

Medizinische Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Charakterisierung isoliert perfundierter Herzen von Serotonin-5-HT_{4a}-Rezeptor
überexprimierenden Mäusen**

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

von Constanze Theresa Schmidbaur
geboren am 30. Dezember 1994 in Landsberg am Lech

Betreuer: Prof. Dr. med. Joachim Neumann

Gutachter

- 1.) Prof. Dr. med. S. Dhein, Altenburg
- 2.) Prof. Dr. med. W.-H. Zimmerman, Göttingen

06.04.2021

19.10.2021

Referat

Momentan können sieben verschiedene Subtypen von Serotonin-Rezeptoren unterschieden werden. Ein Subtyp, der 5-HT_{4a}-Rezeptor, wird in Vorhöfen und Ventrikeln des menschlichen Herzes exprimiert und dient als Mediator für positiv inotrope, chronotrope und proarrhythmische Effekte. Da der Rezeptor in Mäuseherzen funktionell nicht nachweisbar ist, wurden transgene Mäuse generiert, die den menschlichen 5-HT_{4a}-Rezeptor spezifisch in Kardiomyocyten exprimieren. Serotonin kann bei diesen transgenen Mäusen (TG), im Vergleich zu einer Kontrollgruppe von Wildtyp-Geschwistertieren (WT), positiv inotrope, chronotrope und proarrhythmische Effekte erzeugen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob und in wie weit der humane 5-HT_{4a}-Rezeptor Einfluss auf die kardiale Aktivität des Mauseherzen *in vitro* nimmt. Insbesondere sollte dabei die Herzfunktion bei Ischämie und Reperfusion untersucht werden. Die Versuchsreihen am isoliert perfundierten Mäuseherz erfolgten nach der von Langendorff beschriebenen Methode mit konstantem Fluss. Durch eine Kanüle wurden über die Aorta die Koronarien retrograd mit einer Nährstofflösung über eine Peristaltik-Pumpanlage mit einem konstanten Fluss von 2 Milliliter pro Minute perfundiert. Zunächst erfolgte ein Vergleich der WT- und TG-Herzen unter basalen Bedingungen nach einer Perfusion von 20 min. In fortführenden Versuchen wurde durch das Abschalten der Peristaltik Pumpanlage eine globale Ischämie an den isolierten Herzen simuliert. Nach 20 min gestoppten Flusses wurden die Herzen für 15 min reperfundiert. Unter basalen Bedingungen war die Kraftentwicklung bei TG geringer als die der WT, jedoch war ihre Herzfrequenz höher als bei WT. Die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit dF/dt_{max} und dF/dt_{min} der WT war höher. TG wiesen eine geringere Anspannungs- und Erschlaffungszeit als WT auf. Unter Zugabe von 5-HT wiesen die TG eine Zunahme der Kraftentwicklung auf, die bei den WT dagegen abnahm. Die Herzfrequenz nahm bei TG unter 5-HT-Zugabe zu, während sie bei den WT unverändert blieb. Der 5-HT₄-selektive Rezeptor-Antagonist GR125487 führte bei den TG zu einer Abnahme der Herzfrequenz. Die Ischämie-Dauer von 20 min führte in keiner Versuchsgruppe zu einer signifikanten messbaren Veränderung der Herzmechanik sowie -geweben. Nach Reperfusion erreichten sowohl die Kontraktionskraft als auch die Herzfrequenz prä-ischämische Werte. Die TG hatten während der Ischämie keine asystolischen Phasen, das heißt Herzschläge waren trotz Ischämie feststellbar.

Schmidbauer, Constanze Theresa: Nähere Charakterisierung 5-HT_{4a}-Rezeptor überexprimierender Mäuse, Halle (Saale), Martin-Luther-Universität, Zahnmedizinische Fakultät., Dissertation, 68 Seiten, 2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1. Einleitung.....	1
1.1 Historie.....	1
1.2 5-HT im menschlichen Körper.....	1
1.3 5-HT am Herz.....	2
1.4 5-HT ₄ -Rezeptor Synthese.....	3
1.5 5-HT-Rezeptoren.....	4
1.6 Der 5-HT _{4a} -Rezeptor am Herz.....	5
1.7 Signaltransduktion des 5-HT ₄ -Rezeptors am Herz.....	5
1.8 5-HT und kardiale Erkrankungen.....	7
1.8.1 Herzinsuffizienz.....	7
1.8.2 Proarrhythmische Effekte von 5-HT.....	8
1.8.3 Ischämie und Reperfusion.....	8
1.8.4 Reperfusionsschaden.....	9
2. Fragestellung.....	10
3. Material und Methodik.....	11
3.1 Das Tiermodell.....	12
3.2 Vorbereitung der Langendorff-Anlage.....	12
3.3 Anästhesie und Organentnahme.....	12
3.4 Die Langendorff-Apparatur.....	13
3.5 Agonisten- und Antagonistenversuche.....	15
3.6 Ischämie und Reperfusion.....	17
3.7 Ischämie und Reperfusion – Teil II.....	18
3.8 Datenanalyse Langendorff.....	18
3.9 Molekularbiologische Untersuchungen.....	19
4. Ergebnisse.....	20
4.1 Das Tiermodell.....	20
4.2 Basale Charakteristika.....	20
4.3 Agonisten- und Antagonistenversuche.....	22

4.4 Ischämie und Reperfusion.....	28
4.5 Ischämie und Reperfusion – Teil II.....	32
5. Diskussion.....	34
5.1. Methoden.....	34
5.2. Basale Charakteristika, Agonisten- und Antagonistenversuche.....	36
5.3. Ischämie und Reperfusion, Teil I + Teil I.....	37
5.4. Weiterführende Untersuchungen.....	40
6. Klinische Bedeutung und Ausblick.....	46
7. Zusammenfassung.....	47
8. Literaturverzeichnis.....	48
9. Thesen.....	55
10. Anhang.....	XII
11. Selbstständigkeitserklärung.....	XIV
12. Publikationen.....	XIV

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Synthese und Abbau von 5-HT	4
Abbildung 2: Signalkaskade von 5-HT über den 5-HT _{4a} -Rezeptor.....	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung der α -MHC-5-HT _{4a} -Rezeptor-Expressionskassette.....	11
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Langendorff-Apparatur.....	14
Abbildung 5: Schema Langendorff Ischämie und Reperfusion	17
Abbildung 6: Perfusion nach Langendorff: I/R mit 5-HT + Kontrollperfusion mit 5-HT	18
Abbildung 7: Genotypisierung.....	20
Abbildung 8: Basalwerte WT und TG im Vergleich.....	21
Abbildung 9: Arrhythmien bei spontan schlagenden TG-Herzen unter basalen Bedingungen.....	22
Abbildung 10: Perfusion mit 1 μ M 5-HT (A)+5-HT (B)und GR113808(C) von WT +TG.....	23
Abbildung 11: Kontraktionskraft in mN.....	23
Abbildung 12: Herzfrequenz in bpm.....	24
Abbildung 13: Maximale Kontraktionsgeschwindigkeit dF/dt_{max}	25
Abbildung 14: Maximale Relaxationsgeschwindigkeit dF/dt_{min}	26
Abbildung 15: Mechanogramme I/ R WT und TG, Kontrollperfusion	28
Abbildung 16: Übersicht Kontrollperfusion sowie I/R WT und TG.....	29
Abbildung 17: Globale Ischämie bei WT und TG.....	30
Abbildung 18: I/R mit Tyrode-Lösung und I/R mit Tyrode-Lösung+5-HT bei TG.....	32

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Versuchsübersicht Agonisten- und Antagonistenversuche	16
Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse Versuche V1-V5.....	27
Tabelle 3: Übersicht Parameter I/R+50-minütige Zeitkontrolle.....	31
Tabelle 4: Phosphorylierungszustand von PLB-Ser-16 und PLB-Thr-17.....	33
Tabelle 5: Phosphorylierungszustand von PLB-Ser-16 und PLB-Thr-17 I/R.....	41
Tabelle 6: Phosphorylierungszustand von ERK1/2 (A) und p38 (B) I/R.....	42

Abkürzungsverzeichnis

5-HT	Serotonin, 5-Hydroxytryptamin
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatcyclase
ATP	Adenosintriphosphat
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
bp	Basenpaare
BPM	<i>beats per minute</i> , Schläge pro Minute
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium ²⁺ -Ionen
cAMP	Zyklisches Adenosin 3',5'-monophosphat
dF/dt	Kraftänderung/Zeiteinheit
dF/dt _{max}	Maximale Kontraktionsgeschwindigkeit
dF/dt _{min}	Maximale Relaxationsgeschwindigkeit
DNA	Desoxyribunukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
IL-6	Interleukin 6
IL-1β	Interleukin 1β
ISO	Isoprenalin
I-κB	Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF-κB
I/R	Ischämie und Reperfusion
KG	Körpergewicht
LTCC	L-Typ-Ca ²⁺ -Kanäle
M	Molar (Mol/Liter)
MAO A	Monoaminoxidase A
mA	Milliampère
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
MHC	schwere Kette des Myosins
min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimolar (Millimol/Liter)

mN	milli Newton
ms	Millisekunden
n	Stichprobenumfang
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid
NF-κB	<i>nuclear factor κ-light-chain-enhancer</i> , Transkriptionsfaktor
O ₂	Sauerstoff
p	Statistische Signifikanz (<0,05)
PCR	<i>Polymerase-chain-reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI	PhosphorImager units (arbiträre Einheit)
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PLB	Phospholamban
Primer	Oligonukleotid für die PCR
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RyR	Ryanodin-Rezeptor (Ca ²⁺ -Freisetzungskanal)
s	Sekunde
SDS-Page	Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid- Gelelektrophorese
SEM	Standardabweichung
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
SERT	Serotonin-Transporter
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TE	Tris-EDTA-Puffer
TG	Transgen/ Transgene Maus
TPH	Tryptophan-Hydroxylase
V	Volumen oder Spannung (Volt)
vs	versus
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Geschichte

Serotonin (5-HT) ist als Gewebshormon und Neurotransmitter in sehr vielen physiologischen Vorgängen im menschlichen Körper involviert. Erste Erkenntnisse über die Wirkung von 5-HT hielt Otto Weiss im Jahr 1896 fest, indem er an Hunden die vasokonstriktorische Wirkung von Serum im Vergleich zu Plasma zeigte (Weiss 1896). Dies ließ sich später durch das Vorhandensein von 5-HT im Serum erklären (Rapport et al. 1948). Fast gleichzeitig wurden in Russland erstmalig enterochromaffine Zellen im Gastrointestinaltrakt entdeckt (Kultschitzky 1897), die sich Jahrzehnte später als wichtiger Speicherort für Serotonin (Erspamer 1940) erweisen sollten. Der Zusammenhang zwischen Tonus-Steigerung und enterochromaffinen Zellen des Gastrointestinaltrakts barg den Ursprung der Forschung des Italiener Vittorio Erspamer – Begründer des „Enteramins“, später 5-HT (Erspamer 1940). Er konnte nach Isolation von Mukosa aus Darmanteilen als erster Wissenschaftler einen positiv inotropen Effekt am Froschherz feststellen (Erspamer 1940). Nach weiteren Studien an Mollusken zu Steigerung der Inotropie konnte er 1952 Enteramin als 5-HT deduzieren (Erspamer und Asero 1952). Parallel beschäftigten sich Wissenschaftler in Amerika mit dem von ihnen benannten Stoff „Serotonin“. Untersucht wurden natürlich vorkommende Vasokonstriktoren im Serum des Menschen, um einen Grund für peripheren arteriellen Bluthochdruck zu finden. Zunächst isolierten sie dafür einen vasokonstriktischen Stoff aus geronnenem Rinder-Serum, welcher mittels chemischer Synthese ebenfalls als 5-HT identifiziert werden konnte (Rapport et al. 1948). Später konnte in weiteren Forschungsergebnissen das Vorkommen von 5-HT im Gehirn lokalisiert werden (Dahlstroem und Fuxe 1964).

