einer cAMP-Erhöhung einher und es kommt zur Aktivierung der PKA (Kaumann et al. 1990). Die PKA phosphoryliert L-Typ-Calciumkanäle (LTCC), Phospholamban (PLB), Troponin und führt über intrazelluläre Calciumverschiebungen zu einer verstärkten Kontraktilität des Herzens (Gergs et al. 2009).

Im menschlichen Ventrikel vermittelt der 5-HT₄-Rezeptor physiologisch keinen PIE. Jedoch wurde in Experimenten an insuffizientem Ventrikelmyokard und nach Vorbehandlung mit dem unspezifischen PDE-Hemmstoff 3-Isobutyl-1-methyl-xanthin (IBMX) ein larvierter 5-HT-vermittelter PIE entdeckt (Brattelid et al. 2004). Die gleiche Arbeitsgruppe wiederholte diese Beobachtung in einem Laborversuch mit Ratten. Die Präparate aus dem Ventrikel der Ratte exprimierten auf mRNA Ebene sowohl 5-HT₂- als auch 5-HT₄-Rezeptoren (Brattelid et al. 2012, Lær et al. 1998). Je schwerer die durch Okklusion einer Koronararterie (RIVA) hervorgerufenen

Herzveränderungen (Myokardhypertrophie bis zur schweren Herzinsuffizienz) waren, desto stärker war die über 5-HT₄-Rezeptoren vermittelte inotrope Wirkung.

Afzal et al. (2008) untersuchten ebenfalls kardiale PDEs am insuffizientem Ventrikelmyokard von Ratten und Menschen. Die Kontraktilität wurde in den Präparaten der Ratte sechs Wochen nach Ligatur der linken Koronararterie und an den Präparaten von menschlichen Spenderherzen nach Herztransplantation gemessen (Afzal et al. 2008). Die postinfarktialen Rattenherzen reagierten auf 5-HT positiv inotrop. Der inotrope Effekt konnte durch unselektive PDE-Hemmung mit IBMX und selektive PDE3-Hemmung mit Cilostamid verstärkt werden, EHNA und Rolipram zeigten dagegen keine Wirkungen. Durch die kombinierte PDE3- und PDE4-Hemmung mit Cilostamid und Rolipram ließ sich der inotrope Effekt weiter erhöhen als durch die alleinige PDE3-Hemmung. Die PDE3- und PDE4-Hemmung erhöhte die Wirksamkeit von 5-HT auf den PIE und in der Kontrollgruppe wurde ebenfalls ein 5-HT vermittelter PIE aufgedeckt. Die Versuche am menschlichen Myokard erbrachten bezüglich der PDE-Regulation ähnliche Ergebnisse (Afzal et al. 2008).

Des Weiteren konnte man feststellen, dass sich die kardiale hämodynamische Leistung bei Patienten mit Herzinsuffizienz, durch Blockierung der 5-HT₄ Rezeptoren verbesserte (Kjekshus et al. 2009).

1.3.1 5-HT₄ Rezeptor-Signalkaskade

Bei einer Myokardkontraktion wird die Ca²⁺-Konzentration im Zytosol erhöht. Dieses geschieht maßgeblich durch die sogenannte Ca²⁺-induzierte Ca²⁺ Freisetzung. Durch den LTCC strömt Ca²⁺ nach Depolarisation in die Zelle. Trigger-Ca²⁺ initiiert die vermehrte Freisetzung von Ca²⁺ über den Ryanodin-Rezeptor (RyR) aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) in das Zytosol, wo das Ca²⁺ die Myofibrillen aktiviert und die Kontraktionskraft erhöht (Fabiato und Fabiato 1975, Bers 2008). Dieser Prozess kann durch 5-HT und einer folgenden Kaskade verbessert werden. Der 5-HT₄ Rezeptor kann von 5-HT als auch von anderen synthetischen Agonisten aktiviert werden. Nach Stimulation des 5-HT₄-Rezeptors kommt es über ein gekoppeltes G-Protein zur Aktivierung der AC und Bildung von cAMP aus ATP (Dumuis et al. 1988). In der Folge kommt es zur Aktivitätssteigerung der PKA (Kaumann et al. 1990). Durch Phosphorylierungen verschiedener Zielproteine durch die PKA wird diese Ca²⁺-Erhöhung weiter verstärkt. Phosphorylierung der LTCC in der Plasmamembran erhöht dessen Öffnungswahrscheinlichkeit und es kommt zum vermehrten Ca²⁺-Einstrom vom Extrazellularraum in den Intrazellularraum (Ouadid et al. 1992). Durch Phosphorylierung von PLB wird seine hemmende Funktion auf die Ca²⁺-ATPase im sarkoplasmatischen Retikulum (SERCA) geschwächt. Während der Diastole bewirkt die gesteigerte Aktivität von SERCA eine schnellere Relaxation (positiv lusitroper Effekt) und erhöht den Ca²⁺-Transport vom Zytosol in das SR. In der nächsten Systole kann wiederum vermehrt Ca²⁺ aus dem SR freigesetzt und somit die Schlagkraft erhöht werden (Bers 2008). Die PKA phosphoryliert außerdem eine hemmende Untereinheit des Troponinkomplexes, wodurch kontraktile Elemente für

Ca²⁺ desensibilisiert werden und sich die Relaxationszeit verkürzt (Solaro und Rarick 1998). Es kommt zu einer negativen Rückkopplung durch Phosphorylierung und damit Aktivierung von PDEs. In der Folge wird cAMP verstärkt zu inaktiven 5`AMP abgebaut und der aktivierende Einfluss von cAMP auf die PKA wird aufgehoben (Francis et al 2011). 5-HT beeinflusst über 5-HT₄ Rezeptoren auch die Schrittmacherzellen des Sinusknotens. Eine 5-HT₄ Rezeptorstimulation führt zu erhöhtem Ca²⁺-Einstrom in die Zelle und es kommt zur Zunahme von elektrischen Impulsen, folglich steigt die Schlagfrequenz an (Pino et al. 1998). In Abb. 1 ist die Signaltransduktion bei 5-HT_{4a}-Rezeptorstimulation in Herzvorhöfen schematisch dargestellt.

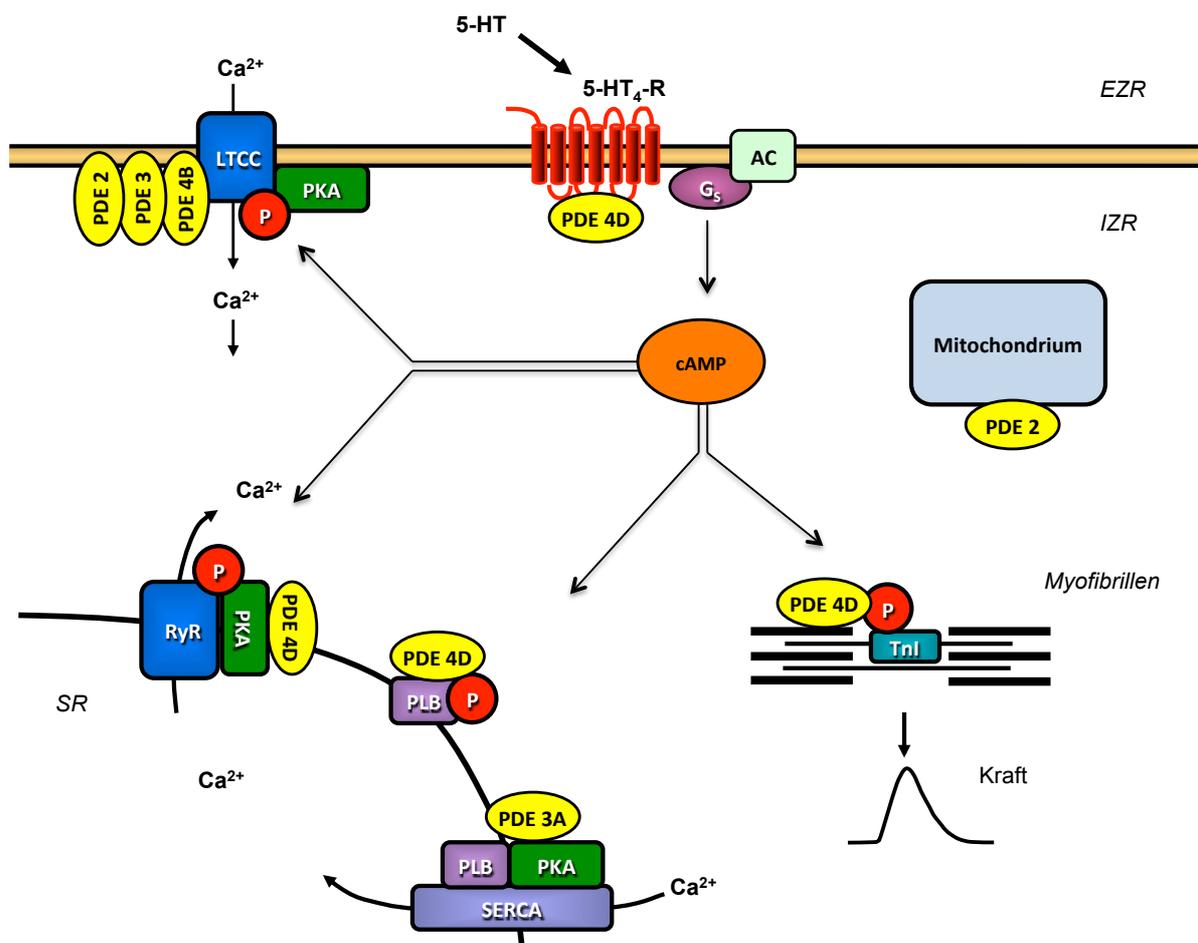


Abb. 1: Subzelluläre Verteilung von PDE-Isoenzymen und Signaltransduktion nach 5-HT₄-Rezeptorstimulation

Die mutmaßliche subzelluläre Lokalisation der Phosphodiesterasen 2-4 ist schematisch dargestellt. Ca²⁺ gelangt über den L- Typ- Ca²⁺- Kanal (LTCC) in die Herzmuskelzelle. Dieser Prozess kann durch 5-HT über eine Kaskade verstärkt werden. 5-HT bindet an den 5-HT₄-Rezeptor und bewirkt über das stimulierende G_s-Protein eine Aktivitätssteigerung der Adenylcyclase im Sarkolemma. In der Folge steigt die Generierung von cAMP, welches die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) stimuliert. Die PKA phosphoryliert Phospholamban (PLB), Ryanodin- Rezeptoren (RyR), L- Typ- Ca²⁺-Kanäle , Troponin I (TnI) und andere regulatorische Proteine. Dies bewirkt eine Zunahme der Kontraktionskraft und schnellere Relaxation der Herzmuskelzelle. Die sogenannte „Calcium- induzierte Calciumfreisetzung“ führt zu vermehrten Ca²⁺-Freisetzung über den RyR aus dem SR in das Zytosol, wo Ca²⁺ die Myofibrillen aktiviert und zur stärkeren Kontraktionskraft führt. In der Diastole wird Ca²⁺ über die sarkoplasmatische Retikulum Ca²⁺-ATPase

(SERCA) in das SR aufgenommen. Die Aktivität von SERCA ist höher, wenn der Phosphorylierungszustand von PLB durch PKA erhöht ist. PDE2-4 sind bei LTCC, PDE3 und PDE4 in der Nähe von PLB, PDE4 bei G-Protein gekoppelten Rezeptoren, RYR und Myofibrillen lokalisiert, PDE2 ist auch im Zytosol vorzufinden. PDE3 und PDE4 sind auch am Zellkern angebunden (hier nicht dargestellt).

1.4 Phosphodiesterasen

Die Aktivierung von 5-HT₄ Rezeptoren erhöht den cAMP-Gehalt im Zytosol und führt zur Aktivierung zahlreicher zellulärer Prozesse wie Transkription, Zellteilung, Proliferation, Energiehaushalt und anderer Zell-spezifischer Funktionen, wie in diesem Kontext die Kontraktionskraft und Frequenz von Herzmuskelzellen (Leroy et al. 2018). Der Abbau von cAMP ist einzig durch cAMP-spezifische PDEs möglich (s. Tab.1). PDEs spalten cAMP zu inaktiven 5'-AMP und verringern oder beenden somit die durch cAMP initiierten Effekte.

PDEs gehören zu einer heterogenen Gruppe von Enzymen die von wahrscheinlich 22 Genen kodiert werden. Es lassen sich insgesamt 11 PDE-Familien unterscheiden. Jede PDE-Familie kann von verschiedenen Genen stammen und durch das sogenannte alternative Spleißen existieren nahezu 100 PDE-Isoformen (Conti und Beavo 2007, Knight et al. 2016).

Die PDE-Isoformen unterscheiden sich in ihrem regulatorischen Mechanismus, Substratspezifität und -Affinität, katalytischen Eigenschaften und subzellulärer Lokalisation (Conti et al. 2014). Die Abb. 2 zeigt schematisch eine Übersicht mit Struktur und Domänen von PDE-Isoformen. Die Regulierung erfolgt durch verschiedene Prozesse wie Phosphorylierungen, Bindung zyklischer Nukleotide an allosterischen GAF-Domänen, Änderung des Expressionsniveaus, Wechselwirkung mit regulatorischen Ankerproteinen sowie reversible Translokation zwischen subzellulären Kompartimenten (Francis et al. 2011).

Unter diesen 11 PDEs gibt es PDE1, eine Ca²⁺/Calmodulin-aktivierte PDE; PDE2 ist eine cGMP-aktivierte PDE; PDE3 eine cGMP-gehemmte PDE; PDE4 ist eine cGMP-unabhängige und cAMP-spezifische PDE. PDE4, 7 und 8 spalten spezifisch cAMP, während PDE5, 6 und 9 nur cGMP spalten. PDE1, 2, 3, 10 und 11 sind unspezifisch und spalten cAMP und cGMP (Conti und Beavo 2007, Bobin et al. 2016). Tab. 1 zeigt eine Übersicht der PDEs mit Substratspezifität und Modulatoren. In Kardiomyozyten der Maus wurde mRNA für PDE1A, 1C, 2A, 3A, 3B, 4A, 4B, 4D, 5A, 7A, 8A, und 9A nachgewiesen (Isidori et al. 2015). Außerdem war mRNA von PDE2A, 3A, 3B, 4A, 4B, und 4D im Sinusknoten, rechten Vorhof und rechten Ventrikel zu finden (Hua et al. 2012). PDE5, 6 und 9 werden in dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt, da sie cGMP spezifisch sind und folglich nicht cAMP im Herzen spalten.

Von den verbleibenden PDEs sind PDE2, PDE3 und PDE4 hauptsächlich für die cAMP-Spaltung im Herzen verantwortlich und werden in dieser Arbeit näher betrachtet. Kardiale 5-HT Effekte über 5-HT₄ Rezeptoren sind in gesunden Vorhöfen und insuffizienten Ventrikeln von Menschen, insuffizienten Ventrikeln von Ratten und gesunden Vorhöfen und Ventrikeln von Schweinen

beschrieben worden. Es zeigen sich große Unterschiede in der cAMP-PDE Aktivität zwischen den Spezies, nämlich 4,55 pmol/min/mg Protein in Kardiomyozyten der adulten Ratte versus 92 pmol/min/mg Protein in Kardiomyozyten des Menschen (Johnson et al. 2012). Von der cAMP-PDE Aktivität fällt in Kardiomyozyten von Menschen 56% auf PDE1, 26% auf PDE3 und 11% auf PDE4 und nur ein sehr geringer Anteil fällt auf PDE2, wohingegen sich PDE1 in Ratten praktisch inaktiv zeigte (Johnson et al. 2012). Andere Autoren beschreiben in WT-Mäusen eine Gesamt-PDE-Aktivität von 33 pmol/min/mg Protein, davon 3 pmol/min/mg Protein für PDE1, 8 pmol/min/mg Protein für PDE3 und 3,5 pmol/min/mg Protein für PDE4 (Wang et al. 2017). In einer anderen Studie zeigte sich eine Gesamt-PDE-Aktivität von 250 pmol/min/mg Protein in humanem Ventrikelmyokard, 50 pmol/min/mg Protein im Myokard der Maus und 47 pmol/min/mg Protein im Myokard der Ratte (Richter et al. 2011). Der Anteil von PDE4 an der Gesamt-Aktivität betrug bei Präparaten von Menschen 8%, von Mäusen 32% und von Ratten 52% (Richter et al. 2011). Die verbleibende Aktivität war ungefähr gleichermaßen auf PDE1, PDE2 und PDE3 verteilt (Richter et al. 2011). Diese deutlichen Speziesunterschiede zeigen, dass sich Daten von Ratten oder Mäusen nicht einfach auf menschliche PDE-Daten übertragen lassen.

Eine zusätzliche Eigenschaft des PDE-Systems ist, dass die Aktivierung verschiedener Gs-Protein-gekoppelter Rezeptoren zur Aktivierung verschiedener PDE-Isoenzyme führt. Zum Beispiel bewirkt die Aktivierung von β_1 -Adrenozeptoren in Herzmuskelzellen eine bevorzugte Aktivierung der Variante PDE4D8, während die Stimulation der verwandten β_2 -Adrenozeptoren die Aktivierung der Variante PDE4D5 bewirkt (Richter et al. 2008). β_1 -Adrenozeptoren, nicht aber β_2 -Adrenozeptoren können eine Spleißvariante von PDE4B aktivieren, was bestätigt, dass verschiedene Rezeptoren die Aktivierung von verschiedenen PDEs verursachen (Mika et al. 2014). Unterschiedliche Rezeptoren aktivieren unterschiedliche PDEs, welche PDEs bei 5-HT₄-Stimulierung aktiviert werden ist unklar. PDE-Isoenzyme haben unterschiedliche Funktionen im Herzen. cAMP und PDEs liegen in subzellulären Kompartimenten vor, wie es in der Abb. 1 dargestellt ist (McCormick et al. 2014, Nicholaev et al. 2006). Die kompartimentierte Signalvermittlung resultiert wohl aus der Fähigkeit individueller G-Protein-gekoppelter Rezeptoren räumlich unterschiedliche cAMP-Pools zu erzeugen. Diese wiederum aktivieren definierte Untergruppen von lokalisierten PKA, welche über A-Kinase-Ankerproteine (AKAPs) an spezifische Zielstrukturen gebunden sind. PDEs haben eine Schlüsselrolle bei der räumlichen Regulation von cAMP. Sie tragen nicht nur zur Etablierung von Grenzen bei der cAMP-Diffusion und zur Erzeugung von cAMP-Pools bei, in denen der Botenstoff in abgegrenzten subzellulären Kompartimenten eingeschlossen ist, sondern sie regulieren auch die cAMP-Konzentrationen innerhalb einzelner Kompartimente (McCormick et al. 2014). Zum Beispiel befindet sich PDE3A in der Nähe zum SR, PDE3B hingegen bindet an T-Tubuli in der Nähe von Mitochondrien (Movsesian et al. 2018). Die spezifische subzelluläre Lokalisation der Enzyme stellt also einen fundamentalen Mechanismus für die lokale Regulierung der Konzentration, Dauer und Spezifität von cAMP-anhängigen Signalen dar. Ohne diese PDE-abhängigen cAMP-Pools würde

jede Stimulation eines Rezeptors mit Adenylatzyklaseaktivierung zu einer gleichmäßigen Erhöhung der Botenstoffe führen. In der Folge würden die PKAs in allen Bereichen der Zelle aktiviert werden und die Signalspezifität wäre nicht mehr gewährleistet (McCormick et al. 2014, Conti und Beavo 2007). AKAPs sind Proteine, die PKA an spezifischen subzellulären Stellen binden und so dazu beitragen, die cAMP-Signalgebung spezifisch und physikalisch getrennt zu halten. AKAPs organisieren sich innerhalb desselben makromolekularen Komplexes mit G- Protein- gekoppelten Rezeptoren, AC, PDEs, PKA und deren Zielproteinen, und sorgen für selektive Phosphorylierungen und enge lokale Regulation des Signals (Kritzer et al. 2012).

Die Menge, Aktivität und Lokalisation von PDEs kann bei Herzerkrankungen wie Herzinsuffizienz oder Arrhythmien verändert sein (Abi- Gerges et al. 2009, Chan und Chan 2017, Lehnart et al. 2005, Movsesian et al. 2018).

Tabelle 1: Struktur und Domänen der PDE-Isoenzyme

Tabellarische Übersicht der PDE-Isoformen mit Substratspezifität, Modulatoren, Einfluss der Proteinkinase A (PKA) und Hemmstoffen. Konzentrationen (nM), die zu einer 50%igen Hemmung der PDE-Aktivität führen, aus (a) Maurice et al. 2014, (b) Zoraghi et al. 2006, (c) Bethke et al. 1991, (d) Wang et al. 2000, (e) Soderling et al. 1999, (f) D'Andrea et al. 2005, (g) keine Hemmung, Hayashi et al. 1998, (h) 20%igen Hemmung bei 100 µM IBMX, Wang et al. 2003 und (i) Bender und Beavo 2006. Die Pfeile aus der Reihe cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) bedeutet, dass PDEs durch PKA phosphoryliert und aktiviert werden. Zyklisches AMP (cAMP), Zyklisches GMP (cGMP), erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine hydrochlorid (EHNA), 3-isobutyl-1-methyl-xanthin (IBMX).

PDE Isoformen (Herz)	Substrat	PKA	Modulatoren	Hemmstoffe (IC 50 nM)
PDE 1	cAMP cGMP	↑	Calcium und Calmodulin (↑)	IBMX (15300) ^c
PDE 2	cAMP cGMP		cGMP (↑)	EHNA (0,8) ^a IBMX (26200) ^c
PDE 3	cAMP cGMP	↑	cGMP (↓)	Cilostamid (50) ^a Milrinon (150) ^c IBMX (5600) ^c
PDE 4	cAMP	↑		Rolipram (1000) ^a Rofluminast (0,6) ^a IBMX (5800) ^c
PDE 5	cGMP			Sildenafil (5) ^a IBMX (3500) ^b
PDE 7	cAMP			IBMX (5000) ^d
PDE 8	cAMP			- ^g
PDE 9	cGMP			- ^h
PDE 10	cAMP cGMP			IBMX (2600) ^e
PDE 11	cAMP cGMP			IBMX (26000) ^f

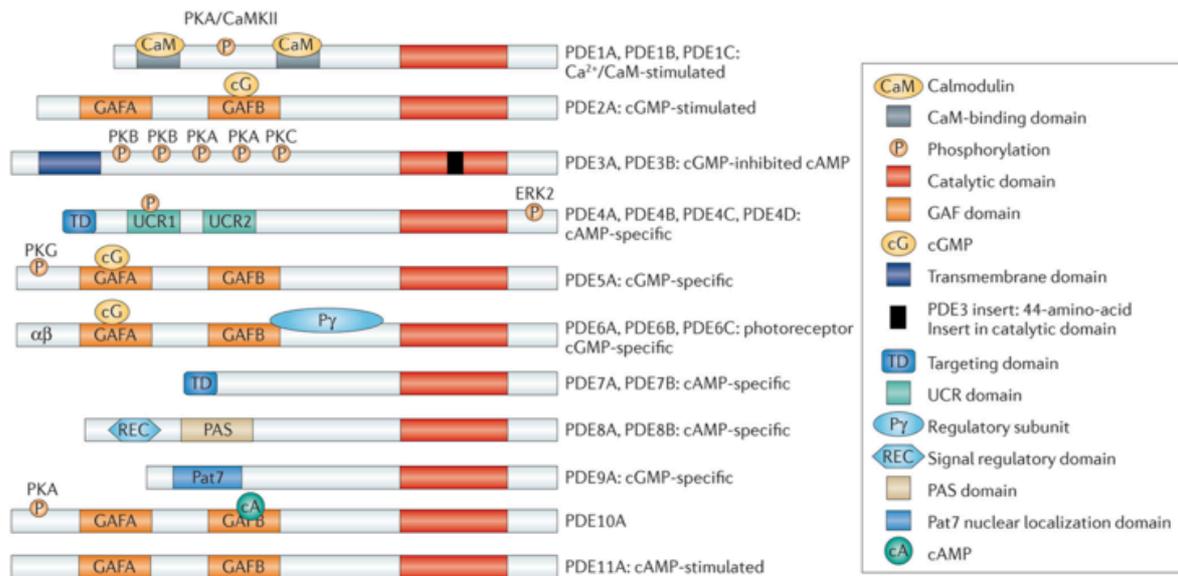


Abb. 2: Struktur und Domänen der PDE-Isoenzyme

Die katalytische Domäne befindet sich im carboxy-terminalen Teil der PDEs. Die katalytische Domäne von PDE 3 beinhaltet eine einzigartige 44-Aminosäure-Insertion. Die PDE Familien besitzen Amino-terminale Subdomänen (GAF- Domänen, Transmembran Domänen, Ziel-Domänen, upstream conserved regions (UCR), PAS-Domänen und REC Domänen) und N- terminale hydrophobe Regionen, die für die subzelluläre Lokalisation, Einbau der PDEs in kompartimentierte Signalwege, Wechselwirkung mit Signal- und Gerüst-Molekülen und für die Regulation der PDE-Aktivität von Bedeutung sind. GAF-Domänen regulieren die allosterische Bindung zu cGMP (PDE 2, PDE 5 und PDE 11), die allosterische Bindung zu cAMP (PDE 10), und die Regulation der katalytischen Aktivität (PDE 2, PDE 5 und PDE 6). Die Phosphorylierungsstellen sind schematisch abgebildet. CaMKII, Calcium/Calmodulin- abhängige Proteinkinase II; ERK2, extrazelluläre Signal-regulierte Kinase 2; PKA, Proteinkinase A; Pat7, 7-residue nuclear localization signal. (nach Maurice et al. 2014).