1.2 5-HT im menschlichen Körper

Der größte Anteil, circa (ca.) 90%, des 5-HT im menschlichen Körper befindet sich im Gastrointestinaltrakt (Übersicht: Gershon 1999), wo es eine Vielzahl an Effekten wie Übelkeit, Peristaltik und Darmsekretion reguliert (Übersicht: Kim und Camilleri 2000). 5-HT kann die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden und wohl deshalb wird 5-HT auch im Gehirn produziert. Nur 5% des 5-HT im Körper findet man im Gehirn (Gershon und Tack 2007). Im Zentralnervensystem dient 5-HT der Regulation verschiedenster Verhaltensprozesse. Dazu gehören der zirkadiane Rhythmus, Appetitregulation, sowie Stress und Sexualverhalten (Übersicht: Jacobs und Azmitia 1992). Veränderte 5-HT-Konzentrationen sollen bei Menschen impulsives Aggressionsverhalten, manisch-depressive Erkrankungen, Angststörungen und Alkoholabhängigkeit sowie neurologische Erkrankungen wie Migräne auslösen können (Bellivier et al. 1998; Lucki 1998; Mann et al. 2001; Übersicht: Durham und Russo 2002).

1.3 5-HT am Herzen

Im Herzen findet man 5-HT unter anderem in Blutplättchen (Thrombozyten), Mastzellen und sympathischen Nervenendigungen vor. 5-HT wird von enterochromaffinen Zellen freigesetzt, von Thrombozyten mittels des 5-HT-Transporters (SERT) aufgenommen und in die Peripherie transportiert (Übersicht: Baganz und Blakely 2013). 5-HT erreicht das Herz zum Teil über den Transport in Thrombozyten. Es wird jedoch angenommen, daß auch andere Zelltypen, wie Mastzellen, in geringer Anzahl im Herzen vorhanden sind und 5-HT synthetisieren (Baganz und Blakely 2013) oder sogar Kardiomyocyten selbst dazu in der Lage sind (Pönicke et al. 2012). Das menschliche Herz besitzt circa 400 Nanogramm 5-HT pro 100 Gramm (g) Gewebe und auch am Herzen ist Monoaminoxidase A (MAO-A) für die Degradation von 5-HT verantwortlich (Bortolato et al. 2010).

Die kardiovaskulären Effekte von 5-HT sind vielfältig: 5-HT steuert die Regulation von Blutdruck und Homöostase (Côté et al. 2003). Ein positiv inotroper Effekt konnte in Herzen verschiedener Säugetiere, darunter beispielsweise Meerschweinchen und Hunde, nachgewiesen werden (Übersicht: Neumann et al. 2017). Sowohl bei Tieren als auch beim Menschen ist der positiv inotrope Effekt von der Region im Herzen abhängig. Während bei Ratten dieser Effekt linksatrial, jedoch nicht im Papillarmuskel feststellbar war (Läer et al. 1998), konnte in frühen Arbeiten beim Menschen im isolierten rechten und linken Vorhof, jedoch nicht im Ventrikel ein positiv inotroper Effekt als Antwort auf eine 5-HT-Stimulation festgestellt werden (Jahnel et al. 1992). Erste Studien an Probanden zeigten *in vivo* kardiale Arrhythmien (Übersicht: Kaumann and Levy 2006; Lemessurier et al. 1959).

1.4 Synthese von 5-HT

5-HT wird aus der Aminosäure Tryptophan gebildet (Abb. 1). Tryptophan ist eine essentielle Aminosäure und deshalb wird sie nur über die Nahrung aufgenommen. Besonders durch die Aufnahme proteinreicher Nahrung wie Milchprodukte, Eier, Fleisch, Meeresfrüchte sowie Kartoffeln, Kichererbsen oder Sojabohnen kann eine hinreichende Menge an Tryptophan zur Verfügung gestellt werden. Nach dem Verdauungsprozess im Gastrointestinaltrakt wird Tryptophan, zusammen mit anderen AS, über zwei Transporter durch die Enterozyten geschleust.

Nach Aufnahme in verschiedene Organe des Körpers kann der Tryptophan-Metabolismus verschieden verlaufen. Einerseits bleibt der Indolring des Tryptophan zu 3-10% intakt und es kommt zur Bildung von 5-HT, aber auch N-Acetyl-5-HT und Melatonin. 5-HT ist die Vorstufe von N-Acetyl-5-HT und Melatonin (Ruddick et al. 2006). Zu etwa 90% jedoch wird der Indolring gespalten und es entsteht Kynurinen, Nikotinsäure sowie Nikotinamidadenindinukleotid. Die Synthese von 5-HT wird durch das Enzym Tryptophan-Hydroxylase, welches durch zwei verschiedene Gene mit Gewebe-spezifischer Expression codiert wird (Sakowski et al. 2006). Tryptophan wird am Benzolring hydroxyliert zu 5-Hydroxy- Tryptophan. Darauffolgend wird 5-Hydroxy- Tryptophan zu 5-HT decarboxyliert. Dieser Schritt wird durch das Enzym Aromatische L-Aminosäure-Decarboxylase katalysiert (Palego et al. 2016). Es folgt dann oft die Aufnahme von 5-HT in Speichervesikel. Nach Ausschüttung aus zumindest neuronalen Zellen wird 5-HT von einem 5-HT-Transporter (SERT) wieder aufgenommen. Der Abbau erfolgt dann zunächst mittels MAO-A zu 5-Hydroxy-Acetaldehyd auf der äußeren mitochondrialen Membran der Zellen. Darauffolgend wird 5-Hydroxy-Acetaldehyd mittels Aldehyd-Dehydrogenase zu 5-Hydroxyindolylessigsäure (5-HIAA) oxidiert (Übersicht: Palego et al. 2016). 5-HIAA wird über den Urin ausgeschieden (Rodríguez et al. 2001).

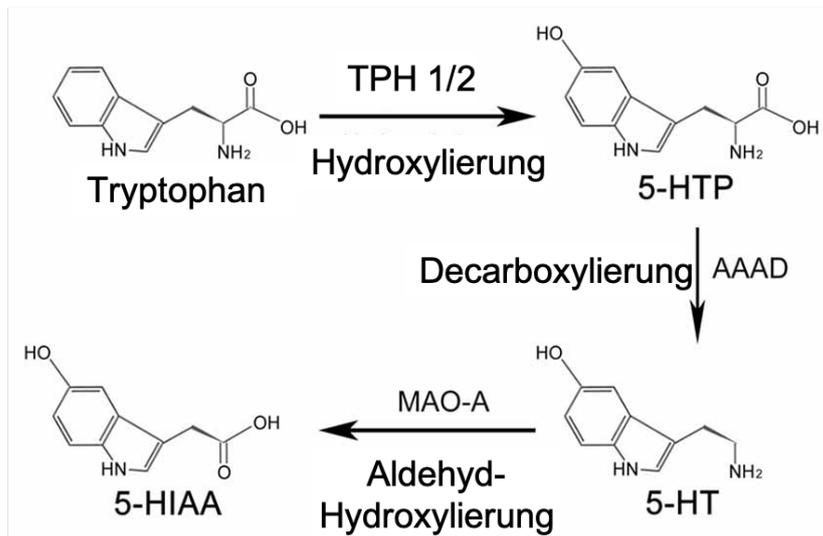


Abbildung (Abb.) 1: Synthese und Abbau von 5-HT

Durch Hydroxylierung wird Tryptophan hydroxyliert und es entsteht 5-HTP. 5-HTP wird zu 5-HT decarboxyliert. Dieser Schritt wird durch das Enzym Aromatische L-Aminosäure-Decarboxylase und den Kofaktor Pyridoxal-5'-Phosphat katalysiert. Der Abbau erfolgt dann zunächst mittels MAO-A zu 5-Hydroxy-Acetaldehyd auf der äußeren mitochondrialen Membran. Darauf folgt die Aldehyd-Hydroxylierung zu 5-HIAA mittels Aldehyd-Dehydrogenase und dem Kofaktor NAD^+ (Übersicht: Palego et al. 2016).

1.5 5-HT-Rezeptoren

5-HT-Rezeptoren können in sieben Hauptgruppen (5-HT₁-5-HT₇) unterteilt werden (Übersicht: Nichols and Nichols 2008). Es werden 13 verschiedene G-Protein-gekoppelte Sub-rezeptoren und ein Liganden-gesteuerter Ionenkanal unterschieden. Letzterer wird als 5-HT₃-Rezeptor bezeichnet und gleicht in seiner Struktur den nikotinischen Cholin-Rezeptoren (Hoyer et al. 1994). Während 5-HT₁ und 5-HT₇ die Adenylatcyclase (AC) über das G_{i/q}-Protein inhibieren, wird AC über 5-HT₄-Rezeptoren, 5-HT₅-Rezeptoren und 5-HT₆-Rezeptoren durch das G_s-Protein aktiviert. Die 5-HT₂-Rezeptoren aktivieren über das G_{q/11}-Protein die Phospholipase C (Hoyer et al. 2002)

Am Mäuseherz konnten die folgenden Rezeptoren auf messenger-RNA-Ebene detektiert werden: 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃ und 5-HT₄-Rezeptoren (Mekontso-Dessap et al. 2006).

1.6 5-HT₄-Rezeptor am Herzen

1988 konnte erstmals der 5-HT₄-Rezeptor in Colliculi-Neuronen von Mäuseembryos funktionell detektiert werden (Dumuis et al. 1988). Zwei Jahre später wurde der Rezeptor in Vorhöfen menschlicher Herzen durch Kontraktionsversuche nachgewiesen (Kaumann et al. 1990). Mithilfe des nicht-selektiven Phosphodiesterase (PDE) -Inhibitors 1-Isobutyl-Methyl-xanthin konnte ein kontraktil wirksamer 5-HT₄-Rezeptor an Ventrikeln von Schweinen und Menschen funktionell nachgewiesen werden (Brattelid et al. 2004b; De Maeyer et al. 2006). Auf messenger-RNA-Ebene war die Expression der 5-HT₄-Rezeptoren in menschlichen Vorhöfen (Bach et al. 2001a; Blondel et al. 1997) höher als in Ventrikeln (Brattelid et al. 2004b; Brattelid et al. 2004a). Es existieren auf messenger-RNA-Ebene vier Spleißvarianten des 5-HT₄-Rezeptors bei Mäusen (Liu et al. 2005). Es sind aktuell jedoch elf Spleißvarianten beim Menschen bekannt (Bonner 2014). Bei der ersten Klonierung des 5-HT₄-Rezeptors aus Rattenhirn wurden zwei Spleißvarianten, 5-HT_{4a} und 5-HT_{4b}, beschrieben (Gerald et al. 1995). Bis heute sind neun Spleißvarianten bei der Ratte bekannt (Bender et al. 2000; Bockaert et al. 2004; Brattelid et al. 2004a). Das menschliche 5-HT₄-Gen befindet sich auf dem Chromosom 5 und verfügt über 38 Exone (Cichon et al. 1998; Bockaert et al. 2004). Der 5-HT₄-Rezeptor vermittelt am menschlichen Herzen positiv inotrope und chronotrope Effekte (Kaumann et al. 1990; Kaumann 1994). Die Dichte von 5-HT₄-Rezeptoren 10- bzw. 5-fach war geringer als die Dichte von β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren (Kaumann et al. 1996).

1.7 Signaltransduktion des 5-HT₄-Rezeptors am Herzen

5-HT_{4a}-Rezeptoren befinden sich auch beim Menschen im Sarkolemma von Kardiomyocyten und zwar in Vorhöfen und Ventrikeln (Abb. 2). 5-HT bewirkt am Herzen eine Zunahme der Konzentration zyklischem Adenosin-3',5'-Monophosphats (cAMP) sowie der Aktivität der Proteinkinase A (PKA) (Kaumann et al. 1990; Kaumann et al. 1991). Außerdem kommt es zur Zunahme des Phosphorylierungszustandes von Phospholamban und der inhibitorischen Untereinheit des Troponins (Gergs et al. 2004). Diese Effekte konnten unter Verwendung von 5-HT₄-spezifischen Antagonisten blockiert werden, was einen Hinweis für die Aktivität des Rezeptors darstellt (Gergs et al. 2009).

Die Signaltransduktion wird durch Liganden-Bindung initiiert. Außer 5-HT können Pharmaka, wie GR113808 oder GR125487 antagonistisch an 5-HT₄-Rezeptoren gebunden werden (Kaumann 1993). Die Bindung eines Agonisten bewirkt die Aktivierung eines an den Rezeptor gekoppelten G_s-Proteins (Hoyer et al. 1991). Es kommt dadurch zur Abspaltung von Guanosindiphosphat und der α -Untereinheit von der β - und γ -Untereinheit des stimulierenden

GTP-bindenden Proteins (G_s). Über die α -Untereinheit wird die Aktivität der AC im Sarkolemma gesteigert, welche die Herstellung von cAMP aus Adenosintriphosphat (ATP) katalysiert (Dumuis et al. 1988). Erhöhte cAMP-Spiegel steigern die Aktivität der cAMP-abhängigen PKA, die diverse Zielproteine phosphoryliert (Bers et al. 2019). Die Phosphorylierung von Phospholamban enthemmt die Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA), sodaß mehr Ca^{2+} in das sarkoplasmatische Retikulum (SR) gelangen kann und die Öffnung des Ryanodin-Rezeptors (Chen et al. 2018). Dementsprechend kann so auch mehr und schneller Ca^{2+} wieder aus dem SR freigesetzt werden. Die PKA steigert somit indirekt die kardiale Kontraktionskraft (Inotropie) und verkürzt die Dauer der Relaxation (Lusitropie). Die Beendigung der Signaltransduktion erfolgt durch den Abbau von cAMP zu 5'-AMP durch Phosphodiesterasen.

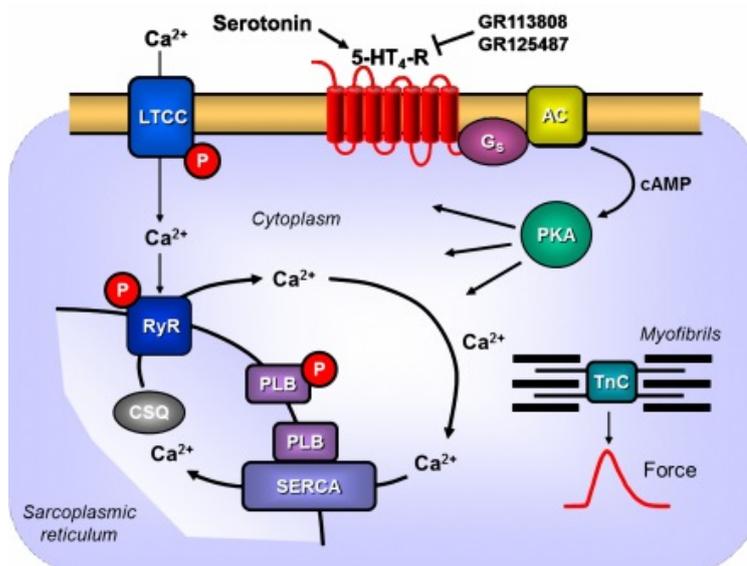


Abb. 2: Signalkaskade von 5-HT über den 5-HT_{4a}-Rezeptor

Durch die Bindung von 5-HT an einen 5-HT₄-Rezeptor kommt es G_s -Protein-vermindert zur Aktivierung der Adenylatzyklase. Die Adenylatzyklase bewirkt die gesteigerte Bildung von cAMP und somit kommt es zur Aktivitätssteigerung der Proteinkinase A (PKA). Die PKA phosphoryliert eine Vielzahl von Zielproteinen, darunter Phospholamban (PLB), Ryanodin-Rezeptoren (RyR) sowie L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (LTCC). Phosphorylierung von Phospholamban aktiviert SERCA, welche Ca^{2+} zurück in das SR pumpt. 5-HT_{4a}-Rezeptoren können durch verschiedene Stoffe antagonisiert werden, wie zum Beispiel GR113808 oder GR125487. LTCC=L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle, AC=Adenylatzyklase, cAMP=zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat, PKA=Proteinkinase A, PLB=Phospholamban, RyR=Ryanodin-Rezeptor, CSQ=Calsequestrin, TnC= Troponin C, SERCA= Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums

1.8 5-HT und kardiale Erkrankungen

1.8.1 Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz wird dadurch definiert, daß das Herz nicht in der Lage ist, die metabolischen Anforderungen der Peripherie zu erfüllen (Zipes et al. 2019). Der reduzierten Herzleistung muss zur Sicherung der Diagnose eine kardiale Ursache zugrunde liegen. Diese Herzinsuffizienz kann akut oder chronisch auftreten (Zipes et al. 2019). Dabei handelt es sich in der Regel um myokardiale Abnormalitäten, die zu systolischer oder diastolischer ventrikulärer Dysfunktion führen (Zipes et al. 2019). Es können jedoch auch andere Abnormalitäten der Herzklappen, des Peri- oder Endokards oder des Herzrhythmus zu einer Herzinsuffizienz führen (Ponikowski et al. 2016). Die verstärkte Aktivität des Sympathikus sowie hohe Konzentrationen neuronaler Hormone spielen eine wichtige Rolle bei der Herzinsuffizienz (Zipes et al. 2019). Durch die Ausschüttung übermäßiger Katecholamine kommt es unter anderem zu myokardialer Ischämie, Apoptose und Arrhythmien (Zipes et al. 2019; Kjekshus et al. 2009).

Im Rahmen einer Herzinsuffizienz konnten erhöhte 5-HT-Konzentrationen im Blutplasma (Selim et al. 2017; Nigmatullina et al. 2009) sowie eine erhöhte kardiale 5-HT-Menge nachgewiesen werden (Sole et al. 1979). Die erhöhten 5-HT Spiegel werden als ein Kompensationsmechanismus beschrieben, um die Herzleistung durch Steigerung der Herzfrequenz sowie der Kontraktionskraft zu verbessern (Sole et al. 1979). Bei der chronischen kongestiven Herzinsuffizienz erhöht sich die Dichte kardialer 5-HT₄-Rezeptoren im Ventrikel des Menschen (Brattelid et al. 2004c). Dies ist vermutlich auf das embryonale Genprogramm zurückzuführen (Brattelid et al. 2012). Der akute Myokardinfarkt führt innerhalb von Stunden zum irreversiblen Verlust von myokardialem Gewebe und zu progressiver kardialer Dysfunktion. Ein kompensatorischer Mechanismus kardialer Dysfunktion ist die Reaktivierung fetaler Gene (Zipes et al. 2019) u.a. mit der Folge der vermehrten Expression des 5-HT₄-Rezeptors (Brattelid et al. 2012). Die Rolle von 5-HT nimmt im Rahmen pathologischer Veränderungen des Herzes deutlich an Bedeutung zu. Brattelid et al. konnten im Jahre 2004 nachweisen, daß die 5-HT₄-Rezeptor messenger RNA bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz im Vergleich zu gesunden Spenderherzen um das vier-fache erhöht war. Eine steigende Bedeutung von 5-HT₄-Rezeptoren bei der chronischen Herzinsuffizienz könnte die abnehmende Rezeptorantwort von β -Adrenozeptoren kompensieren (Brattelid et al. 2004b; Qvigstad et al. 2005). 5-HT₄-Rezeptoren und β -Adrenozeptoren ähneln sich in ihrer Signaltransduktion, da über cAMP und PKA-gekoppelte Protein-Phosphorylierung eine gesteigerte Ca²⁺-Verfügbarkeit und somit eine gesteigerte Kontraktilität gegeben ist (siehe Abbildung 1). Daher bietet möglicherweise der Einsatz von 5-HT₄-Rezeptorantagonisten gegebenenfalls neue therapeutische Ansätze in der

Behandlung der Herzinsuffizienz und zur Kardioprotektion. Der 5-HT₄-Rezeptorantagonist SB207266 Piboserod senkt bei Ratten die Mortalität und zeigte geringe positive Effekte bei der Behandlung von Herzinsuffizienz (Levy et al. 2008). Im Rahmen einer klinischen Studie wurde Piboserod an Patienten mit symptomatischer Herzinsuffizienz getestet (Kjekshus et al. 2009). Piboserod senkt bei Menschen die Hypertrophie des Herzgewebes, welche einen Parameter der Herzinsuffizienz ist (Kjekshus et al. 2009).

1.8.2 Proarrhythmische Effekte von 5-HT am Herzen

In einer Versuchsreihe an isolierten elektrisch gereizten rechten Vorhof-Trabekeln war die Inzidenz von Arrhythmien in vitro bei mit β -AR-Blockern therapierten Patienten im Vergleich mit Kontrollen erhöht (Kaumann and Sanders 1994). Dies wurde durch späte Nachdepolarisation erklärt (Kaumann and Sanders 1994). Außerdem sind in der Arrhythmogenese durch 5-HT die Stimulation von L-Typ-Ca²⁺-Kanälen und die Stimulation von Kaliumkanälen involviert. 5-HT erhält außerdem bereits existierende Arrhythmien aufrecht (Kaumann 1994). Dies geschieht möglicherweise durch die Freisetzung von 5-HT aus Thrombozyten (Minamino et al. 1999). Arrhythmien konnten bereits in früheren Studien an isolierten Vorhöfen und isolierten perfundierten Herzen von 5-HT₄-Rezeptor-überexprimierenden Mäusen nachgewiesen werden (Gergs et al. 2010; Keller et al. 2018).

1.8.3 Ischämie und Reperfusion am Herzen

Durch den Verschluss der herznahen Gefäße, der Koronarien, durch atherosklerotische Plaque kommt es zum Myokardinfarkt. Du et al (2017) forschten an durch 5-HT verursachten Zellschaden bei myokardialer Ischämie und Reperfusion (I/R). Aufgrund eines Gefäßverschlusses kommt es zur Ausschüttung von 5-HT. 5-HT akkumuliert dabei im myokardialen Interstitium und spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des myokardialen Zellschadens bei Ischämie und Reperfusion. Es kommt zu koronarer Vasokonstriktion, koronarer Thrombose durch Aktivierung von Thrombozyten und der Aktivierung afferenter kardialer sympathischer Fasern (Du et al. 2017). Ein weiterer Mechanismus, der Zellschäden bedingt, besteht im Abbau von 5-HT zu 5-HIAA. Das katalysierende Enzym in diesem Vorgang ist MAO-A. Als Nebenprodukt entsteht Wasserstoffperoxid - dies führt über oxidativen Stress zu einem myokardialen Zellschaden (Du et al. 2017).

1.8.4 Reperfusionsschaden

Im Fokus der Therapie eines Myokardinfarkts mit ST-Streckenhebung steht die zeitnahe Reperfusion mittels Thrombolyse oder besser durch primäre perkutane koronare Intervention (engl. *primary percutaneous coronary intervention*, PPCI). Die gängigste Therapie besteht zwar immer in der schnellstmöglichen Reperfusion des Herzes, jedoch kommt es durch die Reperfusion auch zu Verletzungen des Myokards. Die schädigenden Folgen der Reperfusion bei einem Myokardinfarkt werden als Reperfusionsschaden bezeichnet. Im Rahmen der Reperfusion nach Ischämie kann es zu verschiedenen, pathophysiologischen Veränderungen des Myokards kommen (Übersicht: Hausenloy und Yellon 2013). Zwei reversible Schäden beinhalten Reperfusionss-induzierte Arrhythmien sowie das „*myocardial stunning*“. Bei Letzterem handelt es sich um eine reversible post-ischämische kontraktile Dysfunktion, die während der Reperfusion des zuvor akut-ischämischen Myokards eintritt. Ursachen des „*myocardial stunning*“ sind oxidativer Stress sowie intrazellulärer Ca^{2+} -Überschuss (Duncker et al. 1998).