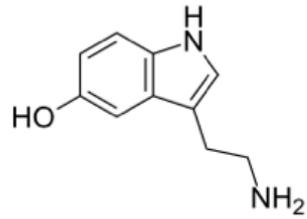
1.4.1 Phosphodiesterase-Inhibitoren

Um die Rolle von PDE 2, 3 und 4 hinsichtlich Inotropie und Chronotropie im Herzen zu analysieren, sind spezifische PDE-Hemmstoffe verwendet worden. Um Interpretation und einen Vergleich zu erleichtern, orientiert sich diese Arbeit an früheren Studien wie bspw. Afzal et al. (2008). Es sind Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine hydrochloride (EHNA), Cilostamid und Rolipram als spezifische PDE-Hemmstoffe jeweils einzeln und in Kombination verwendet worden. EHNA ist ein PDE2-Hemmstoff, Cilostamid ist ein PDE3-Hemmstoff und Rolipram ist ein PDE4 Hemmstoff. Als unselektiver PDE Hemmstoff wurde 3-Isobutyl-1-methyl-xanthin (IBMX) eingesetzt (Maurice et al. 2014). In der Abb. 3 sind 5-HT, cAMP, inaktives 5'AMP und die PDE-Hemmstoffe in der Strukturform zu sehen.

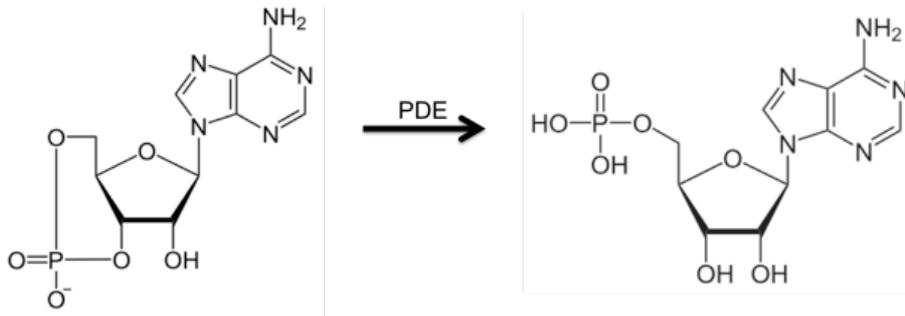
Das Modulieren eines bestimmten cAMP-Pools durch einen pharmakologischen Hemmstoff, bietet die Möglichkeit, einen spezifischen Effekt zu erzielen. Es wird erwartet, dass eine PDE-Hemmung den jeweiligen cAMP- abhängigen Effekt potenziert.

A

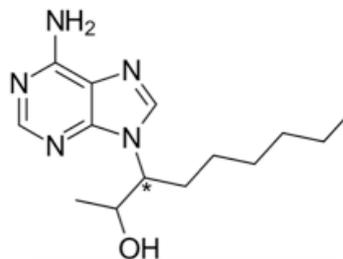
Serotonin

**B**

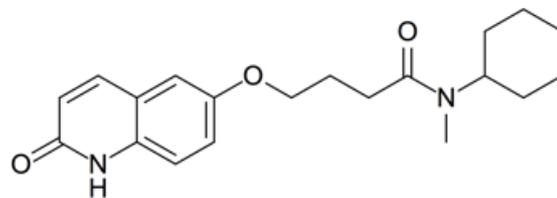
cAMP → 5'AMP

**C**

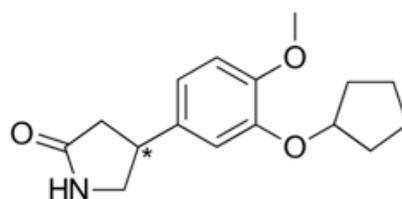
Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine hydrochloride (EHNA, PDE2-Hemmstoff)



Cilostamid (PDE3-Hemmstoff)



Rolipram (PDE4-Hemmstoff)



3-Isobutyl-1-methyl-xanthin (IBMX, unselektiver PDE-Hemmstoff)

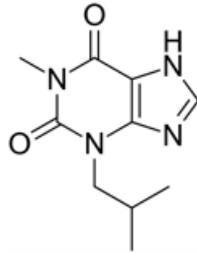


Abb. 3: Strukturformeln

(A) Serotonin (5-HT, 5-Hydroxy-tryptamin)

(B) zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) wird durch Phosphodiesterasen (PDE) zu inaktiven Adenosin-5'-monophosphat (5'AMP) abgebaut.

(C) Darstellung verwendete PDE-Hemmstoffe; *Erythro*-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine hydrochlorid (EHNA), Cilostamid, Rolipram, 3-Isobutyl-1-methyl-xanthin (IBMX), * = Kennzeichnung chirales Zentrum bei Enantiomeren

1.5 Transgenes Mausmodell

Im Herzmuskelgewebe von Mäusen konnten keine funktionellen 5-HT-Rezeptoren nachgewiesen werden. Um den humanen 5-HT_{4a}-Rezeptor genauer untersuchen zu können, wurde eine transgene Mauslinie verwendet, die den 5-HT_{4a}-Rezeptor überexprimiert (Gergs et al. 2010). Dieses Modell lässt zu, daß der humane Rezeptor in vivo untersucht werden kann. Es wurden Experimente an elektrisch gereizten linken Vorhöfen und spontan schlagenden rechten Vorhöfen mit komplettem Sinusknoten durchgeführt. Es lassen sich Aussagen über Kontraktionskraft und Frequenz unter Basalbedingungen, nach Zugabe von 5-HT allein, nach Zugabe der jeweiligen PDE-Hemmstoffe und von 5-HT in Anwesenheit der PDE-Hemmstoffe machen. Als Kontrollgruppe dienen die Wildtyp-Geschwistertiere, die keine Antwort auf 5-HT zeigen (Gergs et al. 2010; 2013).

Anders als z.B. bei menschlichen Herzmuskelpräparaten, konnten hier standardisierte Bedingungen eingehalten werden. Einflüsse durch Vorerkrankungen oder Vormedikation können in dem hier genutzten Versuchsmodell ausgeschlossen werden.

Der 5-HT-Rezeptor-Subtyp kann bei der Übertragung des positiven inotropen Serotonineffektes zwischen den Spezies variieren, was die Übertragbarkeit der Ergebnisse von Tierexperimenten auf den Menschen erschwert (Hoyer et al. 2002). Es wurden Unterschiede in der Aminosäuresequenz u.a. des C-terminalen Endes des 5-HT_{4a}-Rezeptors zwischen Schwein und Mensch festgestellt (De Maeyer et al., 2008). Diese Arbeit orientiert sich an früheren Studien, jedoch wird hier einzig der humane 5-HT_{4a}-Rezeptorsubtyp in gesundem Vorhofmyokard transgener Mäuse untersucht.

1.6 Klinische Relevanz und Zielsetzung der Arbeit

5-HT und seine Signalwege beeinflussen die Entstehung und den Verlauf von Krankheiten. Insbesondere die 5-HT₄-Rezeptoren könnten von pathophysiologischer Relevanz bei insuffizienten Herzen sein (Afzal et al. 2008). PDEs haben Einfluss auf die Regulation der durch 5-HT₄-Rezeptorstimulation ausgelösten Signalwege. Das Verständnis über die Funktionsweise der verschiedenen PDE-Isoformen kann Hinweise über Genese und Verlauf von Krankheiten geben. PDE-Isoformen sind aufgrund ihrer spezifischen Verteilung in verschiedenen Geweben, auf zellulärer sowie subzellulärer Ebene von besonderem Interesse als therapeutische Zielstrukturen. Heute werden mehrere PDE-Hemmstoffe unter bestimmten Voraussetzungen klinisch eingesetzt. Milrinon, ein PDE3-Hemmstoff wird in der Behandlung der terminalen Herzinsuffizienz verwendet. Durch das Auftreten von Herzrhythmusstörungen und erhöhten Mortalität bei längerer Anwendung ist Milrinon nur zur Kurzzeittherapie zugelassen (Packer et al. 1991). Ein weiterer beliebter Calcium-Sensitizer, aber auch PDE3-Hemmstoff ist Levosimendan, welcher ebenfalls in der Behandlung von Herzinsuffizienz im Endstadium eingesetzt wird (Orstavik et al. 2014). Rolipram und andere PDE4-Hemmstoffe wurden in der Therapie von Lungenerkrankungen wie chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) verwendet (Dal Piaz und Giovannoni 2000). Die am häufigsten angewendeten PDE-Hemmstoffe sind Sildenafil, Vardenafil und Tadalafil. Sie hemmen im Wesentlichen PDE5 und werden bei der erektilen Dysfunktion verschrieben (Lugnier 2006). Hier soll herausgefunden werden welche PDE-Isoformen (PDE2, PDE3, PDE4) den größten Einfluss auf die 5-HT₄-Rezeptor-vermittelten Effekte in elektrisch gereizten linken Vorhöfen und im Sinusknoten spontan schlagender rechter Vorhöfe haben.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Für die Experimente wurden transgene (TG) und Wildtyp-Mäuse (WT) verwendet. Die Versorgung erfolgte mit handelsüblichen Labortierfutter und Wasser ad libitum. Männliche und weibliche Tiere wurden getrennt gehalten. Das Durchschnittsalter der Wildtyp-Tiere betrug am Versuchstag 119,7 Tage und sie wogen im Mittel 35,2 Gramm; die transgenen Geschwistertiere waren im Durchschnitt 108,4 Tage alt und wogen 33,8 Gramm. Es wurden ähnlich viele männliche und weibliche Tiere verwendet.

2.2 Generierung 5-HT_{4a}-Rezeptor überexprimierender Mäuse

Es wurde eine transgene Mauslinie mit herzspezifischer Überexpression des humanen 5-HT_{4a}-Rezeptor verwendet. Die kodierende Sequenz des 5-HT_{4a}-Rezeptors wurde durch RT-PCR aus humanen Herzmuskelzellen isoliert und durch die Restriktionsendonukleasen KpnI und SacI aus dem PCR-Produkt herausgeschnitten (Abb. 6B) und folgend die cDNA in eine Expressionskassette eingefügt. Die Expressionskassette enthält den Promotor der α -Isoform der schweren Kette des Myosins (α -MHC) der Maus. Die Transkription des Rezeptors war somit unter gewebsspezifischer Kontrolle dieses Promotors. Zur Terminierung der Transkription enthielt die Expressionskassette eine Simian Virus 40 (SV40)-Poly-A-Signalsequenz (Gergs et al. 2010).

Diese α -MHC-5-HT_{4a}-Expressionskassette war in befruchtete Eizellen von FVB/N-Mäusen injiziert worden. An den entstandenen transgenen Mäusen konnte eine herzspezifische Überexpression des 5-HT_{4a}-Rezeptors nachgewiesen werden. Abschließend wurden die Tiere in einen CD1-Hintergrund eingekreuzt (Gergs et al. 2010).

2.3 Genotypisierung

2.3.1 Extraktion und Isolation der DNA

Zur Genotypisierung wurden den Versuchstieren im Alter von vier Wochen etwa 5 mm der Schwanzspitze mittels Skalpell entfernt. Durch Ohrmarkierungen konnte die sichere Zuordnung der Mäuse gewährleistet werden.

Der enzymatische Abbau der Biopsien erfolgte im Eppendorf-Thermomixer bei 55°C über 12 Stunden. Das Reaktionsansatz enthielt 700 μ l TE/SDS-Puffer und 30 μ l Proteinase K. Die Gewinnung der genomischen DNA aus dem Lysat erfolgte mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (modifiziert nach Sambrook und Russel, 2000). Nach mehrfacher Behandlung mit Phenol und

Chloroform, bildet sich eine obere wässrige Phase und eine untere organische Phase. Die obere Phase enthält dabei die DNA, während die untere Phase Proteine und Verunreinigungen enthält. Nach enzymatischem Abbau der Schwanzspitzen wurden 700 µl wassergesättigtes Phenol zugegeben und gut vermischt. Durch Zentrifugation bei 14000 rpm für drei Minuten bildeten sich zwei Phasen. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß gefüllt, die untere Phase wurde verworfen. Es folgte die Zugabe und das Vermischen von 700 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) sowie erneute Zentrifugation bei 14000 rpm für drei Minuten. Erneut wurde die obere Phase entnommen und nun mit 70 µl Natriumacetat und 770 µl reinem Ethanol versetzt, um die DNA aus dem Gemisch auszufällen und von den Phenolresten zu reinigen. Anschließend wurde das Lysat bei 14000 rpm für zehn Minuten zentrifugiert, um die DNA zu sedimentieren. Das Sediment wurde vom Überstand getrennt und mit 1 ml 70%igen Ethanol gewaschen und wiederum bei 14000 rpm für zehn Minuten zentrifugiert. Danach wurde das entstandene Sediment bei ca. 30°C im Heizblock getrocknet. Abschließend wurde die DNA mit 50 µl TE-Puffer für 15 Minuten bei 65 °C inkubiert. Die weitere Aufbewahrung bis zur Weiterverwendung erfolgte bei 4°C.

2.3.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde mit einem Biophotometer (Eppendorf) bestimmt. Als Kontrollwert diente eine Leerwertmessung ohne DNA. Die Bestimmung der DNA-Konzentration der Probe erfolgte durch Messung der Extinktion bei 260 nm (E_{260}). Bei einer Messküvette mit 10mm Dicke und einem OD_{260} -Messwert von 1,0 enthält die Probe 50 µg/ml doppelsträngige DNA. Die Berechnung für den DNA-Gehalt erfolgt mit der Formel $E_{260} \times 50 \text{ µg/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor} = X \text{ µg/ml}$. Eine Aussage über Qualität der Probe erfolgt durch Berechnung des Quotienten aus der OD_{260} zur OD_{280} , Werte zwischen 1,8 und 2,0 weisen auf eine hohe Reinheit der DNA hin.

2.3.3 PCR-Amplifikation

Die Vervielfältigung der gesuchten DNA-Sequenz erfolgte durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die DNA wird in einem Versuchsgefäß mit einem speziellen Reaktionsansatz zusammengeführt. In den jeweiligen Proben war ein PCR-Puffer mit 1,5 mM Magnesiumchlorid, 200 µM dNTP-Mix, jeweils 1 µM forward- und reverse-Primer und 2,5 U einer thermostabilen Taq-DNA-Polymerase enthalten (s. Anhang). Reinstwasser wurde zur Auffüllung bis 50 µl verwendet. Das nachzuweisende PCR-Produkt hatte eine Größe von 508 bp.

2.3.4 Agarosegelelektrophorese

In der Agarosegelelektrophorese werden zu trennende elektrisch geladene Moleküle aufgrund verschiedener Laufgeschwindigkeit in einem Gel unter Einfluss eines elektrischen Feldes beurteilt. Kleinere Moleküle wandern im Gel weiter als größere Moleküle. Es werden Marker zur Beurteilung der Länge der DNA-Fragmente, eine positive und negative Kontrolle verwendet. Für die Auftrennung des PCR-Produktes wurde ein 1%iges Agarosegel mit einer TAE-Pufferlösung benutzt. Alle Proben wurden mit 8 µl Ladepuffer (s. Anhang) versehen und in die vorgesehenen Taschen im Gel eingefüllt. Für ca. 45 Minuten wurde eine konstante Spannung von 80 mV angelegt. Danach wurde eine Färbung mit Ethidiumbromid vorgenommen. Das Ergebnis der Genotypisierung konnte so unter UV-Licht beurteilt und fotografisch dokumentiert werden. In Abb. 6A ist ein Ergebnis der Agarosegelelektrophorese gezeigt.

2.4 Versuchsaufbau

2.4.1 Das Organbad

Für jede Versuchsreihe wurde eine sogenannte Tyrode-Lösung frisch vorbereitet, um für die präparierten Vorhöfe ein physiologisches Milieu zu schaffen. Diese Tyrode-Lösung setzte sich aus drei verschiedenen Stammlösungen in genau definierter Konzentration (s. Anhang) zusammen und wurde mittels Aqua bidest. auf 1 Liter aufgefüllt. Es folgte die kontinuierliche Begasung mit Carbogen (95 % O₂ und 5 % CO₂), nach 30 Minuten wurden 0,8 ml Calciumchlorid-Lösung (33,2 g CaCl₂/100 ml H₂O), 49,3 mg Ascorbinsäure, 19 mg Na₂EDTA und 1 g Glucose hinzugefügt.

2.4.2 Die Messanlage

Die Messanlage (Abb. 4) für die Kontraktionsversuche bestand aus doppelwandigen Organbädern, welche jeweils eine Haltevorrichtung für einen präparierten Vorhof bieten. Der innere Teil mit einem Volumen von 10 ml war für die präparierten Vorhöfe vorgesehen und wurde mit Tyrode-Lösung aufgefüllt. Die Carbogenbegasung war am unteren Teil des Bades angesetzt. Der äußere Teil des doppelwandigen Organbades war Teil eines beheizbaren Wasserkreislaufes, so dass die Temperatur im Organbad stetig bei 37°C gehalten werden konnte.

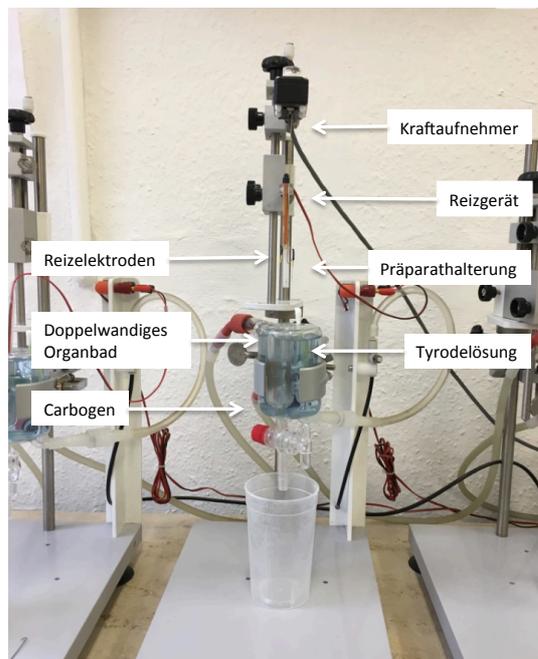
Die präparierten Vorhöfe konnten an den vorgesehenen Befestigungsdrähten angebracht und in das Organbad eingetaucht werden. Die Kontraktionskraft wurde über den oberen Befestigungsdraht auf einen Kraftaufnehmer übertragen und dessen Signale über einen Brückenverstärker verstärkt und letztendlich zum Schreiber geleitet. Der Schreiber wurde auf 5 mm pro Minute eingestellt und konnte bei Bedarf auf 100 mm pro Sekunde erhöht werden, dies diente der Darstellung einer

Einzelkontraktion. Nach Eintauchen der Haltevorrichtung in die Tyrode, hing das Präparat genau zwischen zwei Reizelektroden.

Bei Versuchen mit linken Vorhöfen wurde das Präparat mit einer Frequenz von 1 Hz und Impulsdauer von 5 ms elektrisch stimuliert. Die angelegte Spannung lag bei ca. 10 % über der Reizschwelle. Die Kontraktionskraft konnte so gemessen und über den Schreiber ein Mechanogramm angefertigt werden. Bei Versuchen mit rechten Vorhöfen und intaktem Sinusknoten und Reizleitungssystem war keine elektrische Stimulation notwendig. Es kam zu einer spontanen Kontraktion des Präparates und die Schlagfrequenz konnte gemessen werden.

Jeder Versuchsreihe ging eine Kalibrierung voraus. Ein Nullpunkt wurde festgelegt. Mit einem vorgegebenen Gewicht wurde eine Kraft von 5 mN erzeugt und der Ausschlag des Schreibers für zwei Empfindlichkeitsstufen dokumentiert. Die Kontraktionskraft der Präparate konnte so nachfolgend mit der Kalibrierung auf das vorgegebene Gewicht korreliert werden.

A



B

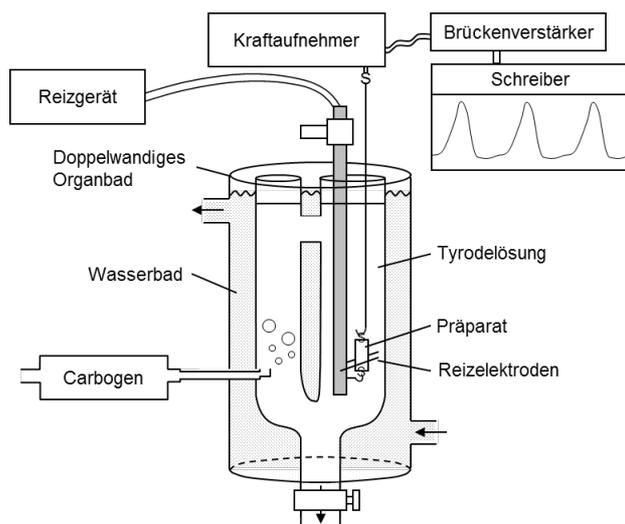


Abb. 4: Versuchsapparatur für Kontraktions- und Frequenzmessungen

(A) Foto Originalversuchsapparatur. Dargestellt ist ein doppelwandiges Organbad, welches im Inneren mit Tyrode-Lösung gefüllt ist. Die Begasung des Organbades erfolgt von unten durch Carbogen (95% O₂, 5% CO₂). Der äußere Anteil des Organbades ist Teil eines Wasserkreislaufes und dient der Temperaturerhöhung im Organbad auf 37°. Über dem Organbad ist die nicht eingetauchte Präparathalterung mit den zwei Reizelektroden zu sehen. Der obere Halterungsdraht ist am oberen Pol mit der Messkammer verbunden.

(B) Schematische Darstellung Versuchsapparatur. Abgebildet ist ein doppelwandiges Organbad mit dem aufgehängten Muskelpräparat, den Reizelektroden, dem Reizgerät, dem Kraftaufnehmer, dem Brückenverstärker und dem Schreiber. Der Schreiber zeichnet die Muskelkontraktionen als Mechanogramm auf. Die Tyrodelösung im Organbad wird mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast und durch den Wassermantel in der Doppelwand des Organbades auf 37°C temperiert (modifiziert nach Frenker 2013).

2.4.3 Organentnahme und Präparation der Herzen

Zu Beginn eines Versuchs wurden als Thromboseprophylaxe 500 IE Heparin und zur Narkotisierung gewichtsabhängig (50-75 mg/kg Körpergewicht) Pentobarbital i.p. injiziert. Bei Eintritt der vollen Narkose erfolgte die Fixierung an den peripheren Extremitäten. Mit spitzer und stumpfer Präparation wurde schichtweise der knöcherne Thorax freigelegt. Mit der Schere wurden beidseits die Rippen vom Sternum gelöst. Danach ließ sich das Sternum problemlos nach kranial umklappen und ermöglichte so eine freie Sicht auf das Herz. Die zu- und abführenden Gefäße wurden mit der Schere vorsichtig durchtrennt und das Herz konnte entnommen und rasch in ein mit Tyrode-Lösung gefülltes Gefäß überführt werden. Das im Herzen verbliebene Blut wurde durch leichte Kompression und Eigenkontraktion hinausgespült.

Die Präparation der rechten und linken Herzvorhöfe erfolgte auf einer ebenfalls mit Tyrode-Lösung gefüllten und mit Carbogen begasten Präparierschale. Während der gesamten Präparation war äußerste Sorgfalt geboten, um den sensiblen Sinusknoten und die Herzmuskelfasern nicht zu schädigen. Rechter und linker Vorhof wurden komplett vom restlichen Herzen und Geweberesten freigelegt. Am oberen und unteren Pol der Präparate wurden kleine Häkchen für die Haltevorrichtung angebracht. Anschließend konnte das vorsichtige Einhängen in der Versuchsanordnung erfolgen.

2.5 Versuchsdurchführung

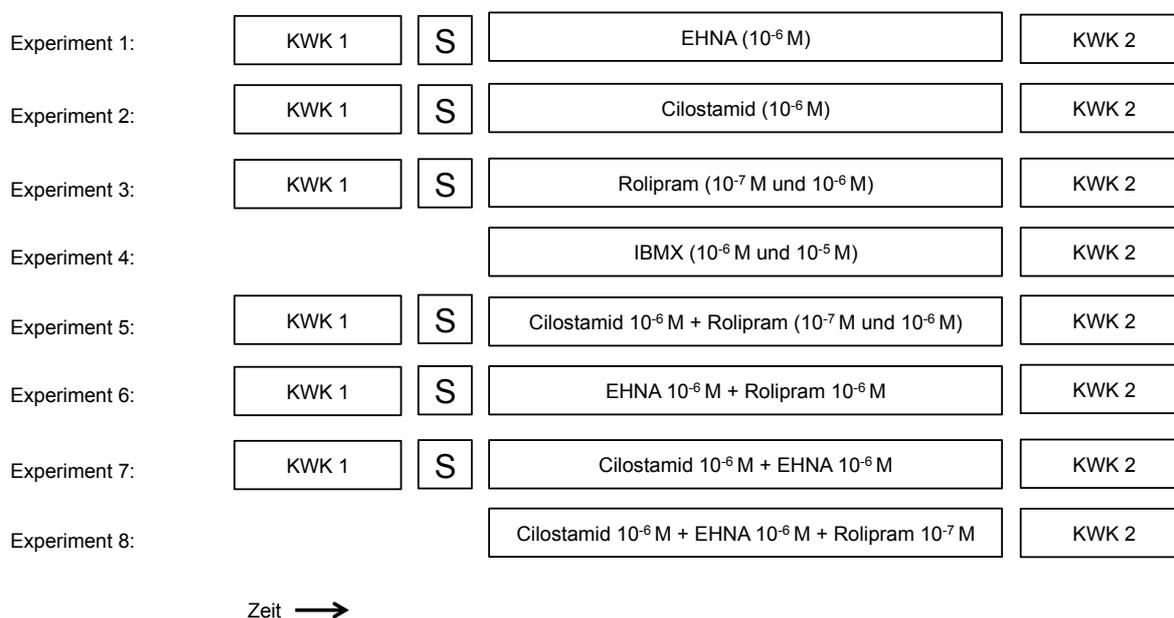
Der Versuchsablauf der jeweiligen Experimente ist in Abb. 5 dargestellt. Es wurden jeweils transgene Tiere und Wildtyp-Tiere verwendet. Nach Einhängen der rechten und linken Vorhöfe in das Organbad wurden diese manuell vorgespannt. In den ersten 30 Minuten erfolgte alle 10 Minuten ein Badwechsel mit 10 ml frischer Tyrode-Lösung. Wenn sich hier bereits Arrhythmien der Vorhöfe darstellten, die durch das dreimalige Spülen und Korrigieren der Vorspannung nicht sistierten, musste von einer Schädigung der Präparate ausgegangen werden. Diese Präparate wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt. Nach Einstellen einer stabilen Kraft- und Schlagfrequenz war die Versuchsvorbereitung abgeschlossen.