Es kann zur mikrovaskulären Obstruktion kommen (Krug et al. 1966; Rahimtoola 1989). Eine ischämische Region kann somit nicht reperfundiert werden. Diese Art der Schädigung des Myokards ist irreversibel. Ursachen sind Kapillarschaden, externe Kompression der Kapillaren durch Schwellung der Endothelzellen und Kardiomyocyten sowie Thrombusbildung. Es kann zum Untergang von Kardiomyocyten kommen, die am Ende der Ischämie noch überlebensfähig waren. Dies wird als „*lethal myocardial reperfusion injury*“ beschrieben (Neri et al. 2017). Ursächlich sind ebenfalls oxidativer Stress, Ca^{2+} -Überschuss sowie Erhöhung der mitochondrialen Permeabilität und Hyperkontraktion. Diese Art der Schädigung trägt zu 50% der letztendlichen Infarktgröße bei (Heusch 2020). Der myokardiale Reperfusionsschaden führt auf molekularer Ebene zur Aktivierung einer sterilen Inflammation. Die inflammatorische Zellantwort weist Parallelen zu mikrobiellen Infektionen auf. Eine übergeordnete Rolle spielt hierbei die Liganden-Bindung an „Toll-like-Rezeptoren“, die weiterführende Signalkaskaden auslösen, darunter NF- κ B (engl. *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer*), Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (engl. *mitogen-activated kinase*, MAPK) und Typ-1-Interferon-Pathways. Dies resultiert in der Induktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine (Adamo et al. 2020)

2. Fragestellung

Es ist bereits bekannt, daß es bei pathophysiologischen Veränderungen an Rattenherzen zur Reaktivierung fetaler Gene wie des 5-HT₄-Rezeptors kommt, und somit die Bedeutung des serotonergen Rezeptors unter pathophysiologischen Bedingungen zunimmt (Brattelid et al. 2012). Bisläng ist ungeklärt, wie sich der 5-HT₄-Rezeptor im Rahmen des akuten Myokardinfarkts verhält. Durch in-vitro Ischämie- und Reperfusionversuche an isoliert perfundierten Herzen von 5-HT₄-Rezeptor-transgenen Mäusen mit der Langendorff-Apparatur soll dieser Zustand nachgeahmt werden, um Rückschlüsse über die mögliche Bedeutung des Rezeptors im akuten Zustand zu erhalten. Die Hypothese ist, daß sich 5-HT_{4a}-Rezeptor-überexprimierende transgene Mäuse (TG) resistenter gegenüber I/R zeigen, als ihre Wildtyp-Geschwistertiere (WT). Ursächlich für diese Annahme ist, daß isolierte Herzen der transgenen Tiere durch die Aktivität des 5-HT_{4a}-Rezeptors und dessen Wirkungsweise der Inotropie-Steigerung während der Reperfusion nach Ischämie schneller präischämische Werte erreichen könnten als WT Geschwistertiere. Es könnte jedoch auch zur Akkumulation bzw. Freisetzung von 5-HT im Herzen kommen, was zu einer vermehrten Stimulation des 5-HT_{4a}-Rezeptors führen könnte und somit zu einer möglichen Verschlechterung des Reperfusionsschadens. Ziel dieser Arbeit war es, ein besseres Verständnis für die möglicherweise schädliche oder kardioprotektive Aktivität des 5-HT_{4a}-Rezeptors am Herzen unter Ischämie und Reperfusion zu erlangen. Mittels der von Langendorff beschriebenen Methode sollte die Herzmechanik isolierter Herzen von TG und WT aufgezeichnet und analysiert werden.

Die biochemischen Untersuchungsergebnisse der perfundierten Herzen, welche in dieser Arbeit diskutiert werden, wurden freundlicher Weise von Clara Röttger im Rahmen ihrer Dissertation an denselben Herzen erhoben und werden in der Diskussion in geringen Auszügen schematisch vorgestellt werden soweit sie hier mechanisch relevant erscheinen (Röttger et al. 2019; Röttger 2021).

3. Material und Methoden

3.1. Das Tiermodell

Für die Versuche wurden schon gut beschriebene und charakterisierte von der Arbeitsgruppe selbst hergestellte transgene Mäuse (TG) mit herzspezifischer Expression des menschlichen 5-HT_{4a}-Rezeptors verwendet (Gergs et al. 2010). Für die Herstellung der TG Mäuse wurde die 5-HT_{4a}-Rezeptor cDNA aus menschlicher RNA des Herzes mittels RT-PCR gewonnen und in eine Expressionskassette kloniert. Diese wurde mittels Standardtechniken (Oozyteninjektion) in das Mausgenom eingebracht. Die Herz-spezifische Expression des 5-HT_{4a}-Rezeptors wurde durch die Verwendung des Maus- α -MHC-Promoters sichergestellt. Abschließend erfolgte das Einkreuzen in einen CD1-Hintergrund (Gergs et al. 2010).

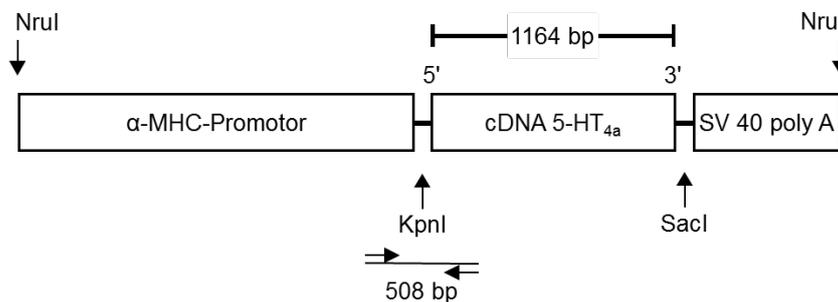


Abb. 3: Schematische Darstellung der α -MHC-5-HT_{4a}-Rezeptor-Expressionskassette

Die für die Versuche verwendeten Tiere hatten allesamt den genetischen Hintergrund der Auszuchtlinie CD1. Die Tiere waren unter anderem einem normalen Tag-und Nachtrhythmus ausgesetzt und hatten bis unmittelbar vor Versuchsbeginn Zugang zu Wasser und Futter ohne Einschränkung. Die Genehmigung zur Haltung und Zucht von Versuchstieren des Instituts für Pharmakologie (TS 06/2018) bzw. des Zentrums für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zu Haltung und Umgang mit den Versuchstieren lagen vor. Eine sichere Identifizierung der Tiere erfolgte im Vorfeld durch Genotypisierung mittels PCR aus Schwanzbiopsien und wurde makroskopisch durch Ohrmarkierungen zur Identifikation sichtbar gemacht. Die Haltung erfolgte geschlechtergetrennt in durchsichtigen Kunststoffkäfigen. Die Versuche wurden mit durchschnittlich 220 Tage alten und ca. 38 g schweren Mäusen durchgeführt. Bei den Versuchen wurde auf die gleichmäßige Verwendung männlicher sowie weiblicher Versuchstiere im Sinne einer Randomisierung geachtet. Subgruppenanalysen wurden, soweit statistisch möglich für die Geschlechter durchgeführt und zeigten keine Unterschiede in den hier untersuchten Kontraktionsparametern.

3.2 Vorbereitende Maßnahmen

Die Reinigung der Langendorff-Anlage erfolgte jeweils vor und nach jedem Versuchstag nach demselben Protokoll. Dafür wurde die Anlage für 5 Minuten (min) mit 20%-igem Ethanol reperfundiert und im Anschluss für 30 min mit entmineralisiertem Wasser gespült.

Die Herstellung der Tyrode-Lösung erfolgte jeweils am Versuchstag. Um das Eindringen von kleinsten Partikeln in die Langendorff-Apparatur und in die perfundierten Herzen zu vermeiden, wurde die Tyrode-Lösung im Anschluss an die Herstellung mittels einer Sartorius-Filteranlage (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland) durch einen 0,2 µm-Filter filtriert. Anschließend erfolgte eine Erwärmung auf 37° Celsius (°C) im Wasserbad und Oxygenierung (Carbogen, 95% O₂ und 5% Kohlenstoffdioxid (Merck, Darmstadt, Deutschland)). Durch ein transparentes Schlauchsystem und eine Blasenfalle konnte das blasenfreie Einspeisen der Tyrode-Lösung in die Langendorff-Apparatur gewährleistet werden. Ein konstanter Fluss von 2 ml/min wurde mittels Peristaltik-Pumpanlage (Ismatec, Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland) und Flussmessgerät (Transonic Systems Inc., Ithaca, USA) eingestellt.

3.3 Anästhesie und Organentnahme

Die Mäuse wurden gewogen und mittels intraperitonealer Injektion von Pentobarbital (1,5mg/kg/KG) narkotisiert. Als Antikoagulationsprophylaxe diente anschließend die intraperitoneale Injektion von 0,2 ml, also 1000 internationalen Einheiten, Heparin in den linken Unterbauch. Es folgte die Eröffnung des Abdomens mittels Thorakotomie und die Entnahme des Herzes ohne Beschädigung des Aortenbogens. Daraufhin wurde dieses mit Tyrode-Lösung gespült, um Blut aus dem Herzen zu entfernen und eine Thrombus-Bildung zu vermeiden.

Die Präparation des entnommenen Herzes erfolgte in einer Präparationsschale mit oxygenierter Tyrode-Lösung. Dabei wurden unter dem Mikroskop mittels mikrochirurgischem Instrumentarium Thymus und Lungenflügel entfernt und der Aortenbogen freipräpariert. Über eine Kanüle in der Aorta ascendens wurde das Herz befestigt. Dabei wurde darauf geachtet, daß der Vorschub der Kanüle innerhalb einer Markierung der dafür vorgesehenen Kanüle lag, um eine Beschädigung der Aortenklappen zu vermeiden und eine retrograde Perfusion zu gewährleisten. Es erfolgte eine weitere Spülung des Herzes bis sich kein Blut mehr im Herzen befand (keine Trübung bei Spülung), um Thrombusbildung zu vermeiden. Die Kanüle wurde daraufhin unter Blasenfreiheit in die Langendorff-Apparatur eingefügt (Langendorff 1895).

3.4 Die Langendorff-Apparatur

Die Langendorff-Apparatur dient der Perfusion isolierter Herzen und ist eine geeignete und reproduzierbare Methode, um I/R, sowie die davon getragenen Schäden oder kardioprotektiven Effekte zu testen. 1895 entwickelte Oscar Langendorff in Rostock das Modell des retrograd perfundierten Säugetierherzen und sorgte somit für das verbesserte Verständnis der Herzphysiologie. Zwei grundsätzliche Vorgehensweisen wurden für die Perfusion nach Langendorff unterschieden; konstanter Druck und konstanter Fluß (Bell et al. 2011). In dieser Arbeit wurde mit der Methode nach konstantem Fluß perfundiert. Dabei wurde das Perfusat über eine Peristaltik-Pumpanlage in das Herz eingespeist und der konstante Koronarfluss mittels Kalibrierung der Pumpgeschwindigkeit sowie einem Fluß-Messgerät kontrolliert. Die myokardiale Aktivität wurde ähnlich wie in Langendorffs originalen Studien registriert (Abb. 4). Mit einem Metallhäkchen durch die Herzspitze wurde das Herz an einem isometrischen Kraftwandler befestigt, der mit einem PowerLab-Datenerfassungssystem (ADInstruments, Sydney, Australien) verbunden war. Die Carbogen-begaste Tyrode-Lösung erreicht über ein Schlauchsystem retrograd die Aorta ascendens. Dies führt zu einem Verschluss der Aortenklappe und die Tyrode-Lösung gelangt statt in den linken Ventrikel in die Koronararterien und über den Sinus coronarius im rechten Ventrikel in ein Auffanggefäß. Die Tyrode-Lösung wird in einem Vorratsgefäß durch ein Wasserbad mit Thermostat auf 45°C erwärmt und oxygeniert. Über ein Schlauchsystem gelangt die Lösung aus der Glasflasche zunächst in ein Doppelwandgefäß, welches als temperierte Blasenfalle dient. Von dort aus gelangt sie über ein weiteres Schlauchsystem mittels einer Kanüle in das Herz, wo sich die Temperatur auf 37°C einstellt. Zwischen temperierter Blasenfalle und Kanüle befindet sich das Flussmessgerät, um einen konstanten Fluss von 2 ml/ min zu überprüfen (Abb. 4).

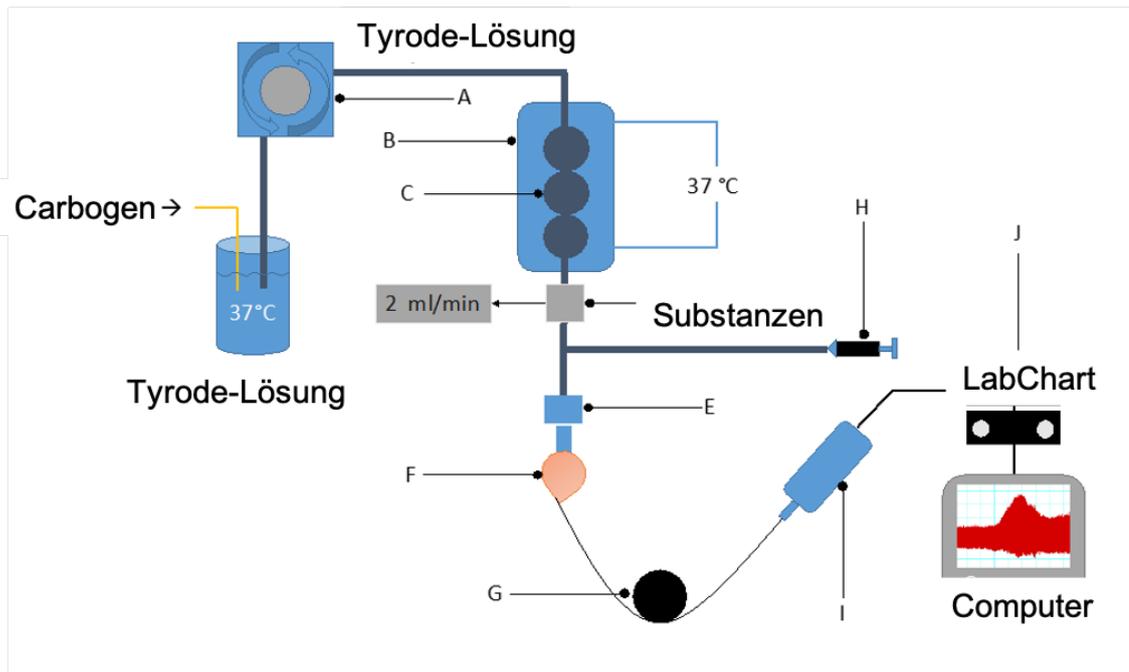


Abb.4: Schematische Darstellung der Langendorff Apparatur
(Mit Genehmigung aus: Mißlinger 2019)

In einem Wasserbad erfolgt die Erwärmung der Tyrode-Lösung auf 37°C. Von dort gelangt die Carbogen-begaste Tyrode-Lösung über ein Schlauchsystem in eine Peristaltik-Pumpanlage (Ismatec, Cole-Parmer GmbH, Wertheim), die den konstanten Fluss gewährleistet (A). Der Peristaltik-Pumpanlage, die der Regulation des Flusses dient, ist eine Blasenfalle (B) nachgeschaltet, um Embolien der Koronarien zu vermeiden. Ein Doppelwandgefäß (C) dient der Aufrechterhaltung der Temperatur. Ein Flussmessgerät (Transonic Systems Inc., Ithaca, USA) (D) dient der Überprüfung des Flusses. Über eine Kanüle (E) wird das Herz (F) perfundiert. Über eine zusätzliche Spritzeanlage Injekt® (B.Braun AG, Melsungen) (H) können Substanzen in das Herz gepumpt werden. Mittels eines Metallhakens an der Herzspitze, welches über einen Bindfaden an einer Umlenkrolle befestigt ist (G) können die physiologischen Parameter mittels eines Verstärkers (I) digitalisiert werden. Das Programm LabChart (ADInstruments, Sydney, Australien) (J) überträgt die Herzmechanik in eine graphische Darstellung am Computer.

3.5 Agonisten- und Antagonistenversuche

In dieser Versuchsreihe wurden nach 20-minütiger Perfusion mit Tyrode-Lösung verschiedene Substanzen, welche als Agonisten oder Antagonisten an den 5-HT_{4a}-Rezeptor binden können, mittels einer separat angeschlossenen Spritzanlage Inject (Fa. Braun, konstanter Fluss 2ml/ min) in die isolierten Herzen eingeleitet. Um einen konstanten Fluss im Herzen zu gewährleisten, wurden die Substanzen über einen Drei-Wege-Hahns oberhalb der cannülierten Aorta mittels einer separat angeschlossenen Spritzanlage Inject (Fa. Braun) eingespeist (Abb. 4). Dies erfolgte nach einem standardisierten Protokoll (Tabelle 1). Je Versuchsdurchgang wurde ein Herz mit je nur einer Substanz für fünf Minuten perfundiert. Die Perfusion erfolgte mit 5-HT (1 µM), 5-HT (1 µM) + GR113808 (1 µM), einem Antagonisten am 5-HT_{4a}-Rezeptor, perfundiert. Der dritte Versuch wurde mit Isoprenalin (ISO) (1 µM) durchgeführt, einem β-Adrenozeptoragonisten. Im vierten Versuch wurde Tyrode-Lösung aus der Anlage eingespeist. Die letzten beiden Versuche wurden jeweils mit dem 5-HT_{4a}-Rezeptorantagonisten GR113808 sowie dem inversen Agonisten GR123457 durchgeführt. Während des gesamten Versuches zeichnete das Programm LabChart verschiedene Parameter der linksventrikulären Herzkraft auf. der Herzarbeit auf. Konkret erfolgte die Aufzeichnung der Parameter Kraft, Herzfrequenz sowie Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit. Mittels einer in flüssigem Stickstoff gekühlten Wollenberger-Zange wurden die Herzen zu Versuchsende in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für weiterführende molekularbiologische Gewebe-Untersuchungen bei -80°C gelagert. Die Versuche mit Agonisten- und Antagonisten dienten der basalen Charakterisierung des Tiermodells und auch der Überprüfung der korrekten Funktionsweise der Langendorff-Anlage. Da die Verwendung der Langendorff-Versuchsordnung einer gewissen Übung bedarf und dadurch Behandler-sensitiv ist, sollten die Agonisten- und Antagonistenversuche somit auch zur Überprüfung und Beweis der korrekten Anwendung der Organentnahme und Präparation dienen.

Tabelle 1: Versuchsübersicht Agonisten- und Antagonistenversuche

Versuchsnummer	Perfusionszeit und Substanz/-en	Abkürzung
Versuch 1	5 min 5-HT (1 μ M)	5-HT
Versuch 2	5 min 5-HT (1 μ M) und GR113808 (1 μ M)	5-HT+GR113808
Versuch 3	5 min Isoprenalin (1 μ M)	ISO
Versuch 4	5 min Tyrode-Lösung	CTR
Versuch 5	5 min GR113808 (1 μ M)	GR113808
Versuch 6	5 min GR125487 (1 μ M)	GR125487

In Versuch 1 wurden Herzen 5 Minuten mit 5-HT perfundiert und anschließend schockgefroren. In Versuch 2 erfolgte die Perfusion von Herzen mit 5-HT und GR113808. In Versuch 1 wurden die Herzen 5 Minuten mit 1 μ M 5-HT perfundiert. In Versuch 2 wurden die Herzen mit 1 μ M 5-HT und GR113808 perfundiert. In Versuch 3 wurden Herzen 5 Minuten mit 1 μ M Isoprenalin (ISO) perfundiert. In Versuch Nummer 4 wurden die Herzen 5 Minuten mit Tyrode-Lösung (CTR) perfundiert. In Versuch 5 wurden die Herzen 5 Minuten mit 1 μ M GR113808 (GR113808) perfundiert. In Versuch 6 wurden Herzen 5 Minuten mit 1 μ M GR125487 (GR125487) perfundiert.

3.6 Ischämie und Reperfusion (Teil I)

In einem weiteren Versuchsblock wurde nach 20 min Stabilisierungsphase und Erreichen des Sinusrhythmus durch das Umlegen des Drei-Wege-Hahns und Ableiten der Tyrode-Lösung in ein Auffangbehältnis eine globale Ischämie am isolierten Herzen erzeugt (Abb. 5). Durch Ableiten der Tyrode-Lösung über einen Drei-Wege-Hahn konnte in der Anlage eine Blasenbildung vermieden werden. Nach 20 min Ischämie erfolgte durch das Umschalten des Hahns eine Reperfusion für 15 min. Während der Reperfusion wurde das Eluat minutenweise in Eppendorf-Röhrchen gesammelt und in flüssigem Stickstoff eingefroren, um eventuell aus dem Herzen freigesetzte Substanzen analysieren zu können. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen waren Bestandteil einer weiteren Promotionsarbeit von Frau Clara Röttger und werden in der Diskussion vorgestellt. Nach 15 min wurden die Herzen ebenfalls mittels Wollenberger Zange in flüssigem Stickstoff eingefroren.

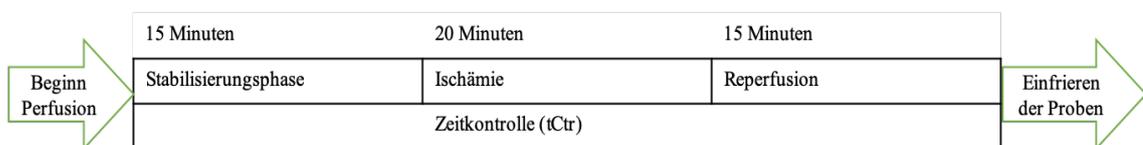


Abb. 5: Schema Langendorff Ischämie und Reperfusion

Nach 15-minütiger Stabilisierungsphase erfolgte die 20-minütige Ischämiezeit. Es folgte die Reperfusion für 15 Minuten. Zu Vergleichszwecken erfolgte eine Zeitkontrolle (tCtr) über 50 Minuten. Am Ende der Versuchszeit wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Auch bei diesem Versuchsaufbau wurden wie bereits beschrieben Kontraktionskraft und Herzfrequenz mittels des Programmes LabChart aufgezeichnet. Das Auftreten von Arrhythmien und die Kraftreduktion während Ischämie sowie die Kraftzunahme während Reperfusion wurden analysiert. Außerdem erfolgte die Aufzeichnung einer Zeitkontrolle, bei der keine I/R durchgeführt wurde. Dabei wurden sowohl TG als auch WT über 50 min mit Tyrode-Lösung perfundiert. Die Kraftentwicklung wurde aufgezeichnet.