Zu Beginn wurde die erste 5-HT-Konzentrations-Wirkungskurve (KWK 1) erhoben. Sie begann mit Zugabe von 10^{-10} M Serotonin und wurde kumulativ (3×10^{-10} M, 10^{-9} M, 3×10^{-9} M, 10^{-8} M, etc.) alle 5 Minuten bis zu einer maximalen Konzentration von 10^{-6} M erhöht. Nach der ersten KWK folgte das sogenannte Spülen: dreimalig wurde alle 5 Minuten die 10 ml Tyrode-Lösung im Organbad vollständig ausgewechselt. Das sogenannte Spülen dient dem Auswaschen der zuvor verwendeten Substanzen. Anschließend konnte der jeweilige PDE-Hemmstoff oder die PDE-Hemmstoff Kombination in das Organbad pipettiert werden. Die Konzentration der PDE-Hemmstoffe ergab sich

aus Vorexperimenten und Studien anderer Forschungsgruppen. EHNA und IBMX wurden als Racemat verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurde eine zweite 5-HT-Konzentrations-Wirkungskurve (KWK 2) erhoben (Abb. 5).

Abb. 5: Schematische Darstellung der Experimente

Die Experimente wurden mit einer Konzentrations-Wirkungskurve (KWK 1) mit Serotonin in 10er Schritten von 10^{-10} M bis 10^{-6} M begonnen. Es folgte das sogenannte Spülen (S), dreimaliger Wechsel der 10 ml Tyrode-Lösung im Organbad alle 5 Minuten. Dann die Zugabe der PDE-Hemmstoffe in genau definierter Konzentration. Nach einer Einwirkzeit von 30 Minuten wurde erneut eine Konzentrations-Wirkungskurve (KWK 2) mit Serotonin in gleicher Weise erhoben. *Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine hydrochloride* (EHNA); 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX)



2.6 Statistik

Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Daten handelt es sich um Mittelwerte und zugehörigen positiven und negativen Standardfehlern (SEM). Für die statistische Signifikanz wurden je nach Fragestellung der verbundene und unverbundene t-Test nach Student sowie die Varianzanalyse ANOVA mit folgender Fehlertestung nach Bonferroni verwendet. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant gewertet. Für die Auswertung der Daten und Ermittlung der EC_{50} -Werte wurde das Programm GraphPad Prism 5.0 für Windows (GraphPad Inc., San Diego, USA) verwendet. Die Anzahl der einzelnen Versuche ist mit einem „n“ bezeichnet.

2.7 Anhang

Puffer und Lösungen

Alle Chemikalien wurden in *pro analysi*-Qualität oder im besten kommerziell erhältlichen Reinheitsgrad verwendet. Soweit keine anderen Angaben gemacht werden, wurde das für Puffer und Lösungen verwendete Wasser als Reinstwasser (18 Ohm) aus einer Wasseraufbereitungsanlage gewonnen.

Genotypisierung der Versuchstiere

Proteinase K-Lösung	Proteinase K 10 mg/ml
TE/SDS-Puffer	Tris HCl 50 mM, EDTA 100 mM, SDS 0,5 %, pH 8,0; Sterilisierung durch Autoklavieren
TE-Puffer	Tris HCl 10 mM, EDTA 0,25 mM; Sterilisierung durch Autoklavieren
Natriumacetat-Lösung	Natriumacetat 3 M, pH 6,0
DEPC-Wasser	DEPC 0,1 % (V/V)
dNTP-Mix	
Agarosegel	Agarose 1 %, TAE-Puffer, Ethidiumbromid 0,01 %
TAE-Puffer	Tris Base 1,99 M, Eisessig 0,99 M, EDTA 59,5 mM
Ladepuffer	TAE-Puffer 50 %, Glycerol 50 %, Bromphenolblau

Kontraktionskraft- und Frequenzmessungen an Mausvorhöfen

Tyrode

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

Glucose	5,05 mM
Ascorbinsäure	0,28 mM
Na ₂ -EDTA	0,05 mM
pH 7,4	

Verwendete Substanzen

Agarose, Typ SeaKem	FMC bioproducts, Philadelphia, USA
L (+) – Ascorbinsäure	Merck, Darmstadt
CaCl ₂ x 2H ₂ O	Merck, Darmstadt
Chloroform	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNA-Leiter GeneRuler™	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
dNTP	MBI Fermentas, Heidelberg
Essigsäure 100 %	Merck, Darmstadt
Ethanol 100 %	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Fluka Chemie GmbH, Neu-Ulm
Glucose	Merck, Darmstadt
Heparin	Biochrom AG, Berlin
Isoamylalkohol	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Isoprenalin	Sigma-Aldrich, Steinheim
KCl	Roth, Karlsruhe
MgCl ₂ x 6H ₂ O	Merck, Darmstadt
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
Pentobarbital	Spofa, Prag, Tschechien
Phenol	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Steinheim
Serotonin	Sigma-Aldrich, Steinheim
PCR-Puffer, 15 mM MgCl ₂	Ampliqon, Odense, Dänemark
Taq-DNA-Polymerase	Ampliqon, Odense, Dänemark
HCl	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)	Fluka AG, Buch

Geräte und Bezugsquellen

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

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

Biophotometer; Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

Elektrophoresekammer Typ Horizon 58; Life Technologies, Gaithersburg, USA

Waage Typ AT261 DeltaRange; Mettler Instruments GmbH, Gießen

pH-Meter; WTW GmbH, STH 600, Weilheim

Kontraktionskraftmessanlage (Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim)

- Verstärker und integrierter Schreiber (Graphtec, Linearcorder mark, VII, WR 3101)
- Reizgerät mit 4 Kanälen (ELV Takt- und Impulsgenerator TIG 7000)
- Wärmebad (CS Lauda)
- 4 Transducer (Kent, Scientific corporation, Isometric Transducer)
- 4 Doppelwandgefäße, 4 Stative, 4 Elektroden, Halterungsstäbe, Haken

Prism 5; GraphPad Software, San Diego, USA

Primer

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

ACC CTT ACC CCA CAT AGA CC

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

AAA CAC CTC CCC ATA AAT CC

PCR-Programm

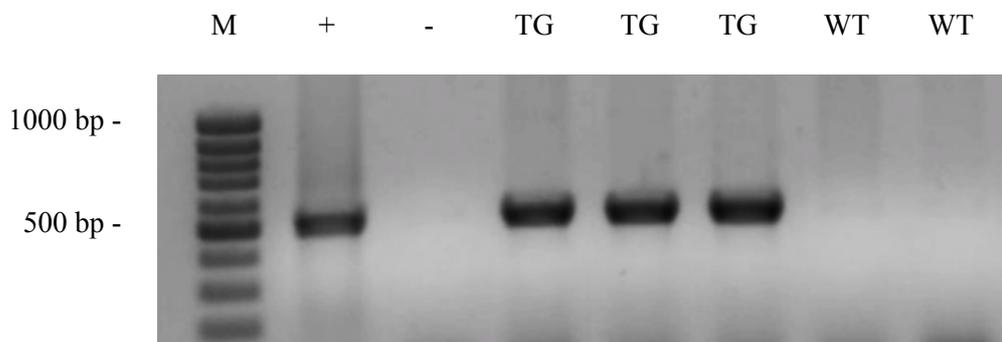
Denaturierung	94 °C	2 min	1 Zyklus
Denaturierung	94 °C	45 s	30 Zyklen
Annealing	56 °C	15 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Elongation	72 °C	10 min	1 Zyklus

3 Ergebnisse

3.1 Genotypisierung

Das 5-HT_{4a}-Rezeptor-Transgen wurde in die Maus-DNA integriert. Zur Kontrolle, ob es sich bei den Tieren um Träger des humanen 5-HT_{4a}-Rezeptorgens im Genom handelt, wurde aus Schwanzspitzen der Tiere die genomische DNA extrahiert und eine PCR durchgeführt (s. 2.3.1 und 2.3.3). Das Ergebnis einer Genotypisierung ist exemplarisch in Abb. 6 aufgeführt. Mit einem Photometer wurde der Reinheitsgrad der DNA überprüft. Hierzu wurde die optische Dichte bei 260 nm und 280 nm gemessen und anschließend wurde aus beiden Werten der Quotient gebildet. Bei allen Kontrollen konnte ein hoher Reinheitsgrad der DNA nachgewiesen werden.

A



B

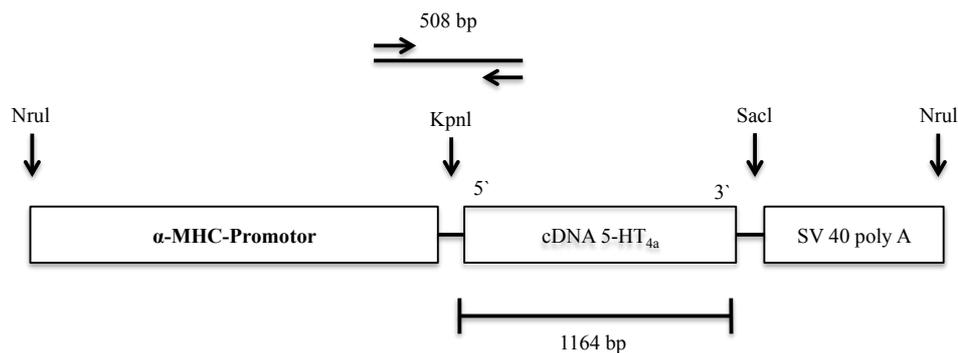


Abb. 6: Genotypisierung

(A) Es ist ein beispielhaftes Ergebnis der Agarosegelelektrophorese dargestellt. Mittels PCR wurden zuvor die DNA-Proben der Versuchstiere vervielfältigt und auf das Gel aufgetragen. In der Agarosegelelektrophorese werden die DNA-Fragmente nach ihrer Größe getrennt. Die gesuchte DNA-Sequenz hat eine Größe von 508 bp. Am linken Rand lief eine 100 bp DNA-Leiter als Marker mit. Marker (M); Positivkontrolle (+); Negativkontrolle (-); transgene Mäuse (TG); Wildtyp-Mäuse (WT).

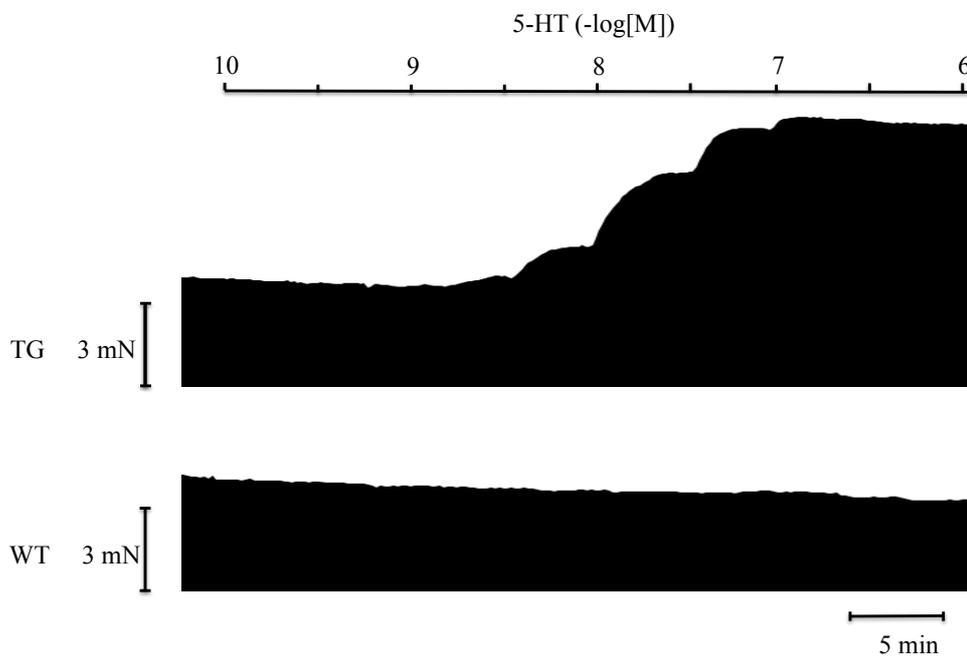
(B) Schematische Darstellung der α -MHC-5-HT_{4a}-Expressionskassette. Die Generierung einer Mauslinie mit herzspezifischer Überexpression des humanen 5-HT_{4a}-Rezeptors erfolgte mittels Injektion der α -MHC-5-HT_{4a}-

Expressionskassette in befruchtete Eizellen. Die entsprechende Sequenz für den humanen Rezeptor wurde durch die Restriktionsendonukleasen KpnI und SacI herausgeschnitten und folgend in die Expressionskassette eingefügt. Die Transkription stand unter gewebsspezifischer Kontrolle des α -MHC-Promotors der Maus. Die Terminierung erfolgte durch eine Simian Virus 40-Poly-A-Signalsequenz. Mit Hilfe von spezifischen Primern (s. Anhang) konnte das Transgen im Genom der Maus nachgewiesen werden.

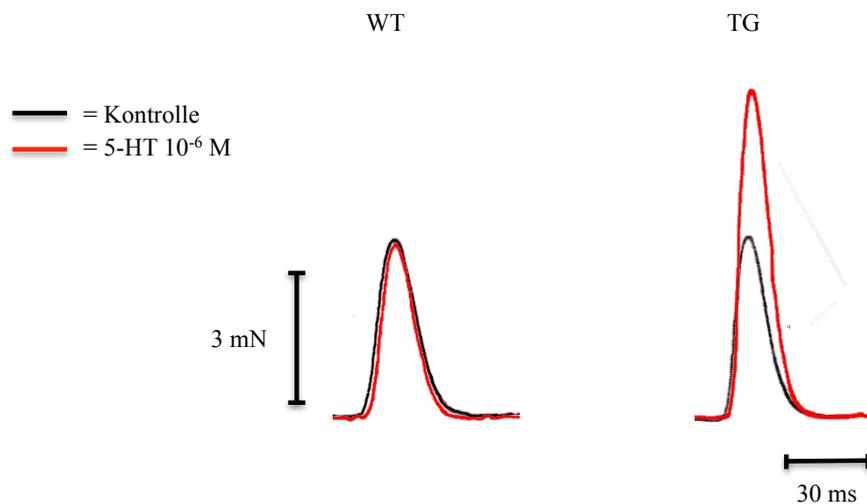
3.2 Kontraktionskraft- und Frequenzmessungen der Herzvorhöfe

Die Vorhöfe der Mäuse wurden, wie in 2.4.3 beschrieben, präpariert und entsprechend in die Organbäder eingehängt. Die gemessene Kraft der linken Vorhöfe und die Schlagfrequenz der rechten Vorhöfe wurden von einem Schreiber in Form eines Mechanogramms aufgezeichnet. Die Abb. 7 zeigt eine Auswahl repräsentativer Original- Mechanogramme.

A



B



C



Abb. 7: Repräsentative Mechanogramme der Reaktion von TG und WT auf Serotonin

(A) Mechanogramm der Kontraktionskraft eines elektrisch gereizten linken Vorhofs einer transgenen Maus (TG), die den 5-HT_{4a}-Rezeptor überexprimiert (oben) und einer Kontrollmaus (WT, unten). Auf 5-HT Zugabe erfolgt der schnelle und konzentrationsabhängige PIE in TG-Tieren, bei der Kontrolle (WT) tritt kein Effekt ein. Abszisse: Zeit in Minuten (min); Ordinate: Kontraktionskraft in Millinewton (mN).

(B) Einzelkontraktionen der elektrisch gereizten linken Vorhöfe von TG und WT unter Ausgangsbedingungen (Kontrolle) und nach 10⁻⁶ M 5-HT. Ordinate: Kontraktionskraft in Millinewton (mN).

(C) Einzelkontraktionen spontan schlagender rechter Vorhöfe unter Ausgangsbedingungen (Kontrolle) und bei maximaler 5-HT Konzentration (10⁻⁶ M) am Ende der Konzentrationswirkungskurve. Abszisse: Zeit in Sekunden (s); Ordinate: Kontraktionskraft in Millinewton (mN).

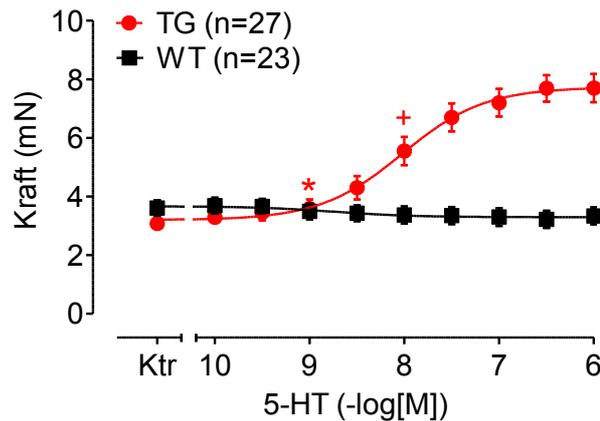
3.3 5-HT-Konzentrations-Wirkungskurve ohne PDE-Hemmstoffe

Die Ausgangslage der linken Vorhöfe und die Grundfrequenz der rechten Vorhöfe von TG-Mäusen wiesen keine Unterschiede gegenüber den WT-Mäusen auf. Die linken Vorhöfe von TG zeigten im Durchschnitt eine Kraft von $3,08 \pm 0,22$ mN (n=27) und die von WT $3,61 \pm 0,26$ mN (n= 23). Die spontane Basalfrequenz rechter Vorhöfe von TG lag bei 469 ± 16 bpm (n=20) und die von WT bei 438 ± 15 bpm (n=21).

Die linken Vorhöfe von TG reagierten auf 5-HT positiv inotrop (Abb. 8A). Ein exemplarisches Mechanogramm mit 5-HT-Effekten der linken Vorhöfe von WT und TG ist in Abb. 7A dargestellt. Der PIE war von der 5-HT-Konzentration abhängig ($-\log EC_{50} = 8,02 \pm 0,03$). Die Kontraktionskraft der linken Vorhöfe von WT zeigte keine Zunahme unter der 5-HT KWK (Abb. 8A). Die rechten Vorhöfe von TG reagierten konzentrationsabhängig positiv chronotrop (Abb. 7C und Abb. 8B). Die rechten Vorhöfe von WT zeigten keine Zunahme der Frequenz. Es zeigte sich sogar ein leichtes Abfallen der Frequenz im Verlauf der KWK, dieser Abfall war statistisch nicht signifikant.

Die Anspannungszeiten der linken Vorhöfe von TG verkürzten sich unter der 5-HT-KWK. Vor Beginn der 5-HT-KWK wurde im Durchschnitt eine Anspannungszeit von $29,1 \pm 0,73$ ms und bei der maximalen 5-HT-Konzentration $27,6 \pm 0,68$ ms gemessen (Tab. 3). Die Relaxationszeit der linken Vorhöfe von TG zeigte unter der 5-HT-KWK keine wesentlichen Veränderungen. Die WT-Tiere zeigten ebenfalls keine Veränderungen der Anspannungs- und Relaxationszeit unter der 5-HT-KWK (Tab. 3).

A



B

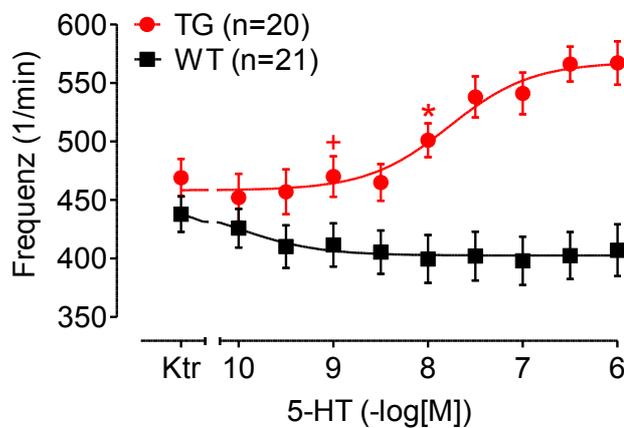


Abb. 8: 5-HT Konzentrationswirkungskurve ohne PDE-Hemmstoffe

(A) Effekt von 5-HT auf die Kontraktionskraft elektrisch gereizter (1 Hz) linker Vorhöfe von 5-HT₄-Rezeptor überexprimierenden Mäusen (TG, Kreise) und Wildtyp-Geschwistertieren (WT, Quadrate). Ktr = basale Kontraktionskraft vor Serotoninzugabe. Die Kontraktionskraft ist auf der Ordinate in Millinewton (mN) angegeben. Die Abszisse zeigt den negativen dekadischen Logarithmus der 5-HT Konzentration.

(B) Effekt von 5-HT auf die Frequenz spontan schlagender rechter Vorhöfe von TG (Kreise) und WT (Quadrate). Auf der Ordinate ist die Schlagfrequenz in Schlägen pro Minute (1/min) aufgetragen. Ktr = Grundschlagfrequenz vor Serotoninzugabe.

Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Experimente an. * = erster signifikanter Unterschied gegenüber Ktr ($P < 0,05$), + = erster signifikanter Unterschied gegenüber WT ($P < 0,05$).

3.4 Experimente mit einzelnen PDE-Hemmstoffen

3.4.1 EHNA

Die basale Kraft der linken Vorhöfe von TG vor Inkubation mit EHNA lag bei $3,06 \pm 0,6$ mN (n=5) und von der WT-Kontrollgruppe bei $3,4 \pm 0,27$ mN (n=5). Die basale Frequenz der rechten Vorhöfe von TG lag bei 458 ± 23 bpm (n=5) und von WT bei 396 ± 15 bpm (n=5).

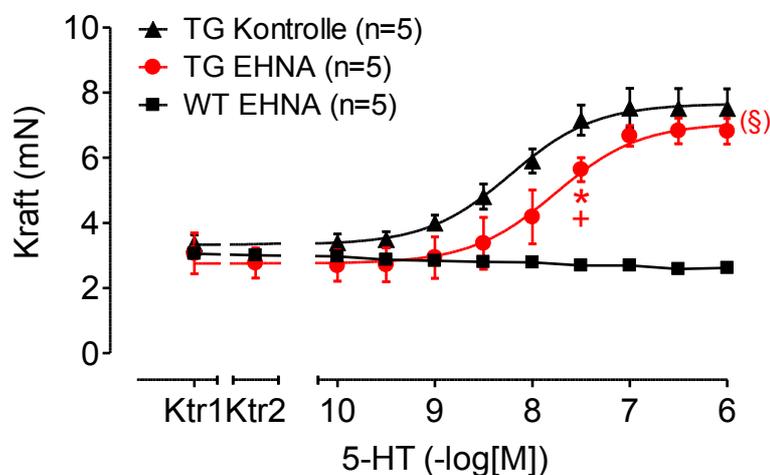
Die linken Vorhöfe von TG und WT zeigten nach dreißig-minütiger Inkubation mit EHNA $1\mu\text{M}$ keine Veränderung der Kontraktionskraft (Ktr2 vs. Ktr1 in Abb. 9A und Abb. 9B). Bei den rechten Vorhöfen von TG und WT kam es zu einem geringen Abfallen der Frequenz (Ktr2 vs. Ktr1 in Abb. 9C). Die Frequenzabnahme war allerdings statistisch nicht signifikant ($p = 0,08$). Ab einer Konzentration von 3×10^{-8} M Serotonin im Organbad stieg die Kontraktionskraft der linken Vorhöfe transgener Tiere bezogen auf Ktr2 an (Abb. 9A). In Abb. 9B ist die Konzentrations-Wirkungs-Kurve normalisiert auf die Ktr1 dargestellt. Die 5-HT KWK ohne einen PDE- Hemmstoff (Dreiecke) ist zusätzlich in den jeweiligen Abbildungen eingefügt (Abb. 9A und 9B).

Unter EHNA kam es zu einer signifikanten Verschiebung des PIE zu höheren 5-HT Konzentrationen (Abb. 9B, Kreise, $-\log EC_{50} = 7,56 \pm 0,01$, $p < 0,05$ vs. KWK ohne EHNA). Die linken Vorhöfe von WT reagierten nicht auf 5-HT.