3.7 Ischämie und Reperfusion von TG mit exogenem 5-HT (Teil II)

Wie in der Einleitung beschrieben, kommt es beim akuten Myokardinfarkt durch die Aktivierung von Thrombozyten auch wohl zur vermehrten Freisetzung von 5-HT. Dies sollte durch einen weiteren Versuchsaufbau nachgeahmt werden. Dabei wurden nach einer initialen Stabilisierungsphase von 20 min und einer 20-minütigen Ischämie isolierte Herzen von TG mit 1 μ M 5-HT aus einer separaten Spritzanlage Inject (Fa. Braun) perfundiert. Außerdem wurde einer Kontrollgruppe von TG als Zeitkontrolle für 40 min mit Tyrode-Lösung perfundiert und anschließend für 15 min mit 1 μ M 5-HT perfundiert (Abb. 6)

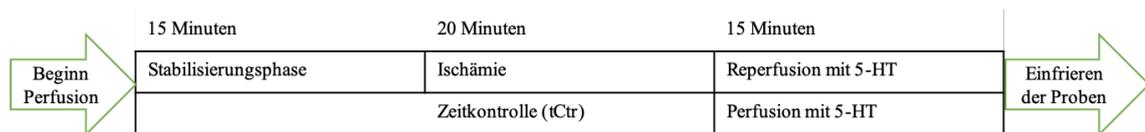


Abb. 6: Perfusion nach Langendorff: I/R mit 5-HT + Kontrollperfusion mit 5-HT

Nach 15-minütiger Stabilisierungsphase erfolgte die 20-minütige Ischämiezeit. Es folgte die Reperfusion mit 5-HT für 15 Minuten. Zu Vergleichszwecken erfolgte eine Zeitkontrolle (tCtr) über 50 Minuten. Am Ende der Versuchszeit wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

3.8 Datenanalyse

Die Erfassung der Herzspitzenbewegung und Kraft erfolgte über ein Metallhäkchen, welches zu Versuchsbeginn an der Herzspitze des Herzes eingehängt wurde. Über einen Baumwollfaden, welcher über eine Umlenkrolle gespannt war, konnten die Daten verstärkt von einem Kraftaufnehmer registriert werden. Die Verstärkung und Digitalisierung der Daten erfolgte mit einem PowerLab-System und anhand des Programmes LabChart (ADInstruments, Sydney, Australien). Die statistische Auswertung und graphische Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel und Microsoft PowerPoint (Microsoft, Redmond, USA) und Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, USA). Die ausgewerteten Parameter umfassten die Kontraktionskraft, Herzfrequenz, Anspannungs- und Erschlaffungszeit des Myokards, sowie die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit.

3.9 Molekularbiologische Untersuchungen

Wie bereits beschrieben, erfolgte das Einfrieren der Herzgewebe mittels der Wollenberger-Zange in flüssigem Stickstoff (Wollenberger 1960).

Die Genotypisierung diente zusammen mit der Ohrmarkierung der Gewährleistung, WT und transgene 5-HT_{4a}-Rezeptor überexprimierende Mäuse unterscheiden zu können. Alle Tiere wurden vor Versuchsdurchführung zur Kontrolle genotypisiert. Vier Wochen nach der Geburt sowie nach Organentnahme wurden den Mäusen Proben der Schwanzspitzen von 2 Millimetern (mm) Länge entnommen und der Genotypisierung mittels PCR unterzogen. Die PCR diente der Vervielfältigung von DNA-Fragmenten. In einem Agarosegel wurden die DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt. Der erste Schritt der PCR bestand in der Vorbereitung der organischen Gewebeproben. Diese wurden mit 250 Mikroliter (µl) Lösung 1 bei 55°C im Thermomixer schüttelnd inkubiert. Dies diente der alkalischen Auflösung des Gewebes (siehe Anhang). Die Genotypisierung erfolgte im „Mastercycler gradient“ von Eppendorf (Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg). Die Herstellung des Agarosegels erfolgte mit 1 g Agarose pro 100 Milliliter (ml) TAE-Puffer, sowie 10µl Red-Safe-Farbstoff. Nach 30 Minuten wurden die Kämme aus dem Gelträger entfernt, das Gel in eine zweite Gelkammer mit TAE-Puffer (siehe Anhang) eingebracht und die Taschen für eine horizontale Gelelektrophorese mit PCR-Produkten beladen. Vor Anlegen einer Stromstärke von 100 mA wurden 8 µl DNA-Größenmarker (100 bp-Leiter, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) zur Kontrolle und Banden-Bestimmung zugegeben. Die Auswertung des Gels erfolgte nach einer Laufzeit von 20-30 min mit einem UV-Betrachter. Eine gute Auftrennung der DNA-Leiter sowie die Sichtbarkeit der Banden waren Kriterien für eine Fotografie sowie die Auswertung der Ergebnisse.

4. Ergebnisse

4.1 Das Tiermodell

Mittels RT-PCR konnte in der aus Schwanzspitzenbiopsien von transgenen Tieren isolierten genomischen DNA ein Signal für den humanen 5-HT_{4a}-Rezeptors bei etwa 500bp detektiert werden (siehe Abb. 7). In WT konnte ein solches Signal nicht gefunden werden. Somit konnten WT- von TG-Mäusen unterschieden werden. Makroskopisch waren keine Veränderungen an den TG-Tieren oder an den TG-Herzen im Vergleich zu WT erkennbar (Gergs et al 2010).

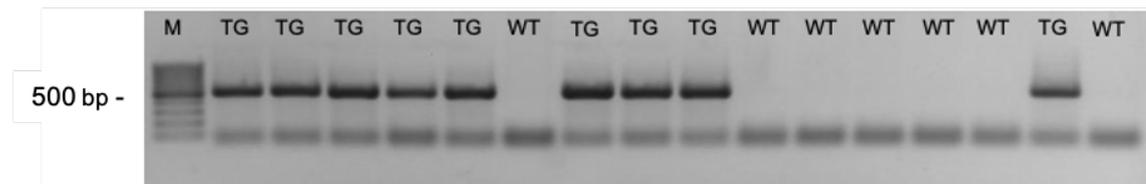


Abb. 7: Genotypisierung

Es wurde die Agarose-Gelelektrophorese einer PCR für den transgenen 5-HT₄-Rezeptor durchgeführt. Die DNA transgener Tiere ergibt ein Signal bei 500bp ein Signal. (bp=Basenpaare, M=Marker (100 bp-Leiter), TG=Transgene 5-HT_{4a}-Rezeptor-überexprimierende Mäuse, WT=Wildtyp-Tiere).

4.2 Basale Charakteristika

Alle isolierten Mausherzen wurden nach der von Langendorff beschriebenen Methode mit konstantem Fluss von 2 ml/ min zunächst für 20 min mit Tyrode-Lösung perfundiert (Langendorff 1895). Nur Herzen, die in dieser Zeit Sinus-Rhythmus erreichten, wurden in die statistische Auswertung einbezogen. Die Werte dienten zum einen der Analyse der basalen Charakteristika der WT- und TG-Herzen sowie als vergleichende Parameter bei weiterführenden Versuchen. Es wurden jeweils die Parameter Kontraktionskraft F in mN, Herzfrequenz in Schlägen pro Minute (bpm), maximale Kontraktionsgeschwindigkeit (dF/dt_{max}) in mN/s sowie maximale Relaxationsgeschwindigkeit (dF/dt_{min}) in mN/s mittels der Software LabChart aufgezeichnet bzw. berechnet.

Die WT zeigten nach 20 min Stabilisierungsphase eine Kraftentwicklung von $32,1 \pm 1,39$ mN (n=37). Die Kraftentwicklung von TG lag bei $28,1 \pm 1,79$ mN (n=39). Die Herzfrequenz lag bei WT bei $291 \pm 7,41$ bpm (n=37) und war somit geringer als bei TG mit $320 \pm 8,93$ bpm (n=39) (*p < 0,05). Sowohl die dF/dt_{min} als auch die dF/dt_{max} zeigten bei TG geringere Werte. So lag dF/dt_{min} bei WT bei -974 ± 159 mN/s (n=37) und bei TG bei $-548 \pm 48,7$ (n=39) (*p < 0,05). Die

dF/dt_{max} belief sich bei WT auf 1200 ± 228 mN/s ($n=37$) und bei TG auf $751 \pm 56,1$ mN/s ($n=39$) ($*p < 0,05$) (Abb. 8). Durch die Auswertung der basalen Parameter konnte somit schon ein deutlicher Unterschied zwischen WT und TG gezeigt werden. Die Analyse der basalen Charakteristika zeigte bei TG die Tendenz ($p=0,07$) einer geringeren Kontraktionskraft als bei WT, wohingegen die Frequenz bei TG erhöht war. Die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten waren bei TG vermindert ($*p < 0,05$ vs. WT). Es erfolgte außerdem die Auswertung der Mechanogramme in Bezug auf das Vorkommen von Arrhythmien in der Stabilisierungsphase (siehe Abb. 9). Es konnten sowohl bei WT als auch TG Arrhythmien festgestellt werden. Bei TG konnte in der Äquilibrationsphase eine Tendenz der vermehrten Arrhythmien festgestellt werden (TG: 32 von 43, WT 23 von 34), deren Anzahl sich in dem untersuchten Kollektiv aber nicht signifikant von WT unterschied ($p > 0,05$).

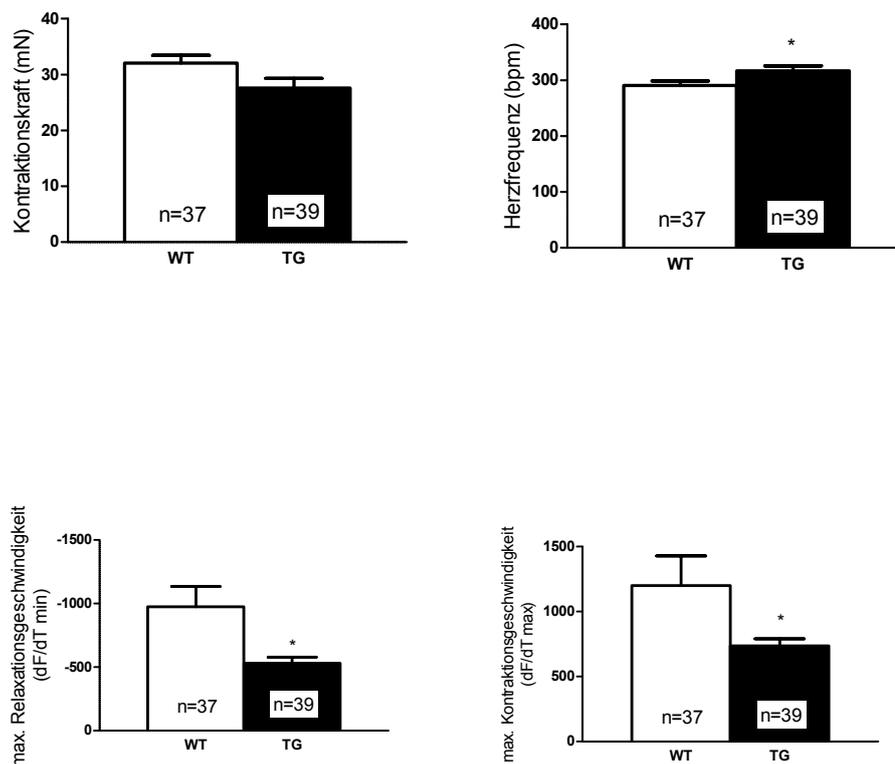


Abb. 8: Basalwerte von WT und TG im Vergleich

Dargestellt sind in dieser Abbildung die Kontraktionskraft in mN, Herzfrequenz bpm, maximale Relaxationsgeschwindigkeit (dF/dt_{min}) in mN/s und maximale Kontraktionsgeschwindigkeit (dF/dt_{max}) in mN/s. Unter basalen Bedingungen wiesen TG im Vergleich zu WT eine höhere Herzfrequenz auf ($*p < 0,05$) und maximale Relaxationsgeschwindigkeit dF/dt_{min} sowie maximale Kontraktionsgeschwindigkeit dF/dt_{max} waren bei TG im Vergleich zu WT verringert. ($*p < 0,05$).

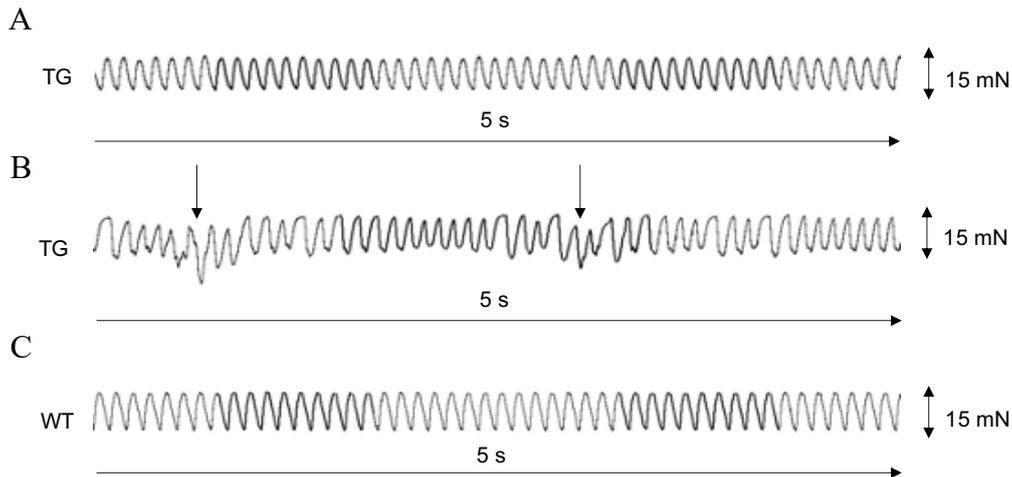


Abbildung 9: Arrhythmien bei spontan schlagenden TG-Herzen unter basalen Bedingungen.

Dargestellt sind repräsentative Kontraktionskurven spontan schlagender isolierter Herzen von WT und TG-Herzen. Die Amplitude der Kraft beträgt jeweils etwa 15mN. (A) Spontan schlagendes TG-Herz ohne Arrhythmien, (B) spontan schlagendes TG-Herz mit Arrhythmien (Kennzeichnung durch Pfeile) unter basalen Bedingungen, (C) WT-Herz ohne Arrhythmien. Es gab keine Unterschiede in der Häufigkeit der Arrhythmien zwischen WT und TG ($p > 0,05$).

4.3 Agonisten- und Antagonistenversuche

Nach 20-minütiger initialer Stabilisierungsphase wurden die Herzen für 5 min mit herzaktiven Pharmaka perfundiert. Dies erfolgte über eine separate Spritzenanlage Inject (Fa. Braun), die über das Umschalten eines Dreiwegehahnes angeschlossen wurde. Die angegebenen Konzentrationen stellen die Konzentration im Herzen (Aorta) dar (Tab. 2). Verwendet wurden jeweils 5-HT (1 μ M), 5-HT (1 μ M) zusammen mit GR113808 (1 μ M), ISO 1 μ M, GR113808 (1 μ M) sowie GR125487 (1 μ M). Außerdem erfolgte eine Kontrollperfusion mit Tyrode-Lösung (CTR). GR113808 stellt einen Antagonisten des 5-HT_{4a}-Rezeptors da, wohingegen GR125487 ein inverser Agonist des Rezeptors ist. Nach 20 min wurden die Parameter Kontraktionskraft, Herzfrequenz, dF/dt_{max} , dF/dt_{min} , Kontraktionszeit (T1) und Relaxationszeit (T2) sowie die relative Kraftzunahme (in %) erhoben (=Ausgangslage). Die genannten Parameter wurden nach 5-minütiger Perfusion erneut erhoben (=Effekt). Nach exakt fünf Minuten der Perfusion wurden die Herzen mittels flüssigen Stickstoffs und unter Zuhilfenahme der Wollenberger-Zange für weiterführende biochemische Untersuchungen eingefroren. Abb. 10 zeigt die Perfusion eines WT-Herzes (Amplitude der Kraftentwicklung in mN) mit 5-HT(1 μ M), eines TG-Herzes mit 5-HT(1 μ M) sowie eines TG-Herzes mit 5-HT(1 μ M)+GR113808. 5-HT führt beim WT nicht zu einem Anstieg der Kraft, während bei TG eine deutliche Kraftzunahme nach Applikation von 5-HT sichtbar ist. Dieser Effekt ist durch die Zugabe von GR113808, zu antagonisieren.

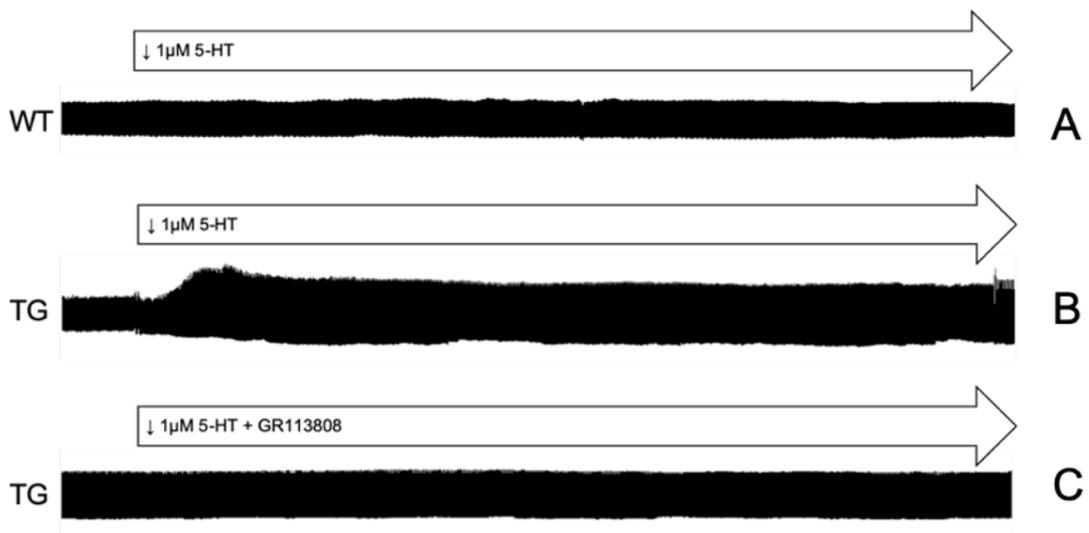


Abb.10: 5-minütige Perfusion mit 1 μM 5-HT (A) und 5-HT (B) und GR113808 (C) von WT + TG.

Keine Veränderung der Herzmechanik bei Zugabe von 5-HT bei WT (A), positiv inotroper Effekt von 5-HT bei TG (B), Aufhebung des Effekts bei TG bei Antagonisierung (C) (jeweils 30 mN Amplitude).

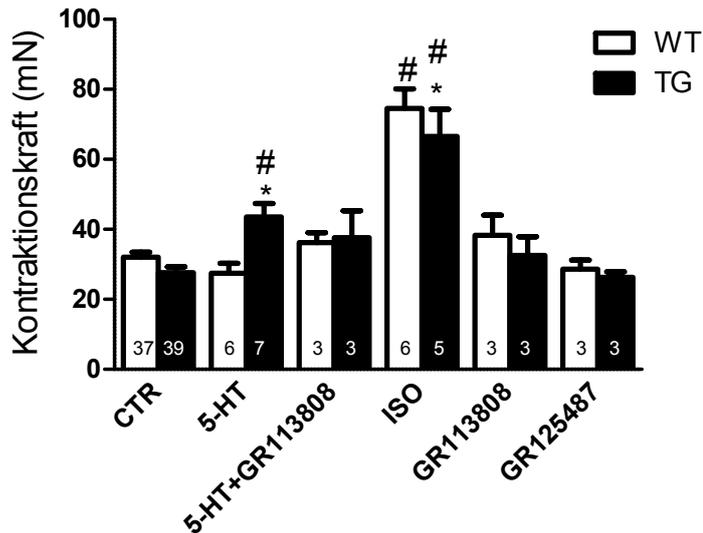


Abb.11: Kontraktionskraft in mN.

Die Kontraktionskraft von TG bei 5-HT-Gabe war im Vergleich zu WT (* $p < 0,05$) und zur TG Zeitkontrolle (CTR) erhöht. Unter ISO-Gabe kam es bei WT und TG zu einer Kraftzunahme im Vergleich zur Zeitkontrolle (CTR). * $p < 0,05$ vs. WT; # $p < 0,05$ vs. CTR.

Unter 5-HT-Gabe kam es bei TG zu einer Kraftzunahme von $25,0 \pm 3,44$ auf $43,6 \pm 2,93$ mN ($n=7$) ($*p < 0,05$). Dieser Effekt blieb bei WT aus ($32,0 \pm 4,46$ auf $28,6 \pm 3,15$ mN) ($n=5$). 5-HT in der Kombination mit GR113808, einem 5-HT_{4a}-Rezeptor-Antagonisten, unterdrückte den Effekt bei TG. Die Kontraktionskraft von TG verlief von $42,3 \pm 11$ auf $37,7 \pm 7,61$ mN ($n=3$). Die Kontraktionskraft der WT änderte sich von $33,1 \pm 0,61$ auf $36,3 \pm 2,80$ mN ($n=3$). Es zeigte sich bei ISO-Gabe sowohl bei WT als auch TG eine deutliche Zunahme der Kontraktionskraft. Die WT-Herzen zeigten unter ISO eine Kraftzunahme von $31,7 \pm 4,38$ auf $75,0 \pm 5,58$ mN ($n=6$) ($*p < 0,05$). Die Kraftentwicklung unter ISO bei TG verlief von $25,0 \pm 2,54$ auf $66,5 \pm 7,79$ mN ($n=5$) ($*p < 0,05$). Unter Perfusion mit GR113808 sowie GR125487 kam es zu keinen Veränderungen der Kontraktionskraft im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 11).

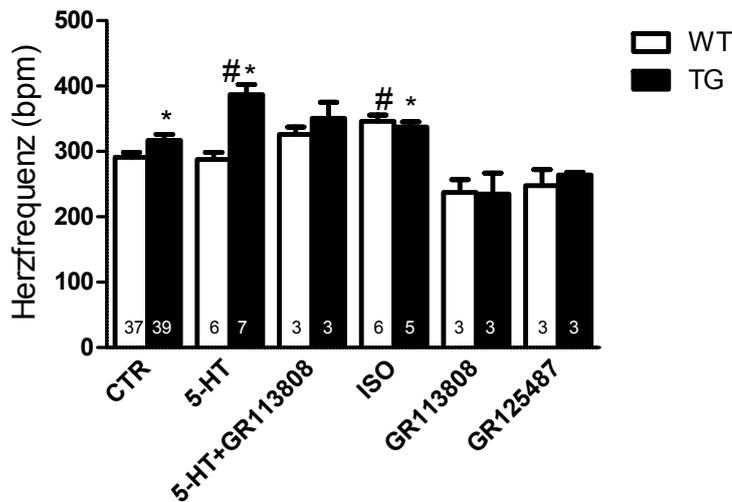


Abbildung 12: Herzfrequenz (bpm).

TG wiesen im Vergleich zu WT in Ruhe eine signifikant höhere Herzfrequenz auf ($*p < 0,05$). Die Herzfrequenz war nach Gabe von 5-HT bei TG im Vergleich zur Zeitkontrolle ($\#p < 0,05$) und im Vergleich zu WT ($*p < 0,05$) erhöht. Die Gabe von ISO steigerte die Herzfrequenz von WT im Vergleich zur CTR ($\#p < 0,05$) und von TG im Vergleich zu WT ($*p < 0,05$).