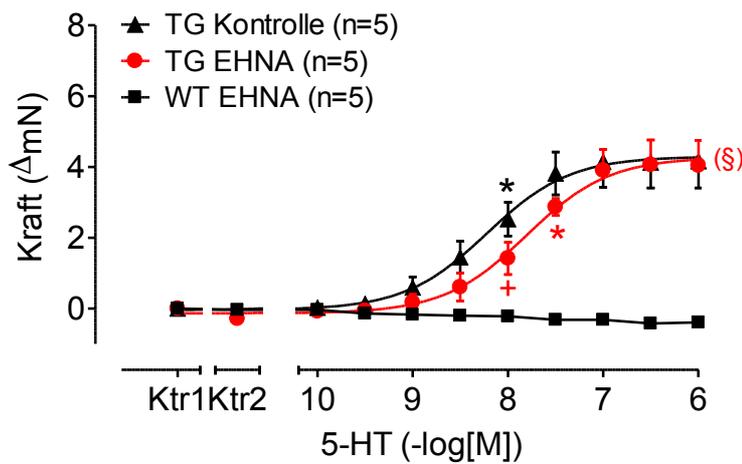
Die rechten Vorhöfe von TG reagierten positiv chronotrop und zeigten ab einer 5-HT-Konzentration von 3×10^{-8} M einen Frequenzanstieg in Bezug auf Ktr2 und gegenüber den WT-Tieren (Abb. 9C).

EHNA veränderte die Anspannungs- und Relaxationszeiten in linken Vorhöfen von TG und WT nicht (Ktr1 vs. Ktr2, Tab. 3). Unter der 5-HT-KWK kam es zu einer Verkürzung der Anspannungszeit der linken Vorhöfe von TG (Tab. 3A). Die Relaxationszeit verkürzte sich nicht signifikant. Die WT-Tiere zeigten keine 5-HT-abhängigen Veränderungen der Anspannungs- und Relaxationszeiten.

A



B



C

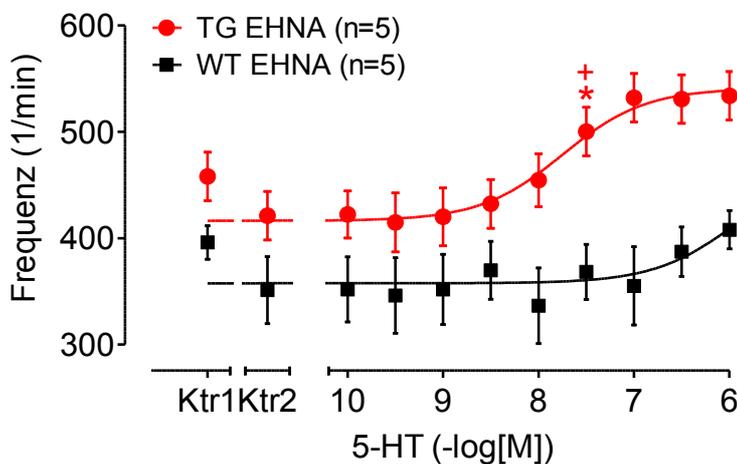


Abb. 9: EHNA

(A) Effekte von 5-HT alleine (Dreiecke) und in Gegenwart von $1\mu\text{M}$ *Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine hydrochlorid* (EHNA) auf die Kontraktionskraft elektrisch gereizter (1 Hz) linker Vorhöfe von 5-HT₄-Rezeptor überexprimierenden Mäusen (TG, Kreise) und Wildtyp-Geschwistertieren (WT, Quadrate). Ktr1 = basale Kontraktionskraft vor Inkubation mit EHNA. Ktr2 = Kontraktionskraft nach Inkubation mit EHNA. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der 5-HT-Konzentration, Ordinate: Kontraktionskraft Millinewton (mN).

(B) Auf Ktr1 normalisierte Effekte von 5-HT alleine (Dreiecke) und in Gegenwart von 10^{-6} M EHNA auf die Kontraktionskraft elektrisch gereizter (1 Hz) linker Vorhöfe von TG (Kreise) und WT (Quadrate). Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der 5-HT-Konzentration, Ordinate: Kontraktionskraft in delta-Millinewton (Δ mN).

(C) Effekte von 5-HT in Gegenwart von 10^{-6} M EHNA in spontan schlagenden rechten Vorhöfen von TG (Kreise) und WT (Quadrate). Ktr1 = basale Schlagfrequenz vor Inkubation mit EHNA. Ktr2 = Schlagfrequenz nach Inkubation mit EHNA. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der 5-HT Konzentration, Ordinate: Schlagfrequenz in Schlägen pro Minute (1/min).

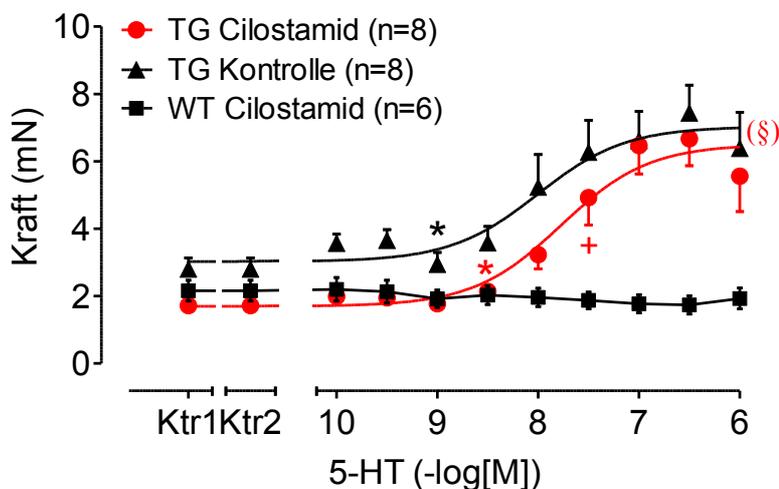
n = Anzahl der Experimente, * = erster signifikanter Unterschied gegenüber Ktr2 ($P < 0,05$), + = erster signifikanter Unterschied gegenüber WT ($P < 0,05$), § = signifikanter Unterschied vs. TG Kontrolle.

3.4.2 Cilostamid

Die basale Kontraktionskraft der linken Vorhöfe und die Schlagfrequenz der rechten Vorhöfe von TG unterschieden sich nicht im Vergleich zu der WT-Kontrollgruppe. Die basale Kontraktionskraft in linken Vorhöfen betrug im Durchschnitt von TG $1,82 \pm 0,15$ mN (n=8) und von WT $2,15 \pm 0,31$ mN (n=6). Die Frequenz der rechten Vorhöfe von TG lag bei 382 ± 11 bpm (n=6) und von WT bei 395 ± 22 bpm (n=6). Die Inkubation mit dem PDE3-Hemmstoff Cilostamid (10^{-6} M) bewirkte keinen Anstieg der Kontraktionskraft der linken Vorhöfe von TG und WT (Ktr2 vs. Ktr1 in Abb. 10A). Auch in den rechten Vorhöfen konnte Cilostamid (10^{-6} M) keine Veränderung der Frequenz bewirken (Ktr2 vs. Ktr1 in Abb. 10B).

Ab einer 5-HT-Konzentration von 3×10^{-9} M stieg die Kontraktionskraft der linken Vorhöfe von TG bezogen auf Ktr2 an ($2,14 \pm 0,19$ mN vs. $1,82 \pm 0,15$ mN, siehe Abb. 10A). Gegenüber WT-Vorhöfen zeigte sich ab einer 5-HT-Konzentration von 3×10^{-8} M ein Kraftanstieg. Die 5-HT KWKs ohne Cilostamid (Dreiecke) sind in der Abb. 10A mit dargestellt. Unter Cilostamid kam es zu einer Verschiebung des PIE von 5-HT zu höheren Konzentrationen ($-\log EC_{50} = 7,28 \pm 0,13$, Abb. 10A). Die Anspannungszeiten der linken Vorhöfe von TG zeigten unter der 5-HT-KWK eine Tendenz sich zu verkürzen, ohne dass dieser Effekt signifikant wurde (s. Tab. 3). Die linken Vorhöfe von WT zeigten keine Veränderungen unter der 5-HT-KWK bezüglich Anspannungs- und Relaxationszeiten. Die rechten Vorhöfe von TG zeigten ab einer Konzentration von 10^{-8} M Serotonin einen Anstieg der Frequenz gegenüber Ktr2 und auch gegenüber den WT-Vorhöfen (s. Abb. 10B). Die Wirksamkeit von 5-HT auf den PCE wurde durch EHNA nicht verändert (Tab. 2). Die rechten Vorhöfe von WT vermittelten keine chronotropen Effekte. Bei hohen 5-HT Konzentrationen kam es zu einem leichten Abfall der Schlagrate, der Effekt war nicht signifikant.

A



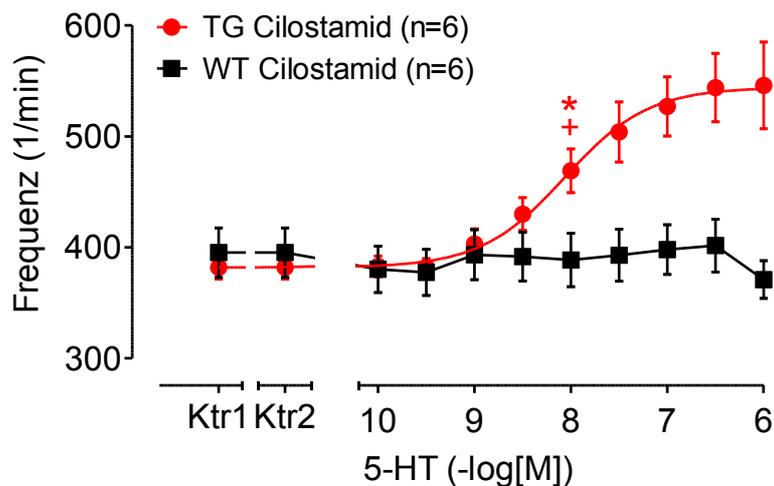
B

Abb. 10: Cilostamid

(A) Effekte von 5-HT allein (Dreiecke) und in Gegenwart von 10^{-6} M Cilostamid auf die Kontraktionskraft elektrisch gereizter (1 Hz) linker Vorhöfe von 5-HT₄-Rezeptor überexprimierenden Mäusen (TG, Kreise) und Wildtyp-Geschwistertieren (WT, Quadrate). Ktr1 = basale Kontraktionskraft vor Inkubation mit Cilostamid. Ktr2 = Kontraktionskraft nach Inkubation mit Cilostamid. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der 5-HT Konzentration, Ordinate: Kontraktionskraft in Millinewton (mN).

(B) Effekte von 5-HT in Gegenwart von 10^{-6} M Cilostamid auf spontan schlagende rechte Vorhöfe von TG (Kreise) und WT (Quadrate). Ktr1 = basale Schlagrate vor Inkubation mit Cilostamid. Ktr2 = Schlagrate nach Inkubation mit Cilostamid. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der 5-HT Konzentration, Ordinate: Schlagfrequenz in Schlägen pro Minute (1/min).

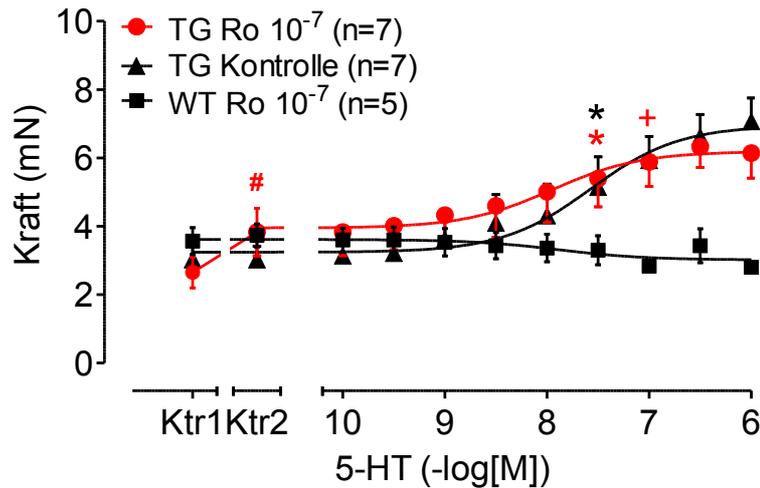
n = Anzahl der Experimente, * = erster signifikanter Unterschied gegenüber Ktr2 ($P < 0,05$), + = erster signifikanter Unterschied gegenüber WT ($P < 0,05$), § = signifikanter Unterschied vs. TG Kontrolle.

3.4.3 Rolipram

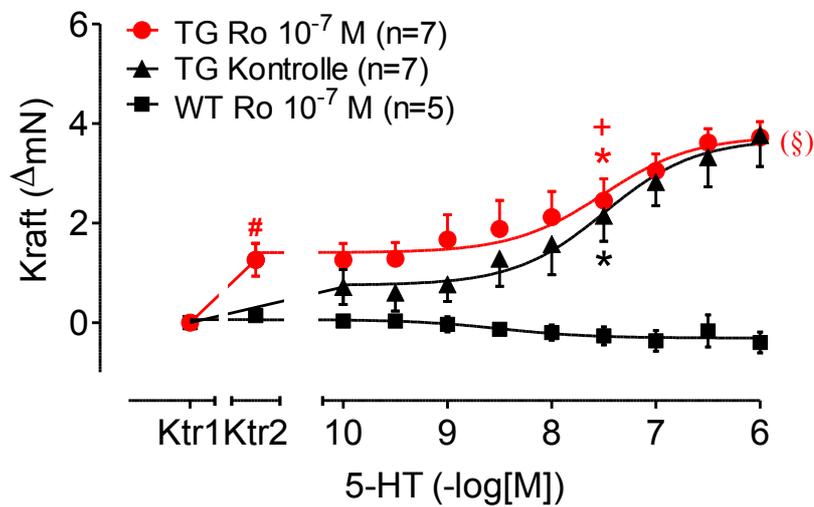
Die Ausgangswerte der linken und rechten Vorhöfe von TG wiesen zu den WT-Vorhöfen keine Unterschiede auf. Rolipram (10^{-6} M) bewirkte einen Anstieg der Kontraktionskraft in linken Vorhöfen von TG und tendenziell auch bei WT (s. Abb. 11C). 5-HT konnte den PIE der linken Vorhöfe von TG nicht weiter erhöhen. (s. Abb. 11C, Kreise vs. Dreiecke). Rolipram bewirkte keine Veränderungen der Schlagfrequenz in rechten Vorhöfen von TG und WT (Ktr2 vs. Ktr1, s. Abb. 11D). Die Wirksamkeit von 5-HT, die Frequenz anzuheben wurde durch Rolipram (10^{-6} M) nicht verändert (s. Tab.2). Aufgrund des starken inotropen Eigeneffektes, wurde die Konzentration von Rolipram 10-fach reduziert. Auch unter Rolipram (10^{-7} M) konnten weiter inotrope Eigeneffekte bei TG, aber nicht mehr bei WT-Tieren beobachtet werden (Ktr2 vs. Ktr2 in Abb. 11A und 11B). Es kam zu einer Linksverschiebung des PIE von 5-HT in TG, die Wirksamkeit von 5-HT wurde erhöht (s. Abb. 11A und 11B, $-\log EC_{50} = 7,9 \pm 0,43$, $p < 0,05$ vs. KWK ohne Rolipram 10^{-7} M). Der maximale Kraftanstieg von $3,46 \pm 0,39$ mN wurde bei 10^{-6} M Serotonin gemessen, ohne ein konstantes Plateau in der KWK erreicht zu haben (s. Abb. 11B). Rolipram (10^{-7} M) alleine hatte keinen Einfluss auf die basale Schlagfrequenz von rechten Vorhöfen von TG und WT-Mäusen. Der

PCE von 5-HT in rechten TG-Vorhöfen war nach Applikation von Rolipram unverändert. Auch nach Inkubation mit Rolipram (10^{-6} M oder 10^{-7} M) konnte 5-HT keinen PIE (s. Abb. 11A und 11C) oder PCE in WT-Mäusen (s. Abb. 11E) induzieren. Die Anspannungs- und Relaxationszeiten der linken Vorhöfe von TG verkürzten sich nur tendenziell, auch diese Effekte waren nicht signifikant (s. Tab. 3). Bei den WT-Vorhöfen kam hingegen es zu einer Verringerung der Relaxationszeit durch Rolipram, die Verkürzung der Anspannungszeit war nicht signifikant (s. Tab. 3).

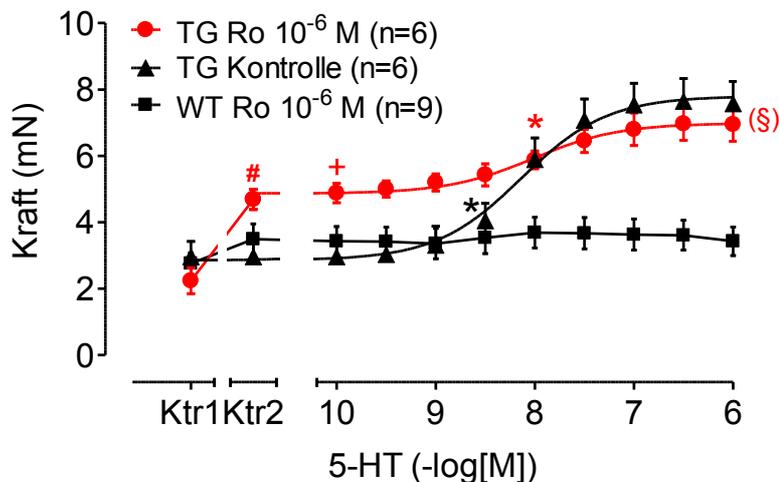
A



B



C



D

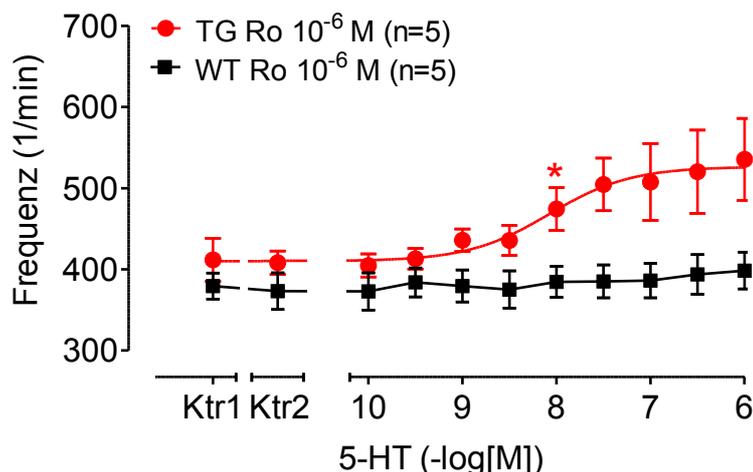


Abb. 11: Rolipram

(A) Effekte von 5-HT allein (Dreiecke) und in Gegenwart von 10⁻⁷ M Rolipram (Ro) auf die Kontraktionskraft elektrisch gereizter (1 Hz) linker Vorhöfe von 5-HT₄-Rezeptor-überexprimierenden Mäusen (TG, Kreise) und Wildtyp-Geschwistertieren (WT, Quadrate). Ktr1 = basale Kontraktionskraft vor Inkubation mit 10⁻⁷ M Rolipram. Ktr2 = Kontraktionskraft nach Inkubation mit 10⁻⁷ M Rolipram. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der 5-HT Konzentration, Ordinate: Kontraktionskraft in Millinewton (mN).

(B) Auf Ktr1 normalisierte Effekte von 5-HT allein (Dreiecke) und in Gegenwart von 10⁻⁷ M Rolipram (Ro) auf die Kontraktionskraft elektrisch gereizter (1 Hz) linker Vorhöfe von TG (Kreise) und WT (Quadrate). Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der 5-HT-Konzentration, Ordinate: Kontraktionskraft in Millinewton (Δ mN).

(C) Effekte von 5-HT allein (Dreiecke) und in Gegenwart von 10⁻⁶ M Rolipram (Ro) auf die Kontraktionskraft elektrisch gereizter (1 Hz) linker Vorhöfe von TG (Kreise) und WT (Quadrate). Ktr1 = basale Kontraktionskraft vor Inkubation mit 10⁻⁶ M Rolipram. Ktr2 = Kontraktionskraft nach Inkubation mit 10⁻⁶ M Rolipram. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der 5-HT-Konzentration, Ordinate: Kontraktionskraft in Millinewton (mN).

(D) Effekte von 5-HT in Gegenwart von 10⁻⁶ M Rolipram in spontan schlagenden rechten Vorhöfen von TG (Kreise) und WT (Quadrate). Ktr1 = basale Schlagrate vor Inkubation mit 10⁻⁶ M Rolipram. Ktr2 = Schlagrate nach Inkubation mit 10⁻⁶ M Rolipram. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der 5-HT-Konzentration, Ordinate: Schlagfrequenz in Schlägen pro Minute (1/min).

n = Anzahl der Experimente, * = erster signifikanter Unterschied gegenüber Ktr2 ($P < 0,05$), + = erster signifikanter Unterschied gegenüber WT ($P < 0,05$), # = signifikanter Unterschied Ktr2 vs. Ktr1 ($P < 0,05$), § = signifikanter Unterschied vs. TG Kontrolle.

3.4.4 IBMX

Im Vergleich zu den oben beschriebenen selektiven PDE-Hemmstoffen wurde IBMX (in den Konzentrationen 10 μM und 1 μM) als unselektiver PDE-Hemmstoff angewendet.

Die Ausgangswerte der Kontraktionskraft der linken Vorhöfe und die Schlagfrequenz der rechten Vorhöfe von TG wiesen im Vergleich zu den WT-Vorhöfen keine Unterschiede auf. IBMX (10^{-6} M) bewirkte keine Zunahme der Kontraktionskraft in den linken Vorhöfen von TG oder WT (s. Abb. 12A). Die Schlagfrequenz der rechten Vorhöfe von TG stieg tendenziell an, diese Frequenzzunahme wurde jedoch nicht signifikant (Ktr2 vs. Ktr1 in Abb. 12B).

Auch in Gegenwart von IBMX (10^{-6} M) konnte ein konzentrationsabhängiger PIE von 5-HT in TG vermittelt werden. Zu einer Verschiebung des PIE von 5-HT kam es dabei nicht ($-\log EC_{50} = 8,07 \pm 0,08$), im Vergleich mit allen 5-HT KWKs ohne PDE-Hemmstoffe ($-\log EC_{50} = 8,02 \pm 0,03$). Ab einer 5-HT-Konzentration von 10^{-8} M stieg die Kontraktionskraft der linken Vorhöfe von TG bezogen auf Ktr2 signifikant an (Abb. 12A). Gegenüber WT-Vorhöfen zeigte sich ab einer 5-HT-Konzentration von 10^{-7} M ein Kraftanstieg.

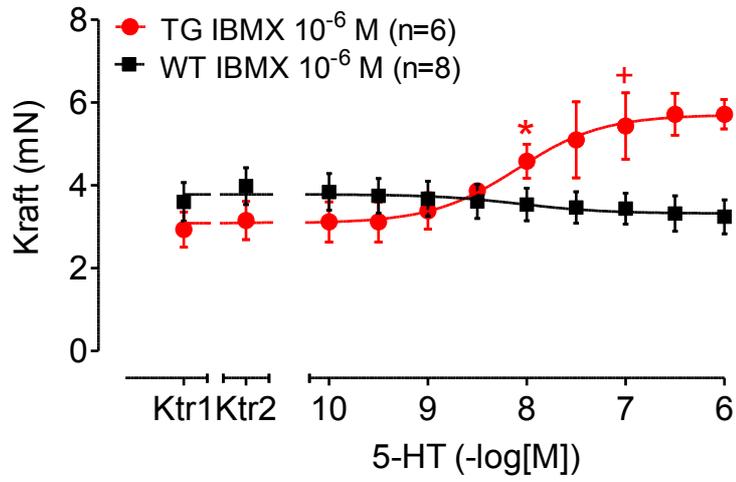
Die rechten Vorhöfe von TG zeigten ab 10^{-7} M Serotonin eine Frequenzzunahme gegenüber Ktr2 und WT (s. Abb. 12B). Die maximale Frequenz wurde bei 10^{-6} M gemessen, ohne jedoch ein stabiles Plateau erreicht zu haben. Um stärkere Effekte zu erzielen, wurde die IBMX-Konzentration auf 10^{-5} M erhöht. In dieser Konzentration bewirkte IBMX eine deutliche Steigerung der Kontraktionskraft in linken Vorhöfen von TG und es war auch ein inotroper Effekt in WT-Vorhöfen tendenziell erkennbar (Ktr2 vs. Ktr1 in Abb. 12C). IBMX (10^{-5} M) verschob den PIE von 5-HT in TG zu niedrigeren Konzentrationen ($-\log EC_{50} = 8,53 \pm 0,05$). Die linken Vorhöfe von WT reagierten auch unter IBMX (10^{-5} M) nicht inotrop auf 5-HT. Es war sogar eine nicht signifikante Abschwächung der Kraft im Verlauf der 5-HT-KWK bei WT-Vorhöfen zu erkennen (s. Abb. 12C).

Die rechten Vorhöfe verhielten sich in gleicher Weise. Unter IBMX (10^{-5} M) erhöhte sich die Schlagfrequenz bei TG und auch bei der WT-Kontrollgruppe war eine Frequenzzunahme tendenziell erkennbar (Ktr2 vs. Ktr1 in Abb. 12D). Die zusätzliche Gabe von 5-HT konnte keinen weiteren Anstieg der Frequenz in WT oder TG bewirken (s. Abb. 12D).

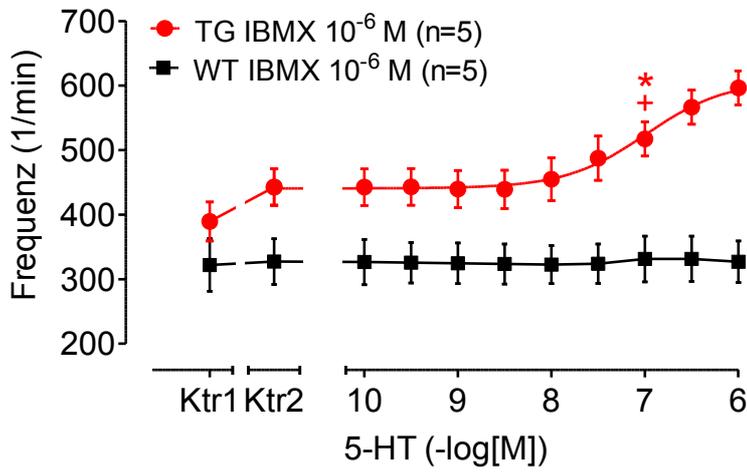
IBMX (in den Konzentrationen 10^{-6} M und 10^{-5} M) konnte weder einen 5-HT-vermittelten PIE (s. Abb. 12A und 12C) oder einen 5-HT-vermittelten PCE (s. Abb. 12D) in WT-Vorhöfen induzieren.

Die Anspannungs- und Relaxationszeiten der linken Vorhöfe von TG- und WT-Tieren verkürzten sich tendenziell, die Effekte wurden jedoch nicht signifikant (s. Tab. 3).

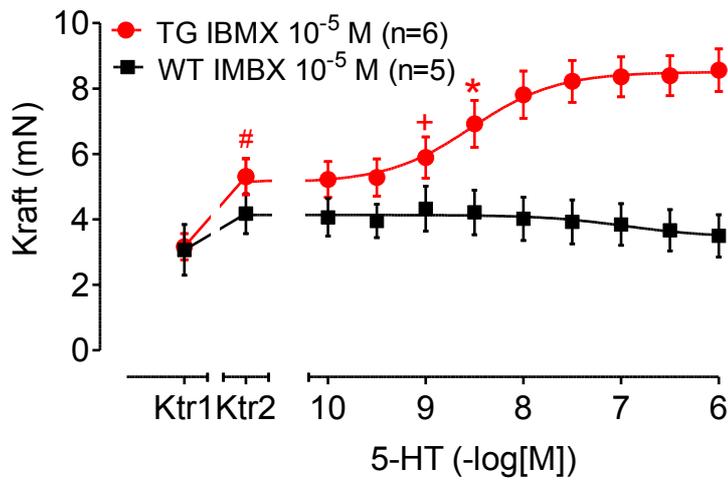
A



B



C



D

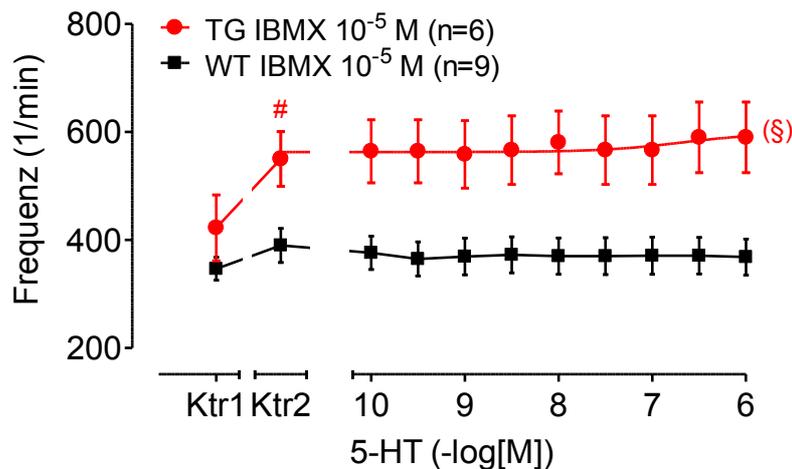


Abb. 12: IBMX

(A) Effekte von 5-HT in Gegenwart von 10^{-6} M 3-isobutyl-1-methyl-xanthin (IBMX) auf die Kontraktionskraft elektrisch gereizter (1 Hz) linker Vorhöfe von 5-HT₄-Rezeptor-überexprimierenden Mäusen (TG, Kreise) und Wildtyp-Geschwistertieren (WT, Quadrate). Ktr1 = basale Kontraktionskraft vor Inkubation mit 10^{-6} M IBMX. Ktr2 = Kontraktionskraft nach Inkubation mit 10^{-6} M IBMX. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der 5-HT Konzentration, Ordinate: Kontraktionskraft in Millinewton (mN).

(B) Effekte von 5-HT in Gegenwart von 10^{-6} M IBMX in spontan schlagenden rechten Vorhöfen von TG (Kreise) und WT (Quadrate). Ktr1 = basale Schlagrate vor Inkubation mit 10^{-6} M IBMX. Ktr2 = Schlagrate nach Inkubation mit 10^{-6} M IBMX. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der 5-HT Konzentration, Ordinate: Schlagfrequenz in Schlägen pro Minute (1/min).

(C) Effekte von 5-HT in Gegenwart von 10^{-5} M IBMX auf die Kontraktionskraft elektrisch gereizter (1 Hz) linker Vorhöfe von TG (Kreise) und WT (Quadrate). Ktr1 = basale Kontraktionskraft vor Inkubation mit 10^{-5} M IBMX. Ktr2 = Kontraktionskraft nach Inkubation mit 10^{-5} M IBMX. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der 5-HT Konzentration, Ordinate: Kontraktionskraft in Millinewton (mN).

(D) Effekte von 5-HT in Gegenwart von 10^{-5} M IBMX in spontan schlagenden rechten Vorhöfen von TG (Kreise) und WT (Quadrate). Ktr1 = basale Schlagrate vor Inkubation mit 10^{-5} M IBMX. Ktr2 = Schlagrate nach Inkubation mit 10^{-5} M IBMX. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der 5-HT Konzentration, Ordinate: Schlagfrequenz in Schlägen pro Minute (1/min).

n = Anzahl der Experimente, * = erster signifikanter Unterschied gegenüber Ktr2 ($P < 0,05$), + = erster signifikanter Unterschied gegenüber WT ($P < 0,05$), # = signifikanter Unterschied Ktr2 vs. Ktr1 ($P < 0,05$), § = signifikanter Unterschied vs. WT.

3.5 Experimente mit PDE-Hemmstoffkombinationen

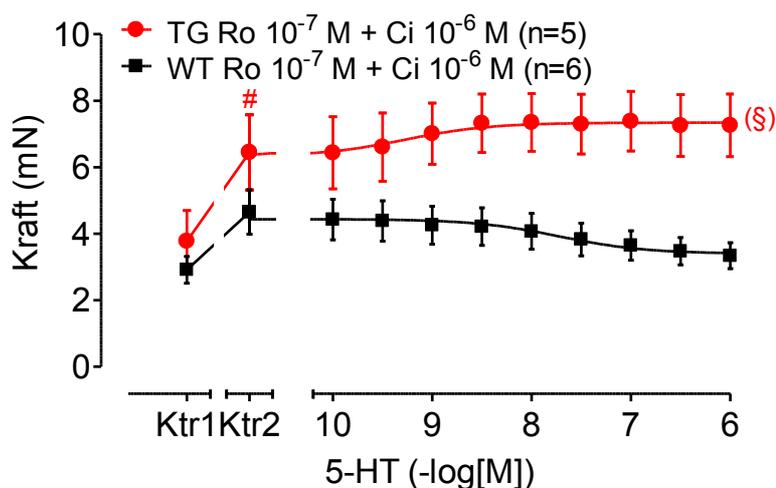
Die Daten aus den Versuchen mit den spezifischen PDE-Hemmstoffen und der Vergleich mit der IBMX-Versuchsreihe (unspezifische PDE-Hemmung) legen nahe, dass eine kombinierte Hemmung mehrerer PDEs, den PIE von 5-HT verstärken kann. Welche Isoenzyme dabei gemeinsam wirken, ist jedoch unklar. Um einen Einblick zu erhalten, welche PDEs in TG synergistisch wirken und die 5-HT-Wirkungen beeinflussen, wurden die nachfolgenden Experimente durchgeführt.

3.5.1 Cilostamid und Rolipram

Die basale Kontraktionskraft der linken Vorhöfe und die Frequenz der rechten Vorhöfe von TG wiesen zu den WT-Tieren keine Unterschiede auf. Die kombinierte PDE3- und PDE4-Hemmung in den Konzentrationen Cilostamid (10^{-6} M) und Rolipram (10^{-6} M) zeigte schnell einen maximalen Anstieg der Kontraktionskraft und Frequenz in TG- und WT-Vorhöfen. Eine zusätzliche β -adrenerge Stimulation mit Isoprenalin konnte keine Verstärkungen der Effekte mehr bewirken, d.h. der maximale inotrope und chronotrope Effekt war erreicht (s. Abb. 13C und 13D). Um diese starken Eigeneffekte abzuschwächen, wurde die Konzentration von Rolipram reduziert. Die kombinierte PDE3- und PDE4-Hemmung mittels Cilostamid (10^{-6} M) und Rolipram (10^{-7} M) bewirkte weiterhin eine Zunahme der Kontraktionskraft in linken Vorhöfen von TG. Bei WT wurde die Kraftzunahme nicht signifikant (Ktr2 vs. Ktr1 in Abb. 13A). Die rechten Vorhöfe von TG und WT verhielten sich unter der kombinierten PDE-Hemmung in gleicher Weise, es kam zu eine Zunahme der Schlagfrequenz bei TG (Ktr2 vs. Ktr1 in Abb. 13B). Ausgehend von der nun erhöhten Ausgangslage der linken Vorhöfe von TG, konnte der PIE durch 5-HT nur noch leicht verstärkt werden (Kreise in Abb. 13A). Bei den WT-Vorhöfen kam es scheinbar zu einer Abschwächung der Kontraktionskraft unter 5-HT (Quadrate in Abb. 13A). Die Frequenz der rechten Vorhöfe von TG und WT konnte durch 5-HT nicht weiter erhöht werden, wahrscheinlich war die maximale Frequenz bereits erreicht (s. Abb. 13B).

Die Anspannungs- und Relaxationszeiten der linken Vorhöfe von TG- und WT-Tieren verkürzten sich tendenziell unter der kombinierten PDE-Hemmung mit Cilostamid und Rolipram (10^{-7} M und 10^{-6} M) und folgender 5-HT KWK. Diese Veränderungen waren jedoch nicht signifikant (s. Tab.3).

A



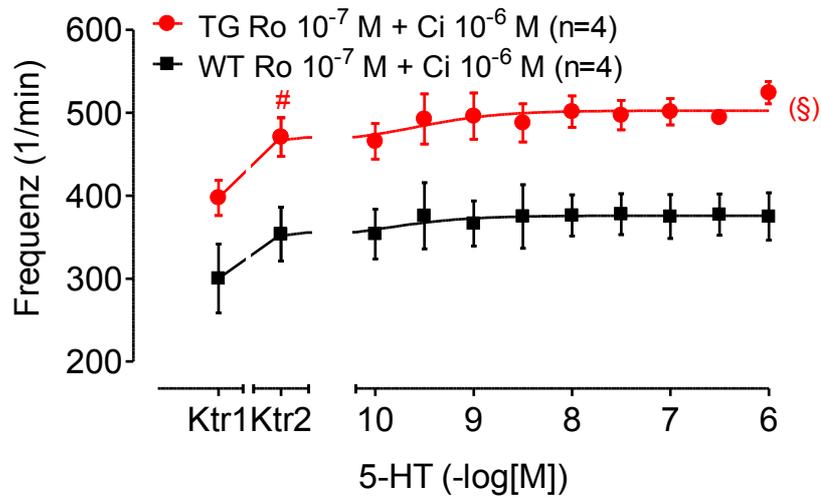
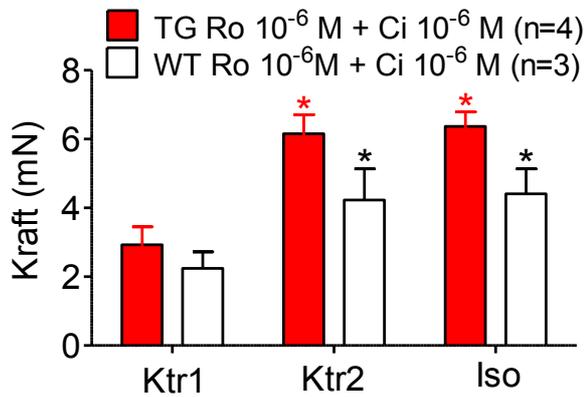
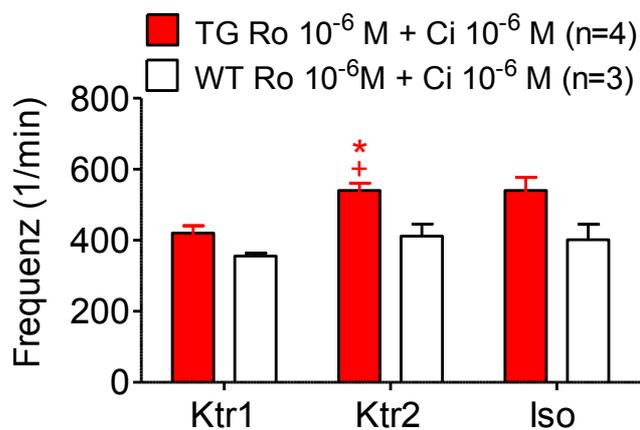
B**C****D**

Abb. 13: Rolipram und Cilostamid

(A) Effekte von 5-HT in Gegenwart der PDE-Hemmstoffkombination 10^{-7} M Rolipram und 10^{-6} M Cilostamid auf die Kontraktionskraft elektrisch gereizter (1 Hz) linker Vorhöfe von 5-HT₄-Rezeptor überexprimierenden Mäusen (TG, Kreise) und Wildtyp-Geschwistertieren (WT, Quadrate). Ktr1 = basale Kontraktionskraft vor

Inkubation mit Rolipram und Cilostamid. Ktr2 = Kontraktionskraft nach Inkubation mit Rolipram und Cilostamid. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der 5-HT Konzentration, Ordinate: Kontraktionskraft in Millinewton (mN).

(B) Effekte von 5-HT in Gegenwart der PDE-Hemmstoffkombination 10^{-7} M Rolipram und 10^{-6} M Cilostamid in spontan schlagenden rechten Vorhöfen von TG (Kreise) und WT (Quadrate). Ktr1 = basale Schlagrate vor Inkubation mit Rolipram und Cilostamid. Ktr2 = Schlagrate nach Inkubation mit Rolipram und Cilostamid. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der 5-HT Konzentration, Ordinate: Schlagfrequenz in Schlägen pro Minute (1/min).

(C) Effekte der PDE-Hemmstoffkombination 10^{-6} M Rolipram und 10^{-6} M Cilostamid auf die Kontraktionskraft elektrisch gereizter (1 Hz) linker Vorhöfe von TG (Rot) und WT (Weiß). Ktr1 = basale Kontraktionskraft vor Inkubation mit Rolipram und Cilostamid. Ktr2 = Kontraktionskraft nach Inkubation mit Rolipram und M Cilostamid. Iso = Zugabe 10^{-6} M Isoprenalin (Iso) nach der zweiten 5-HT KWK. Ordinate: Kontraktionskraft in Millinewton (mN).

(D) Effekte der PDE-Hemmstoffkombination 10^{-6} M Rolipram und 10^{-6} M Cilostamid auf spontan schlagende rechte Vorhöfe von TG (links) und WT (rechts). Ktr1 = basale Schlagrate vor Inkubation mit Rolipram und Cilostamid. Ktr2 = Schlagrate nach Inkubation mit Rolipram und Cilostamid. Iso = Zugabe 10^{-6} M Isoprenalin (Iso) nach der zweiten 5-HT KWK, Ordinate: Schlagfrequenz in Schlägen pro Minute (1/min).

n = Anzahl der Experimente, * = signifikanter Unterschied gegenüber Ktr1 ($P < 0,05$), + = erster signifikanter Unterschied gegenüber WT ($P < 0,05$), # = signifikanter Unterschied Ktr2 vs. Ktr1 ($P < 0,05$), § = signifikanter Unterschied vs. WT.

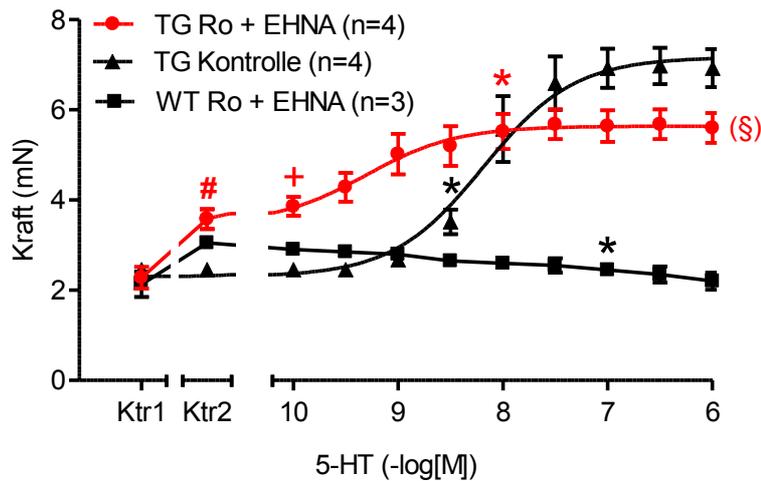
3.5.2 EHNA und Rolipram

Die Kontraktionskräfte der linken Vorhöfe und basale Schlagfrequenz der rechten Vorhöfe von TG wiesen im Vergleich zu den WT-Tieren keine Unterschiede auf. Die kombinierte PDE2- und PDE4-Hemmung durch EHNA (10^{-6} M) und Rolipram (10^{-6} M) erhöhte die Kontraktionskraft der linken Vorhöfe von TG und auch tendenziell von WT-Tieren. Von dieser erhöhten Ausgangslage konnte in TG weiterhin ein konzentrationsabhängiger Kraftanstieg durch 5-HT gemessen werden (s. Abb. 14A). Die Potenz von 5-HT bezüglich des PIE wurde durch die PDE2- und PDE4-Hemmung erhöht ($-\log EC_{50} = 9,04 \pm 0,44$). Ab 10^{-8} M Serotonin zeigte sich ein Kraftanstieg gegenüber Ktr2 ($5,26 \pm 0,39$ mN vs. $3,43 \pm 0,22$ mN). Die linken Vorhöfe von WT-Tieren zeigten keine 5-HT-Effekte (s. Abb. 14A).

Die PDE-Hemmstoffe hatten keinen Einfluss auf die basale Frequenz in rechten TG- und WT-Vorhöfen (Ktr2 vs. Ktr1 in Abb. 14B). Eine Erhöhung der Potenz von 5-HT auf den PCE deutete sich an, der Effekt war jedoch nicht signifikant ($p = 0,0556$). Die rechten Vorhöfe der WT-Tiere reagierten weder auf die PDE-Hemmstoffe noch auf die folgende 5-HT KWK (s. Abb. 14B).

Die Anspannungs- und Relaxationszeiten verkürzten sich leicht unter der kombinierten PDE-Hemmung in linken Vorhöfen von TG und WT. Statistisch signifikant waren die Veränderungen jedoch nicht (s. Tab.3).

A



B

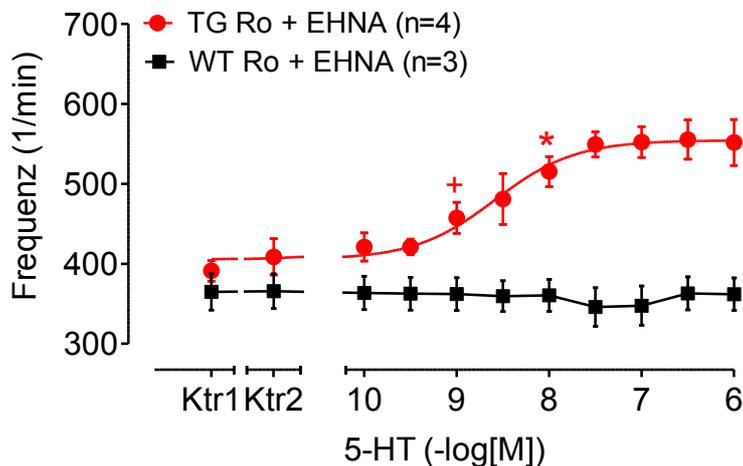


Abb. 14: Rolipram und EHNA

(A) Effekte von 5-HT allein (Dreiecke) und in zusätzlicher Gegenwart der PDE-Hemmstoffkombination 10^{-6} M Rolipram und 10^{-6} M EHNA auf die Kontraktionskraft elektrisch gereizter (1 Hz) linker Vorhöfe von 5-HT₄-Rezeptor überexprimierenden Mäusen (TG, Kreise) und Wildtyp-Geschwistertieren (WT, Quadrate). Ktr1 = basale Kontraktionskraft vor Inkubation mit Rolipram und EHNA. Ktr2 = Kontraktionskraft nach Inkubation mit Rolipram und EHNA. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der 5-HT Konzentration, Ordinate: Kontraktionskraft in Millinewton (mN).

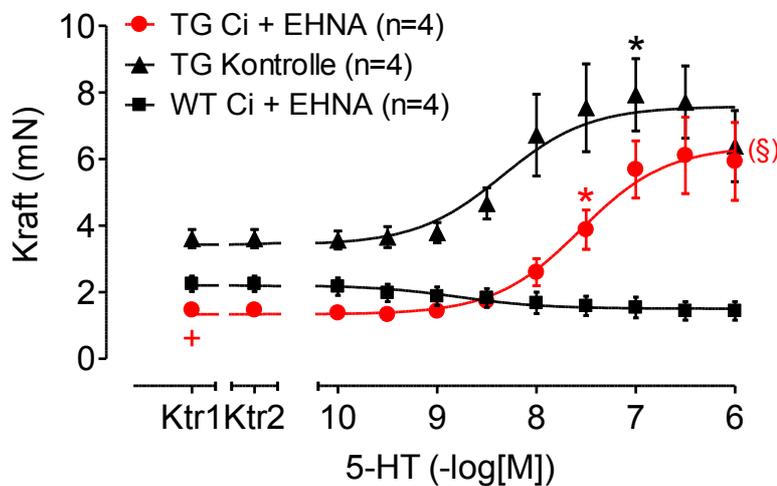
(B) Effekte von 5-HT in Gegenwart der PDE-Hemmstoffkombination 10^{-6} M Rolipram und 10^{-6} M EHNA in spontan schlagenden rechten Vorhöfen von TG (Kreise) und WT (Quadrate). Ktr1 = basale Schlagrate vor Inkubation mit Rolipram und EHNA. Ktr2 = Schlagrate nach Inkubation mit Rolipram und EHNA. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der 5-HT Konzentration, Ordinate: Schlagfrequenz in Schlägen pro Minute (1/min).

n = Anzahl der Experimente, * = signifikanter Unterschied gegenüber Ktr2 ($P < 0,05$), + = erster signifikanter Unterschied gegenüber WT ($P < 0,05$), # = signifikanter Unterschied Ktr2 vs. Ktr1 ($P < 0,05$), § = signifikanter Unterschied vs. TG Kontrolle.

3.5.3 Cilostamid und EHNA

Die Kontraktionskräfte der linken Vorhöfe und basale Schlagfrequenz der rechten Vorhöfe von TG wiesen im Vergleich zu den WT-Tieren keine Unterschiede auf. Die kombinierte PDE-Hemmung durch Cilostamid (10^{-6} M) und EHNA (10^{-6} M) konnte die Kontraktionskraft der linken Vorhöfe und die Frequenz der rechten Vorhöfe von TG- und WT-Tieren nicht erhöhen (s. Abb. 15A). Unter dieser kombinierten PDE-Hemmung wurde der PCE von 5-HT in Richtung einer höheren Konzentrationen verschoben ($-\log EC_{50} = 7,0 \pm 0,12$). Ab einer 5-HT Konzentration von 3×10^{-8} M zeigte sich ein signifikanter Kraftanstieg von TG gegenüber Ktr2 ($3,88 \pm 0,59$ mN vs. $1,47 \pm 0,09$ mN, s. Abb. 15A). Die Kontraktionskraft der linken Vorhöfe von WT blieb unter diesen Bedingungen unverändert (s. Abb. 15A). Die PDE-Hemmung erhöhte die Frequenz in den rechten Vorhöfen von TG, ohne jedoch eine Verschiebung des PCE von 5-HT zu bewirken ($-\log EC_{50} = 7,8 \pm 0,2$, Abb. 15B). Eine signifikante Zunahme der Frequenz wurde bei 10^{-8} M Serotonin gegenüber Ktr2 und auch gegenüber den WT-Vorhöfen gemessen (s. Abb. 15B). Unter diesen Bedingungen deutete sich ein Abnahme der Schlagfrequenz bei den WT-Mäusen an (s. Abb. 15B, Quadrate). Veränderungen der Anspannungs- und Relaxationszeiten linker Vorhöfe von TG- und WT-Mäusen wurden unter der PDE-Hemmung nicht gemessen (s.Tab.3).

A



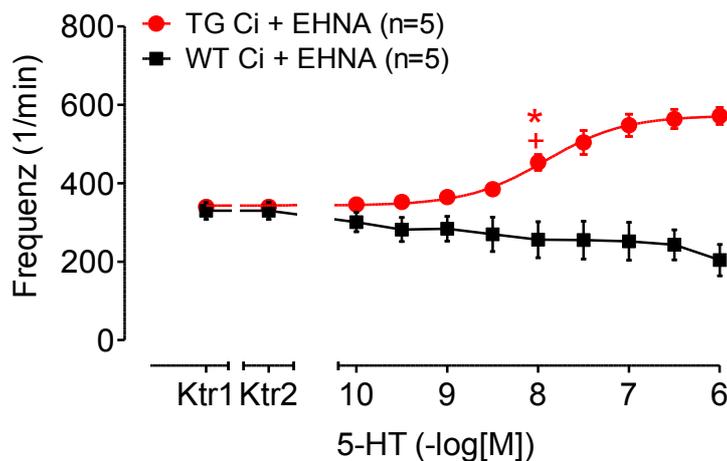
B

Abb. 15: Cilostamid und EHNA

(A) Effekte von 5-HT allein (Dreiecke) und in zusätzlicher Gegenwart der PDE-Hemmstoffkombination 10^{-6} M Cilostamid (Ci) und 10^{-6} M EHNA auf die Kontraktionskraft elektrisch gereizter (1 Hz) linker Vorhöfe von 5-HT₄-Rezeptor überexprimierenden Mäusen (TG, Kreise) und Wildtyp-Geschwistertieren (WT, Quadrate). Ktr1 = basale Kontraktionskraft vor Inkubation mit Cilostamid und EHNA. Ktr2 = Kontraktionskraft nach Inkubation mit Cilostamid und EHNA. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der 5-HT Konzentration, Ordinate: Kontraktionskraft in Millinewton (mN).

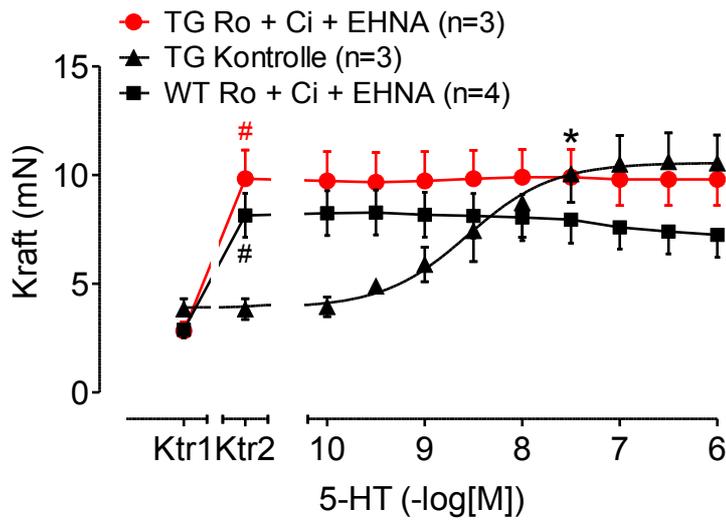
(B) Effekte von 5-HT in Gegenwart der PDE-Hemmstoffkombination 10^{-6} M Cilostamid und 10^{-6} M EHNA auf die Frequenz spontan schlagender rechter Vorhöfe von TG (Kreise) und WT (Quadrate). Ktr1 = basale Schlagfrequenz vor Inkubation mit Cilostamid und EHNA. Ktr2 = Schlagfrequenz nach Inkubation mit Cilostamid und EHNA. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der 5-HT Konzentration, Ordinate: Schlagfrequenz in Schlägen pro Minute (1/min).

n = Anzahl der Experimente, * = signifikanter Unterschied gegenüber Ktr2 ($P < 0,05$), + = erster signifikanter Unterschied gegenüber WT ($P < 0,05$), § = signifikanter Unterschied vs. TG Kontrolle.

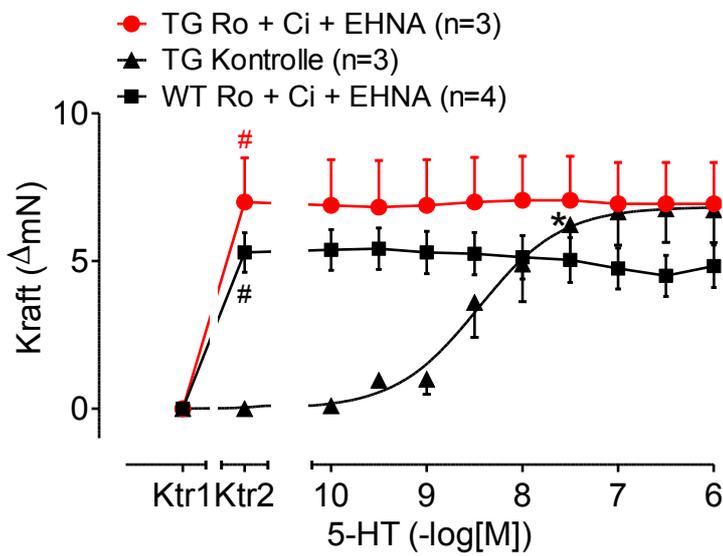
3.5.4 Cilostamid, EHNA und Rolipram

Abschließend wurden PDE2, 3 und 4 gemeinsam mittels EHNA (10^{-6} M), Cilostamid (10^{-6} M) und Rolipram (10^{-7} M) gehemmt. Die Kontraktionskräfte der linken Vorhöfe und basale Schlagfrequenz der rechten Vorhöfe von TG wiesen im Vergleich zu den WT-Tieren ebenfalls keine Unterschiede auf. Diese Dreifach-PDE-Hemmung bewirkte eine starke Zunahme der Kontraktionskraft in TG und WT (Ktr2 vs. Ktr1 in Abb. 16A und 16B). Die rechten Vorhöfe von TG- und WT-Mäusen reagierten ebenfalls positiv chronotrop auf die PDE-Hemmung (s. Abb. 16C). Die Kontraktionskraft und Frequenz wurde anscheinend durch die Dreifach-Hemmung bereits maximal erhöht, so dass 5-HT keinen PIE (s. Abb. 16A und 16B) oder PCE (s. Abb. 16C) in TG mehr vermitteln konnte. Es konnten keine 5-HT-vermittelten PIE oder PCE in Präparaten der WT-Mäuse erzeugt werden. Die Anspannungszeiten verkürzten sich unter der folgenden 5-HT KWK, die Relaxationszeiten offenbarten keine Veränderungen (s. Tab.3).

A



B



C

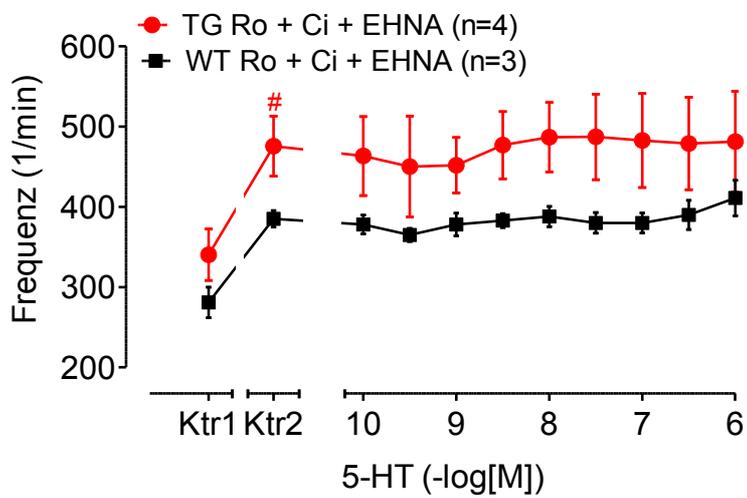


Abb. 16: EHNA, Cilostamid und Rolipram

(A) Effekte von 5-HT allein (Dreiecke) und in zusätzlicher Gegenwart der Dreifach-PDE-Hemmung mit 10^{-6} M EHNA, 10^{-6} M Cilostamid (Ci) und 10^{-7} M Rolipram (Ro) auf die Kontraktionskraft elektrisch gereizter (1 Hz) linker Vorhöfe von 5-HT₄-Rezeptor überexprimierenden Mäusen (TG, Kreise) und Wildtyp-Geschwistertieren (WT, Quadrate). Ktr1 = basale Kontraktionskraft vor Inkubation mit EHNA, Cilostamid und Rolipram. Ktr2 = Kontraktionskraft nach Inkubation mit EHNA, Cilostamid und Rolipram. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der 5-HT Konzentration, Ordinate: Kontraktionskraft in Millinewton (mN).

(B) Auf Ktr1 normierte Effekte von 5-HT alleine (Dreiecke) und in zusätzlicher Gegenwart der PDE-Hemmstoffkombination 10^{-6} M EHNA, 10^{-6} M Cilostamid und 10^{-7} M Rolipram auf die Kontraktionskraft elektrisch gereizter (1 Hz) linker Vorhöfe von TG (Kreise) und WT (Quadrate). Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der 5-HT Konzentration, Ordinate: Kontraktionskraft in delta Millinewton (Δ mN).

(C) Effekte von 5-HT in Gegenwart der PDE-Hemmstoffkombination 10^{-6} M EHNA, 10^{-6} M Cilostamid (Ci) und 10^{-7} M Rolipram (Ro) auf die Frequenz spontan schlagender rechter Vorhöfe von TG (Kreise) und WT (Quadrate). Ktr1 = basale Schlagrate vor Inkubation mit EHNA, Cilostamid und Rolipram. Ktr2 = Schlagrate nach Inkubation mit EHNA, Cilostamid und Rolipram. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der 5-HT Konzentration, Ordinate: Schlagfrequenz in Schlägen pro Minute (1/min).

n = Anzahl der Experimente, * = signifikanter Unterschied gegenüber Ktr2 ($P < 0,05$), + = erster signifikanter Unterschied gegenüber WT ($P < 0,05$)

3.6 EC₅₀-Werte der Konzentrations-Wirkungs-Kurven

Als mittlere effektive Konzentration (EC₅₀) z.B. eines Medikaments wird die Konzentration bezeichnet, bei der genau die Hälfte der maximalen Wirkung erzielt wird. Durch die EC₅₀-Werte kann man die Potenz verschiedener Medikamente, die auf den selben Rezeptor wirken, miteinander vergleichen.

In der vorliegenden Arbeit betrug der pEC₅₀ der linken Vorhöfe von TG-Mäusen in der ersten KWK $8,02 \pm 0,03$, bei den rechten Vorhöfen betrug er $7,78 \pm 0,13$. Es sollte untersucht werden, ob und wie sich der pEC₅₀ durch PDE-Hemmstoffe verändert. Eine Übersicht hierfür ist in Tab. 2 dargestellt.

Tabelle 2: Übersicht über pEC₅₀-Werte von linken und rechten Vorhöfen von TG-Mäusen

Es ist der negative dekadische Logarithmus des halbmaximalen Effekts ($=pEC_{50}$) von Serotonin (5-HT) dargestellt. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven (KWK) wurden mit 5-HT-Konzentrationen von 10^{-10} M bis 10^{-6} M durchgeführt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus den Einzelversuchen. Die Behandlung der Vorhöfe zwischen den beiden KWKs ist auf der linken Seite unter Experiment aufgeführt.

Die mit „-“ gekennzeichneten Stellen zeigen an, dass hier keine Experimente durchgeführt wurden bzw. keine Auswertung der Experimente („n.b.“) möglich waren.

pEC₅₀ linke Vorhöfe

Experimente	KWK 1	KWK 2
EHNA 10^{-6} M	$7,97 \pm 0,04$	$7,56 \pm 0,01$ *
Cilostamid 10^{-6} M	$7,97 \pm 0,18$	$7,28 \pm 0,13$ *
Rolipram 10^{-7} M	$7,41 \pm 0,38$	$7,9 \pm 0,43$ *
Rolipram 10^{-6} M	$8,1 \pm 0,14$	$7,97 \pm 0,45$
IBMX 10^{-5} M	-	$8,53 \pm 0,05$ #
IBMX 10^{-6} M	-	$8,07 \pm 0,08$
Cilostamid 10^{-6} M + EHNA 10^{-6} M	$8,2 \pm 0,28$	$7,0 \pm 0,12$ *
Cilostamid 10^{-6} M + Rolipram 10^{-6} M	$7,99 \pm 0,05$	n.b.

Cilostamid 10^{-6} M + Rolipram 10^{-7} M	-	9,36 ± 0,17 #
EHNA 10^{-6} M + Rolipram 10^{-6} M	8,15 ± 0,17	9,04 ± 0,44*
EH 10^{-6} M + Ci 10^{-6} M + Ro 10^{-7} M	-	n.b.
5-HT (alle KWK1)	8,02 ± 0,03	-

pEC₅₀ rechte Vorhöfe

Experimente	KWK 1	KWK 2
EHNA 10^{-6} M	7,92 ± 0,15	8,0 ± 0,24
Cilostamid 10^{-6} M	8,14 ± 0,14	8,26 ± 0,19
Rolipram 10^{-7} M	7,7 ± 0,59	8,0 ± 0,62
Rolipram 10^{-6} M	7,1 ± 0,38	7,57 ± 0,37
IBMX 10^{-6} M	-	6,96 ± 0,06 #
IBMX 10^{-5} M	-	n.b.
Ci 10^{-6} M + EH 10^{-6} M	7,98 ± 0,23	7,8 ± 0,2
Ci 10^{-6} M + Ro 10^{-6} M	7,9 ± 0,16	n.b.
Ci 10^{-6} M + Ro 10^{-7} M	-	n.b.
EH 10^{-6} M + Ro 10^{-6} M	7,1 ± 0,38	8,39 ± 0,29
EH 10^{-6} M + Ci 10^{-6} M + Ro 10^{-7} M	-	n.b.
5-HT (alle KWK1)	7,78 ± 0,13	-

3.7 Anspannungs- und Relaxationszeiten der linken Vorhöfe von TG- und WT-Mäusen

Serotonin vermittelt über den 5-HT₄-Rezeptor eine positiv lusitrope Wirkung in linken TG-Vorhöfen. Das durch die Adenylatzyklase generierte cAMP aktiviert die Proteinkinase A, welche Phospholamban phosphoryliert und auf diese Weise die hemmende Wirkung von Phospholamban auf SERCA aufhebt. Durch die fehlende Hemmung wird mehr Ca²⁺ aus dem Zytoplasma zurück in das sarkoplasmatische Retikulum gepumpt, sodass das Myokard, wie schon in Abschnitt 1.3.1 beschrieben, schneller relaxieren kann. Eine Übersicht der Wirkung von 5-HT auf die Anspannungs- und Relaxationszeiten ist in Tab. 3 dargestellt.

Tabelle 3: Anspannungs- und Relaxationszeiten linker Vorhöfe

Anspannungs- und Relaxationszeiten in Millisekunden (ms) vor (Ktr1) und nach (Ktr2) Inkubation mit PDE-Hemmstoffen sowie von Serotonin (5-HT) in der Konzentration 10^{-6} M in Gegenwart der PDE-Hemmstoffe in linken Vorhöfen von 5-HT₄-Rezeptor überexprimierenden Mäusen (TG) und Wildtyp-Geschwistertieren (WT). Die Anspannungs- und Relaxationszeiten der 5-HT KWKs ohne PDE-Hemmstoffe sind ebenfalls dargestellt (alle KWK1). Die Behandlung der Vorhöfe ist auf der linken Seite unter Experiment aufgeführt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus den Einzelversuchen.

Ktr1 = Anspannungszeit bzw. Relaxationszeit vor Inkubation mit PDE-Hemmstoff, Ktr2= Anspannungszeit bzw. Relaxationszeit nach Inkubation mit PDE- Hemmstoff.

Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine hydrochloride (EHNA, EH), 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX), Cilostamid (Ci), Rolipram (Ro), * = p<0,05 vs. Ktr2, # = p<0,05 vs. Ktr

Anspannungszeiten (ms)

Experimente	Ktr1		Ktr2		5-HT 10-6 M	
	WT	TG	WT	TG	WT	TG
5-HT (alle KWK1)	30,9±1,0	29,1±0,7	30,7±1,0	29,1±0,9	31,4±1,3	27,6±0,7*
EHNA 10-6M	29,6±0,1	29,6±0,6	31,2±0,6	30,1±0,3	31,7±0,5	26,8±0,3*
Cilostamid 10-6M	32,8±1,7	31,7±0,6	33,1±1,8	31,5±0,6	33,0±1,8	29,3±0,7
Rolipram 10-7M	22,0±1,3	20,3±1,5	21,4±1,4	20,0±1,4	21,0±1,4	20,2±1,0
Rolipram 10-6M	32,4±1,3	30,2±1,5	30,7±1,1	29,2±1,1	30,6±1,8	28±1,3
IBMX 10-6M	18,7±1,8	32,5±1,8	19,1±1,8	33,7±1,9	19,9±1,6	30±1,4
IBMX 10-5M	26,1±4,6	30,5±3,0	26,1±5,1	29,2±2,5	26,5±5,3	27,1±2,0
Ci 10-6M + EH 10-6M	36,4±3,7	32,4±1,3	36,4±3,7	32,4±1,3	31,6±1,3	31,4±1,8
Ci 10-6M + Ro 10-6M	33,9±2,7	28,6±1,7	30,9±0,9	26,3±0,9	30,6±1,7	23,7±2,9
Ci 10-6M + Ro 10-7M	25,2±2,8	32,7±2,4	23,8±2,6	28,7±0,3	23,4±2,3	27,9±0,4
EH 10-6M + Ro 10-6M	33,2±1,5	30,9±2,1	30,5±1,1	27,2±2,0	25,3±4,3	26,5±1,4
Ci 10-6M+ EH 10-6M+ Ro 10-7M	32,8±0,8	33,5±1,0	28,5±1,0	29,7±0,9	28,5±1,0	26,7±1,2*

Relaxationszeiten (ms)

Experimente	Ktr1		Ktr2		5-HT 10-6 M	
	WT	TG	WT	TG	WT	TG
5-HT (alle KWK1)	35,4±1,3	32,7±0,9	36,2±1,3	33,4±0,9	37,1±1,4	32,1±0,8
EHNA 10-6M	40,7±2,3	29,8±1,5	40,1±2,7	32,2±1,9	39,9±2,0	26,8±0,3
Cilostamid 10-6M	35,7±1,0	31,1±1,0	35,0±0,5	30,6±0,7	33,2±0,7	30,8±1,0
Rolipram 10-7M	32,2±2,1	31,8±1,9	30,3±1,7#	30,6±1,9	29,4±1,9	30,3±1,8
Rolipram 10-6M	36,4±1,4	33,3±3,2	33,6±1,2#	35,3±2,6	31,8±1,0*	34,8±1,9
IBMX 10-6M	29,4±2,6	41,9±3,7	29,8±1,5	39,8±2,3	28,1±2,1	34,1±1,3
IBMX 10-5M	33,9±3,7	35,7±8,8	33,1±6,3	31,9±8,3	33,3±4,8	32,5±7,4
Ci 10-6M + EH 10-6M	33,4±0,2	30,1±1,2	33,4±0,2	30,1±1,2	32,5±0,7	31,8±0,5
Ci 10-6M + Ro 10-6M	32,7±0,7	32,8±1,3	30,6±0,9	33,7±1,8	29,8±0,8	29,7±4,3
Ci 10-6M + Ro 10-7M	40,6±1,7	35,0±4,0	33,4±1,4	31,7±2,4	31,3±1,9	33,7±2,6
EH 10-6M + Ro 10-6M	32,6±0,4	32,1±1,5	32,2±0,8	32,0±1,4	26,8±3,2	31,8±1,4
Ci 10-6M+ EH 10-6M+ Ro 10-7M	40,1±2,0	32,3±1,0	40,0±1,7	33,8±1,4	36,7±1,5*	33,2±1,4

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Transgenes Mausmodell

In den hier durchgeführten Versuchen wurden Herzvorhofpräparate von transgenen Mäusen, die den humanen 5-HT_{4a}-Rezeptor kardial überexprimieren verwendet (Gergs et al. 2010). Die Überexpression des Rezeptors war funktionell und immunohistochemisch bestätigt worden. Allerdings war eine quantitative Bestimmung der Rezeptordichte nicht durchführbar, da die Dichte unter der Empfindlichkeit kommerzieller Liganden war (Gergs et al. 2013). Es ist daher unklar in welchem Umfang der Rezeptor exprimiert wird und welche Auswirkungen dies auf die basale Aktivität hat. Die genaue Kenntnis über Rezeptordichte würde auch den Vergleich zwischen den Spezies erleichtern. In dieser Arbeit wurde nur der 5-HT_{4a}-Rezeptor untersucht, der beim Menschen neben dem 5-HT_{4b}-Rezeptor die häufigste Isoform am Herzen darstellt (Blondel et al. 1997).

4.1.2 Kontraktionsexperimente

Die Experimente wurden an Präparaten rechter und linker Vorhöfe von Mäusen vorgenommen. Es handelt sich dabei wie beschrieben um ein isoliertes Teil-Präparat des Herzens. Von Nachteil ist daher, dass sich ein komplettes Herz anders verhalten könnte. Durch die Experimente im Rahmen der vorliegenden Arbeit, ist es daher nur möglich Aussagen über die Funktionsweise der Vorhöfe zu treffen, nicht jedoch über die Herzkammern. Von Vorteil ist allerdings, dass in dem verwendeten Modell mit isolierten Vorhöfen die Kontraktionskraft und die Schlagrate getrennt voneinander untersucht werden. Daher können Erkenntnisse über das Verhalten der Arbeitsmuskulatur und des Sinusknoten in Vorhöfen gewonnen werden.

4.2 Einfluss PDE- Isoenzyme unter Basalbedingungen in rechten Vorhöfen

Es existieren kontroverse Diskussionen darüber, wie die Herzfrequenz in Säugetieren generiert, verringert und erhöht wird. Phosphodiesterasen könnten an der Regulierung beteiligt sein (Vinogradova und Lakatta 2009, Kaumann 2011).

Bei WT-Mäusen hatte die selektive PDE2-Hemmung mittels 100 nM Bay 60-7550 keinen Einfluss auf die Herzfrequenz, 1 µM Bay 60-7550 führte zu einer Frequenzzunahme, jedoch werden bei dieser hohen Konzentration bereits alle PDEs gehemmt (Galindo-Tovar et al. 2016). Die PDE2-Hemmung mittels EHNA zeigte keinen positiv chronotropen Effekt, stattdessen kam es sogar zu einem Abfallen der Frequenz in rechten Vorhöfen von Mäusen (Galindo-Tovar et al. 2018). Dieser

Effekt wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls bei TG- und WT-Vorhöfen tendenziell beobachtet.

PDE3 und PDE4 haben bei neugeborenen Schweinen gemeinsam einen Einfluss auf die Herzfrequenz, wohingegen bei ausgewachsenen Schweinen nur PDE4 von Bedeutung ist (Galindo-Tovar et al. 2009). In dieser Arbeit konnte Cilostamid allein keinen Anstieg der Frequenz in rechten Vorhöfen von TG- und WT-Mäusen bewirken. Galindo-Tovar et al. (2016) beschrieben einen tendenziellen Frequenzanstieg durch Cilostamid, der allerdings nicht signifikant war ($p=0,0625$ in Fig. 4; Galindo-Tovar et al. 2016). In einer anderen Studie dieser Arbeitsgruppe bewirkte Rolipram ($1 \mu\text{M}$) einen geringen kurzzeitigen Frequenzanstieg im rechten Vorhof der Maus (Galindo-Tovar und Kaumann 2008). In der vorliegenden Arbeit war unter Rolipram in der Konzentration 10^{-7} M ein positiv chronotroper Effekt angedeutet, der Effekt war statistisch nicht signifikant und in der Konzentration 10^{-6} M war keine Veränderung der Frequenz gemessen wurden. Da jedoch Effekte nur nach vorbestimmten Inkubationszeiten und nicht kontinuierlich gemessen wurden, könnten vor allem transiente Effekte übersehen worden sein.

Die kombinierte PDE3- und PDE4-Hemmung durch Cilostamid und Rolipram zeigte eine deutliche Frequenzzunahme der rechten Vorhöfe von WT-Mäusen (Galindo-Tovar und Kaumann 2008). Dies konnte hier ebenfalls beobachtet werden.

IBMX erhöhte die Schlagfrequenz deutlich stärker in den TG-Präparaten, als in den WT-Präparaten. Der stärkere Anstieg bei TG könnte zwei Ursachen haben. Einerseits könnte die Aktivität von Phosphodiesterasen in TG-Vorhöfen höher als in WT-Vorhöfen sein, so dass eine Hemmung der PDEs zu stärker ausgeprägten Effekten führt. Andererseits könnten die überexprimierten 5-HT_4 -Rezeptoren konstitutiv aktiv sind und zu höheren basalen cAMP-Konzentrationen in den Vorhöfen von TG-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen führen. PDE-Hemmstoffe können die veränderte cAMP-Produktion sichtbar machen, dabei spiegelt sich der erhöhte cAMP-Gehalt in einer erhöhten Kontraktionskraft wieder.

PDE2 hat wahrscheinlich keine Bedeutung in der Regulation der Schlagfrequenz. In den Versuchen mit EHNA alleine, Cilostamid und EHNA sowie Rolipram und EHNA war kein positiv chronotroper Effekt auf die Basalfrequenz messbar. Die Zusammenführung von EHNA, Cilostamid und Rolipram erhöhte die Frequenz wahrscheinlich maximal, wobei die Kombination Cilostamid und Rolipram ebenfalls schon einen maximalen Effekt auf die Frequenz bewirkte. Bei gesunden Menschen führte die Infusion von Milrinon, ein klinisch zugelassener PDE3-Hemmstoff zu einem anhaltenden Anstieg der Herzfrequenz, was darauf hindeutet, dass zumindest PDE3 an der Regulierung der Herzfrequenz beim Menschen beteiligt ist (Chiu et al. 1999). Dagegen hätte Roflumilast, ein neuerer PDE4-Hemmstoff, keinen Einfluss auf die Herzfrequenz bei Menschen (Rabe et al. 2005).

4.3 Einfluss PDE- Isoenzyme unter 5-HT Zugabe in rechten Vorhöfen

Die Hemmung der PDE3 oder 4 durch Cilostamid oder Rolipram oder die Hemmung beider PDEs durch kombinierte Zugabe der beiden Hemmstoffe konnte den PCE von 5-HT in rechten Vorhöfen neugeborener Schweine nicht erhöhen (Galindo-Tovar et al. 2009). 1 μ M Bay 60-7550 (PDE2-Hemmung, bzw. unselektive PDE-Hemmung aufgrund der hohen Konzentration) erhöhte ebenfalls nicht die Wirksamkeit von Noradrenalin auf die Frequenz (Galindo-Tovar et al. 2016). In Vorhöfen der Ratte konnten EHNA (10 μ M) oder Bay 60-7550 (PDE2-Hemmung) keine Zunahme der durch Noradrenalin und Adrenalin hervorgerufenen Tachykardie bewirken (Galindo-Tovar et al. 2018). Die Kombination von Cilostamid (300 nM) und Rolipram (1 μ M) und damit eine Hemmung von PDE3 und 4, führte zu einem maximalen Frequenzanstieg in rechten Vorhöfen von WT-Mäusen, dieser Anstieg war mit Isoprenalin nicht weiter zu verstärken (Galindo-Tovar und Kaumann 2008). Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit.

In Präparaten rechter Vorhöfe vom Schwein übt 5-HT einen PCE über 5-HT₄- Rezeptoren aus (Kaumann 1990). Rolipram (PDE4-Hemmung) oder Cilostamid (PDE3-Hemmung) konnten jedoch die Wirkung von 5-HT auf die Frequenz nicht verändern (Galindo-Tovar et al. 2009).

Eine Erklärung für die fehlende Frequenzzunahme bei alleiniger Hemmung von PDE3 oder 4 oder bei kombinierter PDE3 und 4 Hemmung könnte ein cAMP-Pool sein, der die 5-HT₄-Rezeptorvermittelte Beeinflussung der Frequenz reguliert, vor PDE3 und PDE4 geschützt ist und ein Kompartiment darstellt, das sich von dem cAMP-Kompartiment unterscheidet, in dem sowohl PDE3 und PDE4 die basale sinoatriale Frequenz reduzieren (Galindo-Tovar et al. 2009).

4.4 Einfluss PDE-Isoenzyme unter Basalbedingungen in linken Vorhöfen

Die alleinige Hemmung von PDE3 und PDE4 durch Zugabe von Rolipram oder Cilostamid bewirkte keine Zunahme der Kontraktionskraft in Präparaten vom Schwein (Galindo-Tovar et al. 2009). Hingegen kam es bei der kombinierten PDE3- und PDE4-Hemmung zu einem Anstieg der Kontraktionskraft (Galindo-Tovar et al. 2009). Auch in WT-Mäusen konnte Cilostamid allein keinen Kraftanstieg in linken Vorhöfen bewirken (Galindo-Tovar und Kaumann 2008), was mit den Ergebnissen dieser Arbeit übereinstimmt.

Wie schon an rechten Vorhöfen war IBMX als unselektiver PDE-Hemmstoff auch in linken Vorhöfen effektiver in TG-Mäusen als bei den WT-Geschwistertieren. Es ist fraglich, ob PDE2 eine Rolle spielt, da die alleinige PDE2 Hemmung keinen Effekt zeigte und die kombinierte PDE2- und PDE4-Hemmung den gleichen Effekt wie die alleinige PDE4 Hemmung hatte. Unter der kombinierten PDE2- und PDE4-Hemmung kam es hingegen zu keinen Veränderungen der Frequenz. Dies spricht für einen spezifischen cAMP-Pool zur Regulierung der Kontraktionskraft,

welcher unabhängig vom cAMP- Pool für die Regulierung der Frequenz ist. Die zusätzliche PDE3 Hemmung zeigte, dass PDE3 an der Regulation von Kontraktionskraft und Frequenz beteiligt ist. Linke Vorhofpräparate vom Schwein reagierten nicht auf die Zugabe von EHNA (Weninger et al. 2012). Cilostamid übte einen transienten PIE an linken Vorhöfen vom Schwein aus (Weninger et al. 2012). Diese Beobachtung konnte in dieser Arbeit an dem TG-Mausmodell nicht gezeigt werden, was auf die verschiedene PDE-Verteilung zwischen Mäusen und Schweinen zurückzuführen sein kann. Die kombinierte PDE2- und PDE3-Hemmung, die kombinierte PDE2- und PDE4-Hemmung und die kombinierte PDE3- und PDE4-Hemmung zeigten keine inotropen Effekte (Weninger et al. 2012). Der unselektive PDE Hemmer IBMX übte einen ausgeprägten PIE aus beim Schwein (De Maeyer et al. 2006).

Bei der kombinierten PDE3- und PDE4-Hemmung kam es bei den WT-Vorhöfen unter 5-HT zu einer Schwächung der Kontraktionskraft, wohingegen sich der positiv inotrope Effekt bei den TG-Vorhöfen durch 5-HT noch leicht verstärken ließ. Multiple PDEs könnten positive und negative Effekte auslösen. Allerdings scheint der negative inotrope Effekt bei den WT-Präparaten nicht dosisabhängig zu sein und könnte folglich auch als Erschlaffungseffekt gedeutet werden.

4.5 Einfluss von 5-HT in Gegenwart von PDE-Isoenzymen in linken Vorhöfen

Im isolierten Ventrikelmyokard von Schweinen, Ratten oder Menschen konnte kein 5-HT-vermittelter PIE beobachtet werden. Dies änderte sich in Präparaten von Ratten und Menschen nach Hemmung der PDE3 durch Präinkubation mit Cilostamid, es offenbarte sich dann ein 5-HT-vermittelter PIE. Durch die gemeinsame Gabe von Cilostamid und Rolipram (Hemmung von PDE3 und 4) konnte dieser Effekt noch verstärkt werden (Afzal et al. 2008). Dieser Effekt wurde ebenfalls in Experimenten mit isolierten Präparaten von Schweineherzen beobachtet (Galindo-Tovar et al. 2009). Es könnte sein, dass 5-HT-Rezeptoren im Ventrikelmyokard dieser Spezies vorkommen. Aber aufgrund einer schnellen PDE3 und 4-vermittelten Degradation des cAMPs, welches in Folge einer 5-HT-Rezeptorstimulation gebildet wurde, kam es nicht zu einer funktionellen Antwort auf 5-HT. In dieser Arbeit war es nicht möglich, in WT-Vorhofpräparaten einen 5-HT vermittelten Effekt durch Präinkubation mit EHNA, Cilostamid, Rolipram, IBMX oder deren Kombinationen zu erzeugen. Es könnte somit sein, dass in den hier verwendeten WT-Mäusen keine funktionellen 5-HT-Rezeptoren in den Vorhöfen exprimiert werden, was die besondere Notwendigkeit der TG-Mäuse als Modell für die Untersuchung von 5-HT₄-Rezeptoren im Herzen unterstreicht.

Berk et al. (2016) führten Konzentrations-Wirkungskurven an menschlichen Geweben (Trabekel) aus dem rechten Vorhof durch. Hier konnte die Effektivität von 5-HT und der maximale inotrope Effekt durch Cilostamid (300 nM) verstärkt werden. Dieser Effekt ließ sich durch Zugabe von

Rolipram (1 μM) weiter erhöhen. Die alleinige Zugabe von Rolipram (1 μM) wiederum hatte keinen Einfluss auf die Kontraktionskraft (Berk et al. 2016).

4.6 Fazit

Cyclisches AMP wird durch die Aktivierung von Adenylyklykassen erzeugt. Diese Aktivierung erfolgt durch die Bindung eines ersten Botenstoffs (z.B. 5-HT) an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Die Effektoren von cAMP sind die PKA, cyclische Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle und PDEs.

Obwohl cAMP ein kleines diffusionsfähiges Molekül ist, hat es nicht den gleichen Zugang zu allen in einer Zelle vorhandenen PKAs, was das Vorhandensein von cAMP-Pools bedeutet. Gemäß dieser Ansicht wird die cAMP-Diffusion aufgrund des schnellen Abbaus durch PDE-Isoenzyme, die in einer Zelle exprimiert werden, behindert. PDEs spielen eine entscheidende Rolle bei der räumlichen cAMP Regulierung und der zellulären Signalübertragung. Der Beitrag der verschiedenen PDE-Isoenzyme zur Signalisierung ist jedoch komplex. Es gibt mehrere Bereiche die für die Generierung von Kraft wichtig sind. In Abb. 17A ist schematisch die mutmaßliche subzelluläre Lokalisation der Phosphodiesterasen 2-4 dargestellt. PDE2-4 sind bei LTCC, PDE3 und PDE4 bei PLB, PDE4 bei G-Protein gekoppelten Rezeptoren, RYR und Myofibrillen lokalisiert, PDE2 ist auch im Zytosol vorzufinden. PDE3 und PDE4 sind auch am Zellkern lokalisiert (Bobin et al. 2016).

Bei der alleinigen Hemmung von PDE2 oder PDE3 wurde eine Abnahme der Potenz von 5-HT auf die Kontraktionskraft beobachtet. Es ist aber fraglich, ob die PDEs dafür verantwortlich sind, diese Effekte können auch durch eine Desensitivierung der 5-HT Rezeptoren erklärbar sein.

Eine Steigerung der Kraft und Frequenz durch alleinige PDE2 Hemmung mit EHNA ist nicht möglich, weil PDE2 im Kompartiment in Nähe des LTCC vorkommt, in diesem Kompartiment können PDE3 und PDE4 die Funktion von PDE2 mitübernehmen.

Die Hemmung von PDE3 mit Cilostamid würde ebenfalls am LTCC angreifen, was allein aber nicht ausreichen würde, um cAMP zu erhöhen, weil PDE4 und PDE2 in diesem Kompartiment weiter aktiv sind. Effekte am LTCC werden durch Hemmung einer einzelnen PDE nicht messbar, da in diesem Kompartiment mehrere PDEs aktiv sind.

Die alleinige PDE4-Hemmung zeigte eine Erhöhung der Potenz von 5-HT auf die Kontraktionskraft, eine Desensitivierung der 5-HT-Rezeptoren könnte auch hier vorliegen, die aber durch die besonders hohe cAMP-Konzentration eventuell nicht sichtbar wurde. PDE4 hat regulierenden Einfluss direkt an G-Protein gekoppelten Rezeptoren, wo die primäre Generierung von cAMP vermindert wird, auf die Sensitivität der Myofilamente, des PLB und der Ryanodinrezeptoren, ein wichtiger Mechanismus der Ca^{2+} -Wiederaufnahme und Freisetzung und die Phosphorylierung von LTCC wird beeinflusst. Die PDE-Isoform, die in den meisten Kompartiments vorkommt, ist PDE4 und daher hat auch schon die alleinige Hemmung von PDE4 einen Effekt. Während PDE2 und PDE3 nur in relativ wenigen Kompartimenten vorkommen und deren alleinige Hemmung nicht ausreichend ist, um mit

unseren Messmethoden sichtbar zu werden. PDE4 hat daher den wesentlichen Anteil an der Regulation der 5-HT vermittelten Inotropie.

Kombinierte PDE-Hemmungen erzeugen stärkere Effekte, als eine alleinige PDE4-Hemmung mit Rolipram. Im Kompartiment in der Nähe zu SERCA sind PDE3 und PDE4 gemeinsam lokalisiert, bei einer kombinierten Hemmung hat man einen stärkeren Effekt. In gleicher Weise verhält es sich im Kompartiment in der Nähe zu LTCC.

In Tab.4 sind basierend auf den Ergebnissen dieser Studie mit PDE-Hemmstoffen die Auswirkungen der PDE-Isoenzyme auf die Kontraktionskraft und Schlagfrequenz von Vorhöfen von TG-Mäusen, die den humanen 5-HT₄-Rezeptor im Herzen überexprimieren, in Abwesenheit oder Anwesenheit von 5-HT dargestellt.

Die in der Literatur postulierte unterschiedliche subzelluläre Verteilung der einzelnen PDEs spiegelt sich in den Ergebnissen dieser Arbeit wieder, denn durch die Hemmung von PDE4 mit Rolipram wird auch der stärkste Effekt auf die Kontraktionskraft hervorgerufen.

Abb. 17B zeigt ein Schema der mutmaßlichen subzellulären Kompartimente, zur Regulation des Herzschlags bei 5-HT₄-Rezeptor überexprimierenden Mäusen (TG) unter basalen Bedingungen oder bei 5-HT₄-Rezeptorstimulation (modifiziert nach Kaumann 2011 und Younes et al. 2008).

Zur Regulierung der Frequenz wirkt einerseits cAMP als direkter Ligand am I_f-Kanal, wodurch das Schwellenpotential zur Erzeugung eines Aktionspotential schneller erreicht wird, andererseits kann PKA den L-Typ-Calciumkanal (I_{Ca}) oder I_K-Kanal phosphorylieren und die Aktionspotentiale verkürzen sich. Alternativ kann PKA das PLB phosphorylieren und so indirekt die Ca²⁺-Aufnahme in das SR über SERCA erhöhen. Die Ca²⁺-Konzentration im SR steigt an und es kann zu einer gesteigerten Ca²⁺-Freisetzung über den RyR kommen (Bers 2008). Dieses Ca²⁺ wird durch den Natrium-Calcium-Austauscher aufgenommen, was zu einer Depolarisation der Sinuszelle führt (Kaumann 2011 und Younes et al. 2008).

Bei den konstitutiv aktiven AC (1,4,8) reicht eine Hemmung von PDE4 allein nicht aus, das cAMP wird erst deutlich mehr wenn PDE3 und PDE4 gemeinsam gehemmt werden und es kommt zu einem Anstieg der Frequenz.

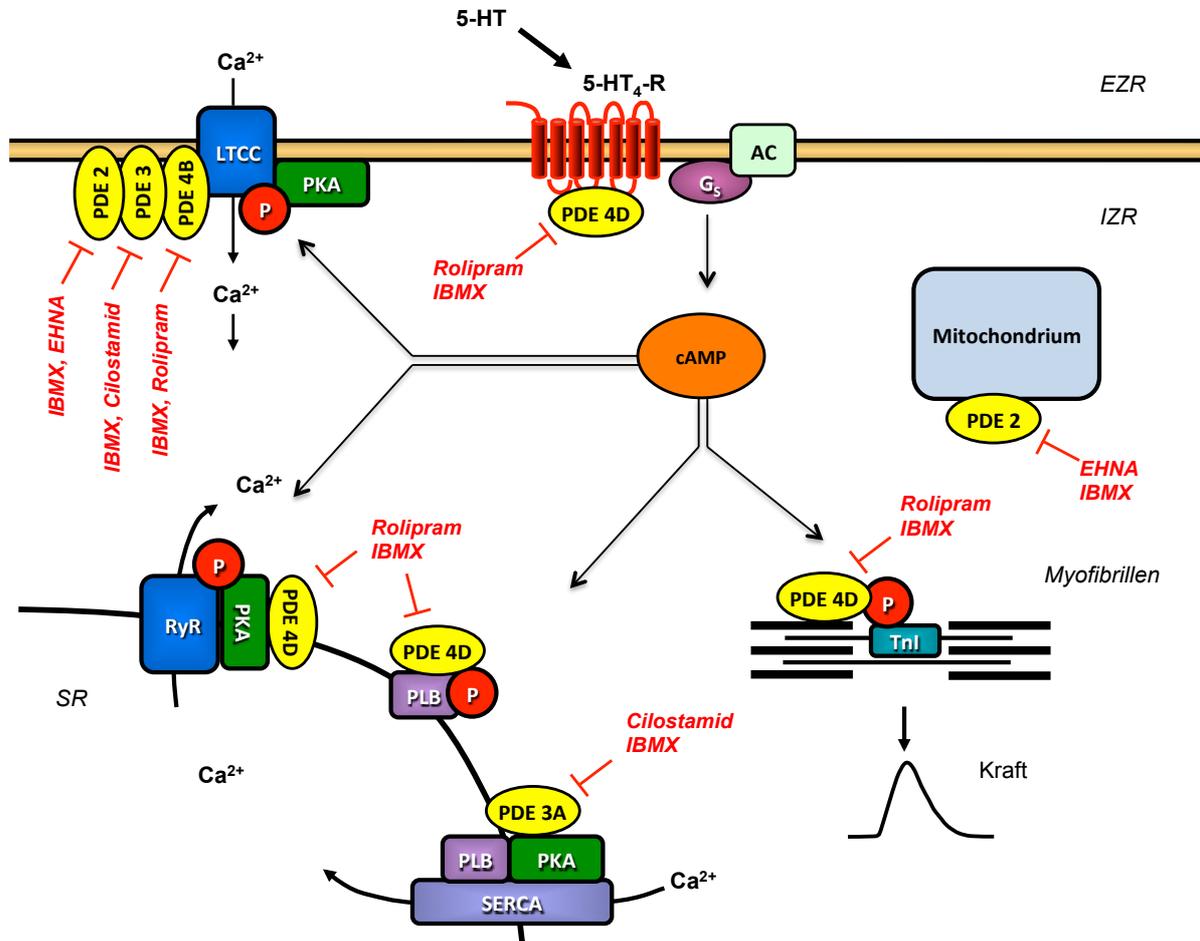
Es könnte sein, dass die PDE die am 5-HT₄-Rezeptor lokalisiert ist, allein für die Frequenz keine entscheidende Rolle spielt. Erst bei der Hemmung von PDE3 und PDE4 ist der cAMP Überschuss in der Zelle so groß, dass der I_f-Kanal verstärkt aktiviert wird.

Alle anderen Kanäle werden über PKA phosphoryliert, man würde die gleichen Mechanismen erwarten wie bei der Kontraktionskraft.

Die getesteten PDEs haben einzeln keinen Einfluss auf die Frequenz. Wenn nur eine PDE-Isoform gehemmt wird, reicht es nicht aus, um die Aktivität des I_f-Kanals zu beeinflussen. Der cAMP Spiegel im Sinusknoten wird dadurch nicht verändert oder ist in unserem System nicht messbar. Für die Regulierung der Frequenz muss es noch andere PDEs geben die beteiligt sind, da IBMX und die kombinierte PDE3- und PDE4-Hemmung einen Effekt hatten. PDE4 könnte dabei auch eine Rolle

spielen, aber nur in Kombinationen mit anderen PDEs, da Rolipram allein keine Wirkung auf die Frequenz hatte.

A



B

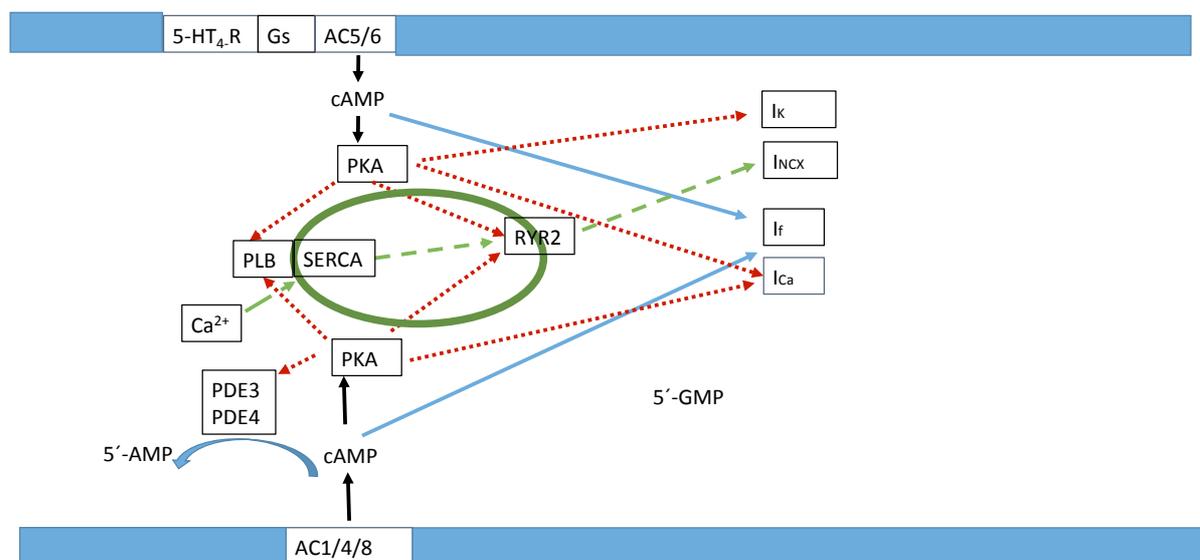


Abb. 17: Signalwege in Kardiomyozyten bei 5-HT₄- Rezeptorstimulation

(A) Schematische Darstellung der Signaltransduktion in Kardiomyozyten und die mutmaßliche subzelluläre Lokalisation der Phosphodiesterasen 2-4 (modifiziert nach Bobin et al. 2016) sowie ihre Hemmstoffe, die in dieser Arbeit verwendet wurden. PDE2-4 sind bei LTCC, PDE3 und PDE4 bei PLB, PDE4 bei G-Protein gekoppelten Rezeptoren, RYR und Myofibrillen lokalisiert, PDE2 ist auch im Zytosol vorzufinden. PDE3 und PDE4 sind auch am Zellkern lokalisiert (hier nicht dargestellt). Ca^{2+} gelangt über den L-Typ- Ca^{2+} -Kanal (LTCC) in die Herzmuskelzelle. Dieser Prozess kann durch 5-HT über eine Kaskade verstärkt werden. 5-HT bindet an den 5-HT_4 -Rezeptor und bewirkt über das stimulierende G_s -Protein eine Aktivitätssteigerung der Adenylatzyklase im Sarkolemm. In der Folge steigt der cAMP-Spiegel, welcher die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) stimuliert. Die PKA phosphoryliert das Phospholamban (PLB), Ryanodin-Rezeptoren (RyR), L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle, Troponin I (Tnl) und andere regulatorische Proteine. Dies bewirkt eine Zunahme der Kontraktionskraft und eine schnellere Relaxation der Herzmuskelzelle. Die sogenannte „Calcium-induzierte Calciumfreisetzung“ führt zu vermehrten Ca^{2+} -Freisetzung über den RyR aus dem SR in das Zytosol, wo Ca^{2+} Myofibrillen aktiviert und zur stärkeren Kontraktionskraft führt. In der Diastole wird Ca^{2+} über die sarkoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) in das SR aufgenommen. Die Aktivität von SERCA ist höher, wenn der Phosphorylierungszustand von PLB durch PKA erhöht ist.

(B) Ein Schema der mutmaßlichen subzellulären Regulation des Herzschlags bei 5-HT_4 -Rezeptor überexprimierenden Mäusen (TG) unter basalen Bedingungen oder bei 5-HT_4 -Rezeptorstimulation (modifiziert nach Kaumann 2011 und Younes et al. 2008). Die 5-HT_4 -Rezeptorstimulation mit Serotonin (5-HT) erhöht über G_s -Proteine (G_s) die Aktivität der Adenylatzyklase (Isoformen AC5/6) im Sarkolemm und die anschließende Produktion von cAMP, welches die cAMP abhängige PKA aktiviert. PKA kann die Depolarisation durch Phosphorylierungen vom LTCC (I_{Ca}) oder I_{K} -Kanal beschleunigen. Außerdem kann cAMP den I_{f} -Kanal direkt aktivieren. Alternativ kann PKA Phospholamban (PLB) phosphorylieren und so indirekt die Ca^{2+} -Aufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum (SR) über SERCA erhöhen. Die Ca^{2+} -Konzentration im SR steigt an und es kann zu einer gesteigerten Ca^{2+} -Freisetzung über den Ryanodin-Rezeptor (RYR2) kommen. Dieses Ca^{2+} wird durch den Natrium-Calcium-Austauscher aufgenommen, was zu einer Depolarisation der Sinuszelle führt. Unter basalen Bedingungen sind AC in der Plasmamembran intrinsisch aktiv (AC1/4/8 –Isoformen können durch Ca^{2+} aktiviert werden) und cAMP wird vermehrt generiert und in der Folge die Aktivität von PKA gesteigert.

Tabelle 4: Synopsis der PDE-Effekte in TG

Basierend auf der vorliegenden Arbeit mit PDE-Hemmstoffen: PDE-Isoenzyme reduzieren (\downarrow), erhöhen (\uparrow), sind inaktiv (0) oder sind nicht interpretierbar (?) in ihren Auswirkungen auf die Kontraktionskraft und Schlagfrequenz von Vorhöfen von TG-Mäusen, die den humanen 5-HT_4 -Rezeptor im Herzen überexprimieren, in Abwesenheit (-) oder Anwesenheit (+) von 5-HT. Phosphodiesterase (PDE), 3-isobutyl-1-methyl-xanthin (IBMX).

	Kontraktionskraft	Kontraktionskraft	Frequenz	Frequenz
5-HT Anwesenheit	-	+	-	+
PDE-Isoenzyme				
2	0	\uparrow	0	0
3	0	\uparrow	0	0
4	\downarrow	\downarrow	0	0
IBMX sensitive PDEs	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow
2 + 3	0	\uparrow	0	0
2 + 4	\downarrow	\downarrow	0	?
3 + 4	\downarrow	?	\downarrow	?
2 + 3 + 4	\downarrow	?	\downarrow	?

4.7 Ausblick

Eine Einschränkung der vorliegenden Arbeit ist der Mangel an biochemischen Daten. In weiterführenden Versuchen sollte geklärt werden, ob PDE-bedingte Änderungen der Kraft und der Schlagrate mit entsprechenden Änderungen von Proteinphosphorylierungen korrelieren. Insbesondere könnte die Wirkung von PDE-Inhibitoren in Gegenwart von 5-HT auf die Phospholambanphosphorylierung in linken und rechten Vorhöfen untersucht werden. Es ist zu erwarten, dass eine Phospholambanphosphorylierung nur im linken Vorhof von TG durch die Kombination von PDE-Inhibitoren und 5-HT verstärkt wird, nicht jedoch in linksatrialen Präparaten von WT. In rechten Vorhöfen von TG- und WT-Mäusen könnte der Einfluss von PDEs und 5-HT auf die Aktivität von Ionenkanälen näher untersucht werden. Da 5-HT auch inotrope und chronotrope Wirkungen am Ventrikel von TG-Mäusen vermittelt, jedoch nicht in WT-Mäusen (Gergs et al. 2010), wäre es von Bedeutung zu wissen, ob regionale Unterschiede (Atrium vs. Ventrikel) in der Interaktion zwischen spezifischen PDE-Inhibitoren und 5-HT bestehen. Es könnten nach Langendorff perfundierte Herzen und isolierte ventrikuläre Kardiomyozyten von TG- und WT-Mäusen mit PDE-Inhibitoren untersucht werden. Es ist zu klären, ob die in dieser Studie verwendeten PDE-Inhibitoren die positiv inotropen Wirkungen von 5-HT in ventrikulären Präparaten von TG-Mäusen auf die gleiche Weise verändern.

5 Zusammenfassung

Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) vermittelt einen konzentrationsabhängigen positiv inotropen Effekt (PIE) und positiv chronotropen Effekt (PCE) in linken bzw. rechten Vorhöfen transgener Mäuse, die den humanen 5-HT_{4a}-Rezeptor im Herzen überexprimieren (= TG). Bei den Wildtyp-Geschwistertieren (= WT) übt 5-HT hingegen keinen Einfluss auf Kontraktionskraft und Frequenz aus. PIE und PCE werden durch zyklisches AMP in Herzen von TG-Tieren vermittelt, welches nach 5-HT₄-Rezeptorstimulation generiert wird. In der Herzmuskelzelle gibt es mehrere subzelluläre Regionen, die für die Regulierung der Kontraktionskraft und Frequenz bedeutend sind. In diesen speziellen Regionen sind wiederum bestimmte PDE-Isoformen lokalisiert und erzeugen physiologisch voneinander getrennte cAMP-Pools. PDEs nehmen eine zentrale Stellung in der räumlichen cAMP-Regulierung und zellulären Signalübertragungen ein. Um zu untersuchen, welche der endogenen PDEs, bei der Regulation dieser Effekte bedeutend sind, wurden Kontraktions- und Frequenzmessungen an isolierten elektrisch gereizten linken und spontan schlagenden rechten Herzvorhöfen von TG- und WT-Mäusen durchgeführt. Der PIE von 5-HT wurde in Anwesenheit der PDE-Hemmstoffe EHNA (10⁻⁶ M, PDE2-Hemmstoff), Cilostamid (10⁻⁶ M, PDE3-Hemmstoff), Rolipram (10⁻⁶ M und 10⁻⁷ M, PDE4-Hemmstoff) und deren Kombinationen untersucht. Zudem wurde auch ein Vergleich mit dem unselektiven PDE-Hemmstoff IBMX (10⁻⁵ M und 10⁻⁶ M) durchgeführt. Mithin scheinen PDE2, 3 und 4 an der Modulation der Kontraktionskraft von linken TG-Vorhöfen beteiligt zu sein. Der größte Einfluss auf die Kontraktionskraft wurde beobachtet, wenn alle drei PDE-Isoformen gleichzeitig gehemmt waren. Unter diesen PDE-Isoformen ist wohl PDE4 am wichtigsten.

Bei der Regulierung der Frequenz sind andere PDEs beteiligt. PDE4 könnte dabei auch eine Rolle spielen, aber nur in Kombinationen mit anderen PDEs.

In WT-Vorhöfen konnte kein PDE-Hemmstoff allein und auch keine PDE-Hemmstoffkombination einen larvierten 5-HT-vermittelten PIE oder PCE offenlegen.

6 Literaturverzeichnis

Abi-Gerges A, Richter W, Lefebvre F, Mateo P, Varin A, Heymes C, Samuel JL, Lugnier C, Conti M, Fischmeister R, Vandecasteele G (2009) Decreased expression and activity of cAMP phosphodiesterases in cardiac hypertrophy and its impact on beta-adrenergic cAMP signals. *Circ Res* 105:784-792.

Afzal F, Andressen KW, Mørk HK, Aronsen JM, Sjaastad I, Dahl CP, Skomedal T, Levy FO, Osnes JB, Qvigstad E (2008) 5-HT₄-elicited positive inotropic response is mediated by cAMP and regulated by PDE3 in failing rat and human cardiac ventricles. *Br J Pharmacol* 55:1005-1014.

Ahmad F, Murata T, Shimizu K, Degerman E, Maurice D, Manganiello V (2015) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Important signaling modulators and therapeutic targets. *Oral Dis.*, 21, e25–e50.

Baganz NL, Blakely RD (2013) A dialogue between the immune system and brain, spoken in the language of serotonin. *ACS Chemical Neuroscience.*;4:48-6

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

Berk E, Christ T, Schwarz S, Ravens U, Knaut M, Kaumann AJ (2016) In permanent atrial fibrillation, PDE3 reduces force responses to 5-HT, but PDE3 and PDE4 do not cause the blunting of atrial arrhythmias. *Br J Pharmacol* 173:2478-2489.

Bers DM (2008) Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol* 70:23-49.

Bethke T, Klimkiewicz A, Kohl C, v d Leyen H, Mehl H, Mende U, Meyer W, Neumann J, Schmitz W, Scholz H, Starbatty J, Stein B, Wenzlaff H, Döring V, Kalmár P, Haverich A (1991) Effects of isomazole on force of contraction and phosphodiesterase isoenzymes I-IV in nonfailing and failing human hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 18:386-397.

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. *FEBS Lett* 412:465-474.

Bobin P, Belacel-Ouari M, Bedioune I, Zhang L, Leroy J, Leblais V, Fischmeister R, Vandecasteele G (2016) Cyclic nucleotide phosphodiesterases in heart and vessels: A therapeutic perspective. *Arch Cardiovasc Dis* 109:431-443.

Brattelid T, Qvigstad E, Lynham JA, Molenaar P, Aass H, Geiran O, Skomedal T, Osnes JB, Levy FO, Kaumann AJ (2004) Functional serotonin 5-HT₄ receptors in porcine and human ventricular myocardium with increased 5-HT₄ mRNA in heart failure. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 370:157-166.

Brattelid T, Qvigstad E, Moltzau LR, Bekkevold SV, Sandnes DL, Birkeland JA, Skomedal T, Osnes JB, Sjaastad I, Levy FO (2012) The cardiac ventricular 5-HT₄ receptor is functional in late foetal development and is reactivated in heart failure. *PLoS One* 7:e45489.

Chan SH, Chan JY (2017) Phosphodiesterase 2 as a Therapeutic Target for Heart Failure: Is Upregulation an Option? *Circ Res* 120:13-16.

Chiu YJ, Hu SH, Reid IA (1999) Inhibition of phosphodiesterase III with milrinone increases renin secretion in human subjects. *J Pharmacol Exp Ther* 290:16-19

Conti M, Beavo J (2007) Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu Rev Biochem* 76:481–511.

Conti M, Mika D, Richter W (2014) Cyclic AMP compartments and signaling specificity: Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J. Gen. Physiol.* 143, 29–38

- Dal Piaz V, Giovannoni MP (2000) Phosphodiesterase 4 inhibitors, structurally unrelated to rolipram, as promising agents for the treatment of asthma and other pathologies. *Eur J Med Chem* 35(5):463–480
- D'Andrea MR, Qiu Y, Haynes-Johnson D, Bhattacharjee S, Kraft P, Lundeen S (2005) Expression of PDE11A in normal and malignant human tissues. *J Histochem Cytochem* 53:895-903.
- De Maeyer JH, Aerssens J, Verhasselt P, Lefebvre RA (2008) Alternative splicing and exon duplication generates 10 unique porcine 5-HT₄ receptor splice variants including a functional homofusion variant. *Physiol Genomics* 34:22-33.
- De Maeyer JH, Prins NH, Schuurkes JA, Lefebvre RA (2006) Differential effects of 5-hydroxytryptamine₄ receptor agonists at gastric versus cardiac receptors: an operational framework to explain and quantify organ-specific behavior. *J Pharmacol Exp Ther* 317:955-964.
- Dumuis A, Bouhelal R, Sebben M, Cory R, Bockaert J (1988) A nonclassical 5-hydroxytryptamine receptor positively coupled with adenylate cyclase in the central nervous system. *Mol Pharmacol* 34:880-887
- Erspamer V, Asero B (1952) Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature* 169:800-801
- Fabiato A, Fabiato F (1975) Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J Physiol* 249:469-495
- Francis SH, Blount MA, Corbin JD (2011) Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: Molecular mechanisms and physiological functions. *Physiol. Rev.* 91, 651–690.
- Galindo-Tovar A, Kaumann AJ (2008) Phosphodiesterase-4 blunts inotropism and arrhythmias but not sinoatrial tachycardia of (-)-adrenaline mediated through mouse cardiac beta(1)-adrenoceptors. *Br J Pharmacol* 153:710-720.
- Galindo-Tovar A, Vargas ML, Escudero E, Kaumann AJ (2009) Ontogenic changes of the control by phosphodiesterase-3 and -4 of 5-HT responses in porcine heart and relevance to human atrial 5-HT₄ receptors. *Br J Pharmacol* 156:237-249.
- Galindo-Tovar A, Vargas ML, Kaumann AJ (2016) Inhibitors of phosphodiesterases PDE2, PDE3, and PDE4 do not increase the sinoatrial tachycardia of noradrenaline and prostaglandin PGE₁ in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 389:177-186.
- Galindo-Tovar A, Vargas ML, Kaumann AJ (2018) Phosphodiesterase PDE2 activity, increased by isoprenaline, does not reduce β -adrenoceptor-mediated chronotropic and inotropic effects in rat heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* doi: 10.1007/s00210-018-1480
- Gergs U, Neumann J, Simm A, Silber RE, Remmers FO, Laer S (2009) Phosphorylation of phospholamban and troponin I through 5-HT₄ receptors in the isolated human atrium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 379:349-359.
- Gergs U, Baumann M, Böckler A, Buchwalow IB, Ebelt H, Fabritz L, Günther S, Hauptmann S, Kirchhof P, Klöckner U, Pönicke K, Rückschloß U, Schmitz W, Schulz N, Werner F, Neumann J (2010) Cardiac overexpression of the human 5-HT₄-receptor in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299:H788-H798.
- Gergs U, Böckler A, Ebelt H, Hauptmann S, Keller N, Otto V, Pönicke K, Schmitz W, Neumann J (2013) Human 5-HT₄-receptor stimulation in atria of transgenic mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 386:357-367.
- Hatzelmann A, Schudt C (2001) Anti-inflammatory and immunomodulatory potential of the novel PDE4 inhibitor roflumilast in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001, 297, 267–279.
- Hayashi M, Matsushima K, Ohashi H, Tsunoda H, Murase S, Kawarada Y, Tanaka T (1998) Molecular cloning and characterization of human PDE8B, a novel thyroid-specific isozyme of 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun* 250:751-756.

- Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP (1994) International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev* 46:157-203.
- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 71:533-554.
- Hua R, Adamczyk A, Robbins C, Ray G, Rose RA (2012) Distinct patterns of constitutive phosphodiesterase activity in mouse sinoatrial node and atrial myocardium. *PLoS One* 7:e47652.
- Isidori AM, Cornacchione M, Barbagallo F, Di Grazia A, Barrios F, Fassina L, Monaco L, Giannetta E, Gianfrilli D, Garofalo S, Zhang X, Chen X, Xiang YK, Lenzi A, Pellegrini M, Naro F (2015) Inhibition of type 5 phosphodiesterase counteracts β 2-adrenergic signalling in beating cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 106:408-420.
- Jahnel U, Rupp J, Ertl R, Nawrath H (1992) Positive inotropic response to 5-HT in human atrial but not in ventricular heart muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 34:482-5.
- Johnson WB, Katugampola S, Able S, Napier C, Harding SE (2012) Profiling of cAMP and cGMP phosphodiesterases in isolated ventricular cardiomyocytes from human hearts: comparison with rat and guinea pig. *Life Sci* 90:328-336.
- Kaumann AJ, Sanders L, Brown AM, Murray KJ, Brown MJ (1990) A 5-hydroxytryptamine receptor in human atrium. *Br J Pharmacol* 100:879-885.
- Kaumann AJ, Sanders L (1994) 5-Hydroxytryptamine causes rate-dependent arrhythmias through 5-HT₄ receptors in human atrium: facilitation by chronic beta-adrenoceptor blockade. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 349:331-337.
- Kaumann AJ (2011) Phosphodiesterases reduce spontaneous sinoatrial beating but not the 'fight or flight' tachycardia elicited by agonists through Gs-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 32:377-383.
- Kim GE, Kass DA (2017) Cardiac phosphodiesterases and their modulation for treating heart disease. *Handb Exp Pharmacol* 243:249–269.
- 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* 11:771-778.
- Kloner RA, Chaitman B (2017) Angina and its management. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 22(3):199–209.
- Knight WE, Chen S, Zhang Y, Oikawa M, Wu M, Zhou Q, Miller CL, Cai Y, Mickelsen DM, Moravec C, Small EM, Abe J, Yan C (2016) PDE1C deficiency antagonizes pathological cardiac remodeling and dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* pii: 201607728.
- Kritzer M D, Li , Dodge-Kafka K, Kapiloff M S (2012) AKAPs: The architectural underpinnings of local cAMP signaling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 52, 351–358.
- Läer S, Remmers F, Stein B, Scholz H, Müller FU, Neumann J (1998) Receptor mechanisms involved in 5-HT induced inotropic action in the rat isolated atrium. *Br J Pharmacol* 123: 1182-1188.
- Lehnart SE, Wehrens XH, Reiken S, Warriar S, Belevych AE, Harvey RD, Richter W, Jin SL, Conti M, Marks AR (2005) Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell* 123:25-35.
- Leroy J, PhD Fischmeister R (2018) Inhibit a Phosphodiesterase to Treat Heart Failure? *Circulation*. 2018;138:2003–2006. DOI: 10.1161
- Lezoualc'h F, Steplewski K, Sartiani L, Mugelli A, Fischmeister R, Bril A (2007) Quantitative mRNA analysis of serotonin 5-HT₄ receptor isoforms, calcium handling proteins and ion channels in human atrial fibrillation. *Biochem Biophys Res Commun* 357:218-224.

- Lloyd-Jones DM, Wang TG, Leip EP, Larson MG, Levy D, Vasan RS, D'Agostino RB, Massaro JM, Beiser A, Wolf PA, Benjamin EJ (2004) Lifetime risk for development of atrial fibrillation: the Framingham Heart Study. *Circulation* 110(9):1042-6.
- Lugnier C (2006) Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: A new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol. Ther.* 109, 366–398.
- Maurice DH, Ke H, Ahmad F, Wang Y, Chung J, Manganiello VC (2014) Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Nat Rev Drug Discov* 13:290-314.
- McCormick K, Baillie GS (2014) Compartmentalisation of second messenger signalling pathways. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 20–25.
- Movsesian M, Ahmad F, Hirsch E (2018) Functions of PDE3 Isoforms in Cardiac Muscle. *J Cardiovasc Dev Dis* 5. pii: E10.
- Neumann J, Hofmann B, Gergs U (2017) Production and function of serotonin in cardiac cells. (Kaneez Fatima Shad) pp 271-305, Intech, London.
- Nikolaev VO, Bünemann M, Schmitteckert E, Lohse MJ, Engelhardt S (2006) Cyclic AMP imaging in adult cardiac myocytes reveals far-reaching beta1-adrenergic but locally confined beta2-adrenergic receptor-mediated signaling. *Circ Res* 99:1084-1091.
- Orstavik O, Ata SH, Riise J, Dahl CP, Andersen GØ, Levy FO, Skomedal T, Osnes JB, Qvigstad E (2014) Inhibition of phosphodiesterase-3 by levosimendan is sufficient to account for its inotropic effect in failing human heart. *Br J Pharmacol* 171(23):5169–5181.
- 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. *Mol Pharmacol* 41:346-351.
- Packer M, Carver JR, Rodeheffer RJ, Ivanhoe RJ, DiBianco R, Zeldis SM, Hendrix GH, Bommer WJ, Elkayam U, Kukin ML, Mallis GI, Sollano JA, Shannon J, Tandon PK, DeMets DL (1991) Effect of oral milrinone on mortality in severe chronic heart failure. The PROMISE Study Research Group. *N Engl J Med* 325(21):1468–1475
- Peroutka SJ, Howell TA (1994) The molecular evolution of G protein-coupled receptors: focus on 5-hydroxytryptamine receptors. *Neuropharmacology* 33:319-24.
- Pino R, Cerbai E, Calamai G, Alajmo F, Borgioli A, Braconi L, Cassai M, Montesi GF, Mugelli A (1998) Effect of 5-HT4 receptor stimulation on the pacemaker current I(f) in human isolated atrial myocytes. *Cardiovasc Res* 40:516-522.
- Popova NK (2006) From genes to aggressive behavior: the role of serotonergic system. *Bioessays* 28:495-503.
- Rabe KF, Bateman ED, O'Donnell D, Witte S, Bredenbröker D, Bethke TD (2005) Roflumilast--an oral anti-inflammatory treatment for chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. *Lancet* 366:563-71.
- Ramakrishna A, Giridhar P, Ravishankar GA (2011) Phytoserotonin: a review. *Plant Signal Behav.* 6(6):800-9.
- Rapport MM, Green AA, Page IH (1948) Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J Biol Chem* 176:1243-1251.
- Richter W, Xie M, Scheitrum C, Krall J, Movsesian MA, Conti M (2011) Conserved expression and functions of PDE4 in rodent and human heart. *Basic Res Cardiol.* 106:249-262.
- Robiolio PA, Rigolin VH, Wilson JS, Harrison JK, Sanders LL, Bashore TM, Feldman JM (1995) Carcinoid heart disease. Correlation of high serotonin levels with valvular abnormalities detected by cardiac catheterization and echocardiography. *Circulation* 92:790-795.

- Sambrook J, Russel DW: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.3.Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001, pp. 6.23-6.27.
- Shajib MS, Khan W (2015) The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation. *Acta Physiol (Oxf)* 213(3):561-74.
- Soderling SH, Bayuga SJ, Beavo JA (1999) Isolation and characterization of a dual-substrate phosphodiesterase gene family: PDE10A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7071-7076.
- Solaro RJ, Rarick HM (1998) Troponin and Tropomyosin; Proteins That Switch on and Tune in the Activity of Cardiac Myofilaments. *Circulation Research* 83:471–480. doi:10.1161/01.RES.83.5.471.
- Takano S (1995) Role of 5-hydroxytryptamine in platelet thrombus formation and mechanisms of inhibition of thrombus formation by 5-hydroxytryptamine_{2A} antagonists in rabbits. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 330:297-308.
- Verbeuren TJ: The distribution and biochemistry of 5-HT in the cardiovascular system. In: Saxena PR, Wallis KI, Wouters W, Bevan P (ed.): *Cardiovascular pharmacology of 5- Hydroxytryptamine*. Kluwer, Dordrecht. 1990,pp. 3.13.
- Vinogradova TM, Lakatta EG (2009) Regulation of basal and reserve cardiac pacemaker function by interactions of cAMP-mediated PKA-dependent Ca²⁺ cycling with surface membrane channels. *J Mol Cell Cardiol* 47:456-474.
- Wang P, Wu P, Egan RW, Billah MM (2000) Cloning, characterization, and tissue distribution of mouse phosphodiesterase 7A1. *Biochem Biophys Res Commun* 276:1271-1277.
- Wang P, Wu P, Egan RW, Billah MM (2003) Identification and characterization of a new human type 9 cGMP-specific phosphodiesterase splice variant (PDE9A5). Differential tissue distribution and subcellular localization of PDE9A variants. *Gene* 314:15-27.
- Wang X, Yamada S, LaRiviere WB, Ye H, Bakeberg JL, Irazabal MV, Chebib FT, van Deursen J, Harris PC, Sussman CR, Behfar A, Ward CJ, Torres VE (2017) Generation and phenotypic characterization of Pde1a mutant mice. *PLoS One* 12:e0181087.
- Weninger S, De Maeyer JH, Lefebvre RA (2012) Study of the regulation of the inotropic response to 5-HT₄ receptor activation via phosphodiesterases and its cross-talk with C-type natriuretic peptide in porcine left atrium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 385:565-577.
- Wilkinson LO, Dourish CT (1991) In serotonin receptor subtypes: Basic and clinical aspects. ed. Peroutka SJ. Wiley-Liss, New York 15:147-210.
- Xu J, Jian B, Chu R, Lu Z, Li Q, Dunlop J, Rosenzweig-Lipson S, McGonigle P, Levy RJ, Liang B (2002) Serotonin mechanisms in heart valve disease II: the 5-HT₂ receptor and its signaling pathway in aortic valve interstitial cells. *Am J Pathol* 161:2209-2218.
- Yusuf S, Al-Saady N, Camm AJ (2003) 5-hydroxytryptamine and atrial fibrillation: how significant is this piece in the puzzle? *J Cardiovasc Electrophysiol* 14:209-14.
- Zaccolo M (2006) Phosphodiesterases and compartmentalised cAMP signalling in the heart. *Eur. J. Cell Biol.* 85, 693–697.
- Zoraghi R, Corbin JD, Francis SH (2006) Phosphodiesterase-5 Gln817 is critical for cGMP, vardenafil, or sildenafil affinity: its orientation impacts cGMP but not cAMP affinity. *J Biol Chem* 281:5553-5558.

7 Thesen

1. Es wurde ein transgenes Tiermodell der Maus mit Überexpression von humanen Serotoninrezeptoren vom Typ 4a generiert.
2. Serotonin wirkt an isolierten Vorhöfen von transgenen Mäusen, die den 5-HT_{4a}- Rezeptor überexprimieren positiv inotrop und chronotrop.
3. Serotonin übt keine Wirkung auf die Kontraktionskraft und Frequenz an isolierten Vorhöfen von Wildtyp-Geschwistertieren aus.
4. PDE-Hemmstoffe konnten in WT-Vorhöfen keinen larvierten 5-HT-vermittelten positiv inotropen Effekt oder positiv chronotropen Effekt offenlegen.
5. Phosphodiesterasen nehmen eine zentrale Stellung in der räumlichen cAMP-Regulierung und zellulären Signalübertragungen ein.
6. PDE2, 3 und 4 modulieren die Kontraktionskraft von linken transgenen Vörhöfen, wobei PDE4 den größten Einfluss hat.
7. Das Tiermodell mit 5-HT_{4a}- Rezeptor-Expression ist wichtig in der Erforschung von chronischer Herzinsuffizienz.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Benedikt Käufler
Wohnort	Wühlischstraße 12, 10245 Berlin
Geburtstag und –Ort	15.04.1984 in Rotenburg (Wümme)
Familienstand	verheiratet
Nationalität	deutsch

Schulabschluss

2004	Abitur, Gymnasium am Wall, Verden
------	-----------------------------------

Universität

2007 – 2013	Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle, Approbation im Herbst 2013
-------------	--

Berufserfahrung

07/2014 – 11/2015	Assistenzarzt, Caritas-Klinik Pankow
12/2015 – heute	Assistenzarzt, Sana-Klinikum Berlin-Lichtenberg

Erklärungen

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

(2) Erklärung zum Wahrheitsgehalt der Angaben

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

(3) Eidesstattliche Erklärung

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

Publikationen

Neumann J, Käufler B, Gergs U (2019) Which phosphodiesterase can decrease cardiac effects of 5-HT₄-receptor activation in transgenic mice? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 392:991-1004

Neumann J, Käufler B, Gergs U (2018) Evidence for 5-HT₄ signal transduction via phosphodiesterases (PDEs) in transgenic mice. *International Society for Serotonin Research, Cork, Abstractbook 125: # M-2*

Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. Joachim Neumann danken, mir diese Doktorarbeit ermöglicht zu haben. Von Beginn an habe ich die wissenschaftliche Begleitung, Hilfestellung und Geduld in höchstem Maße zu schätzen gewusst.

Ein großer Dank geht an Herrn Dr. rer. nat. Ulrich Gergs für die Betreuung, die wertvollen Anregungen und konstruktive Unterstützung.

Ganz herzlichen Dank an Frau Reber, die mich stetig im Verlauf der Doktorarbeit begleitet hat.

Zum Schluss möchte ich mich bei meinem Vater bedanken, der mich durchweg immer unterstützt hat.