Die basale Herzfrequenz lag bei WT bei $291 \pm 7,41$ bpm ($n=37$) und war somit geringer als bei TG mit $320 \pm 8,93$ bpm ($n=39$) ($p < 0,05$). Nach Zugabe von 5-HT ($1 \mu\text{M}$) kam es bei WT nicht zu einem Anstieg der Schlagfrequenz, wohingegen TG-Herzen eine deutliche Zunahme der Frequenz aufwiesen. Die WT wiesen nach Stabilisierungsphase $294 \pm 11,2$ bpm und nach Effekt $287,84 \pm 10,75$ bpm ($n=6$) auf. TG zeigten nach Perfusion mit 5-HT einen Anstieg der Herzfrequenz von $315,72 \pm 15,72$ bpm auf $386,70 \pm 16,65$ bpm ($n=7$) ($p < 0,05$). Die Herzfrequenz von WT stieg bei Zugabe von ISO von $271 \pm 10,2$ bpm ($p < 0,05$) auf $346 \pm 9,54$ bpm ($n=6$) und

bei TG von $283 \pm 10,8$ bpm auf $337 \pm 7,79$ bpm ($n=5$) ($p < 0,05$). Eine ausbleibende Chronotropie bei Perfusion mit 5-HT und GR113808 wiesen sowohl WT als auch TG auf. Beide Mäuserennen zeigten eine Abnahme der Herzfrequenz. WT veränderten ihre Herzfrequenz von $342 \pm 14,1$ auf $326 \pm 11,1$ bpm ($n=3$) und TG von $362,03 \pm 29,97$ bpm auf $351 \pm 24,5$ bpm ($n=3$). Die Perfusion mit GR113808 und GR125487 zeigte keine Veränderungen der Herzfrequenz bei WT ($n=3$) und TG ($n=3$) (Abb. 12).

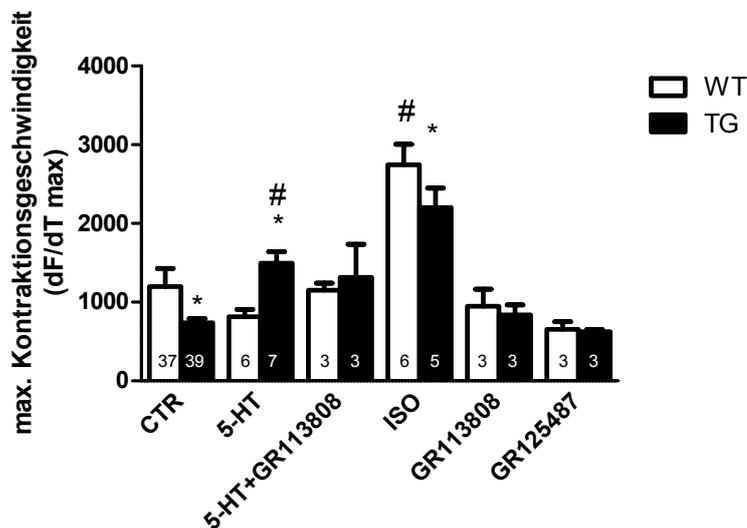


Abbildung 13: Maximale Kontraktionsgeschwindigkeit dF/dt_{max}

Die dF/dt_{max} war basal bei TG im Vergleich zu WT signifikant verkürzt ($*p < 0,05$). Die Gabe von 5-HT führte bei TG zu einem Anstieg der dF/dt_{max} im Vergleich zur TG Zeitkontrolle ($\#p < 0,05$) und im Vergleich zu WT ($*p < 0,05$). ISO bewirkte sowohl bei WT eine Steigerung der dF/dt_{max} im Vergleich zu WT CTR ($\#p < 0,05$) als auch TG eine noch deutlichere Steigerung der dF/dt_{max} im Vergleich zu TG CTR.

Die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit (dF/dt_{max}) belief sich basal bei WT auf 1200 ± 228 mN/s ($n=37$) und bei TG auf $751 \pm 56,1$ mN/s ($n=39$) und war somit bei TG basal vermindert ($p < 0,05$). Unter Einfluß von 5-HT kam es bei TG zu einer deutlichen Steigerung von $634 \pm 95,0$ mN/s auf 1497 ± 122 mN/s ($n=7$) ($*p < 0,05$) im Vergleich zu WT ($785,33 \pm 96,46$ auf $815,34 \pm 92,31$ mN/s) ($n=6$). ISO bewirkte sowohl bei WT als auch TG eine noch deutlichere Steigerung der dF/dt_{max} . Diese nahm bei WT von 848 ± 124 auf 2745 ± 261 mN/s ($n=6$) ($p < 0,05$) und bei TG von $634,23 \pm 54,91$ auf $2201,03 \pm 247,78$ mN/s ($n=5$) ($p < 0,05$) zu. Sowohl für GR113808 als auch GR125487 waren keine Veränderungen in der Auswertung erkennbar (Abb. 13).

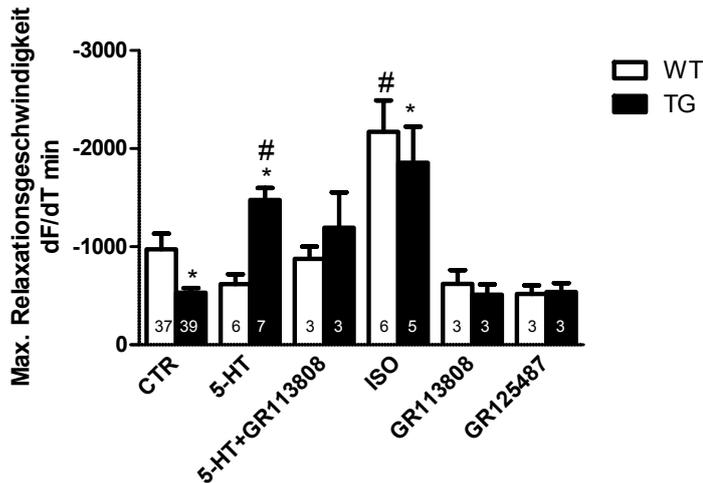


Abbildung 14: Maximale Relaxationsgeschwindigkeit dF/dt_{min}

Die dF/dt_{min} war basal bei TG im Vergleich zu WT deutlich vermindert ($*p < 0,05$). Die Zugabe von 5-HT führte bei TG zu einem Anstieg der dF/dt_{min} im Vergleich zur TG Zeitkontrolle ($*p < 0,05$) und im Vergleich zu WT ($\#p < 0,05$). ISO bewirkte sowohl bei WT einen Anstieg der dF/dt_{min} im Vergleich zu WT CTR ($\#p < 0,05$) als auch TG einen signifikanten Anstieg der dF/dt_{max} im Vergleich zu TG CTR.

Analog zu dF/dt_{max} verhielten sich die Relaxationsgeschwindigkeiten. So lag dF/dt_{min} basal bei WT bei -974 ± 159 mN/s ($n=37$) und war bei TG vermindert ($-548 \pm 48,7$) ($n=39$) ($*p < 0,05$). Die Zugabe von 5-HT bewirkte bei TG eine sehr starke Beschleunigung der Relaxation mit einem Anstieg der Geschwindigkeit dF/dt_{min} von $-444 \pm 60,1$ auf -1477 ± 122 mN/s ($n=7$) ($*p < 0,05$). Bei WT hatte 5-HT keinen Effekt ($-632,92 \pm 113,95$ auf $-619,45 \pm 99,99$) ($n=6$). Durch die Zugabe von GR113808 und 5-HT blieb oben genannter Effekt bei TG aus. Die dF/dt_{min} Werte betragen sich bei TG von -1155 ± 357 mN/s (basal) und -1193 ± 363 mN/s (GR113808+5-HT) ($n=3$) und bei WT $-800,28 \pm 111,84$ (basal) und -875 ± 125 mN/s (GR113808+5-HT) ($n=3$). Wie bei dF/dt_{max} kam es unter ISO auch bei der dF/dt_{min} zu einer starken Erhöhung bei beiden Versuchsgruppen. So stieg dF/dt_{min} bei WT von -561 ± 113 auf -2171 ± 320 mN/s ($n=6$) ($p < 0,05$) und bei TG von $-498,89 \pm 127,28$ auf $-1855,80 \pm 368,97$ mN/s ($n=5$) ($*p < 0,05$). Analog zu dF/dt_{max} waren keine Veränderungen bei GR113808 und GR125487 erkennbar (Abb. 14)

5-HT bewirkte bei TG eine Zunahme der Kontraktionskraft und Herzfrequenz (*p<0.05) (Tabelle 2). Dieser Effekt blieb bei WT aus. GR113808 unterdrückte als 5-HT_{4a}-Rezeptorantagonist in der Kombination mit 5-HT die Wirkung des 5-HT und es kam weder bei WT noch bei TG zu einer Kraftzunahme oder Frequenzsteigerung. Die Perfusion von ISO bewirkte sowohl bei WT als auch TG eine Steigerung der Inotropie und Chronotropie. Die dF/dt_{max} war basal bei TG im Vergleich zu WT vermindert. Die Zugabe von 5-HT bewirkte bei TG eine signifikante Geschwindigkeitserhöhung, die bei WT ausblieb. ISO hingegen bewirkte sowohl bei WT als auch TG eine Steigerung der dF/dt_{max}. Analoge Ergebnisse konnten bei der dF/dt_{min} festgestellt werden. 5-HT bewirkte eine signifikante Geschwindigkeitszunahme bei TG, nicht jedoch bei WT, und ISO steigerte sowohl bei WT als auch TG dF/dt_{min}.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse Versuche V1-V5

	WT				TG			
	mN	BPM	dF/dT _{max}	dF/dT _{min}	mN	BPM	dF/dT _{max}	dF/dT _{min}
5-HT	=	=	=	=	↑	↑	↑	↑
ISO	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
GR113808	=	=	=	=	=	=	=	=
GR125487	=	=	=	=	=	=	=	=
5-HT +GR113808	=	↓	=	=	=	↓	=	=

Die Perfusion mit 5-HT, GR113808, GR125387 sowie 5-HT+GR113808 führte bei WT zu keiner Veränderung der Kraft, Herzfrequenz sowie Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit im Vergleich zur Perfusion mit Tyrode-Lösung. Die Perfusion mit 5-HT und ISO führte in TG zu einer Steigerung des Effekts. 5-HT+GR113808 führte zu einer Abnahme der Herzfrequenz in WT und TG. GR113808 und GR125487 bewirkte keine Veränderung der Kraft, Herzfrequenz, dF/dt_{max} sowie dF/dt_{min} im Vergleich zur Perfusion mit Tyrode-Lösung. (= keine Veränderung, ↑=Steigerung des Effekts, ↓=Abnahme des Effekts)

4.4 Ischämie und Reperfusion – Teil I

Ein Ziel dieser Arbeit war es, das Verhalten von 5-HT_{4a}-Rezeptoren unter globaler Ischämie, also O₂ - und Nährstoffminderversorgung, näher zu charakterisieren. Dies erfolgte, wie im Methodenteil beschrieben, nach 20-minütiger Stabilisierungsphase durch 20-minütige Ischämie und 15-minütige Reperfusion von jeweils WT und TG im Vergleich. Während des gesamten Versuchsablaufs wurden die Parameter Kontraktionskraft (mN), Herzfrequenz (bpm), Kontraktions- und Erschlaffungsgeschwindigkeit dF/dt_{\max} und dF/dt_{\min} (mN/s), sowie Kontraktionszeit T1 (ms) und Relaxationszeit T2 (ms) erhoben (Tabelle 3). Außerdem erfolgte die Aufzeichnung der Herzmechanik von WT und TG-Hezen ohne I/R über den gleichen Zeitraum der I/R-Versuche, also 55 min. Diese Kontrollperfusion (CTR) diente als Zeitkontrolle dem Vergleich zwischen pathophysiologischer und physiologischer Herzmechanik am isoliert perfundierten Herzen. Auch die herzmekanischen Daten wurden mit I/R verglichen (Tabelle 3).

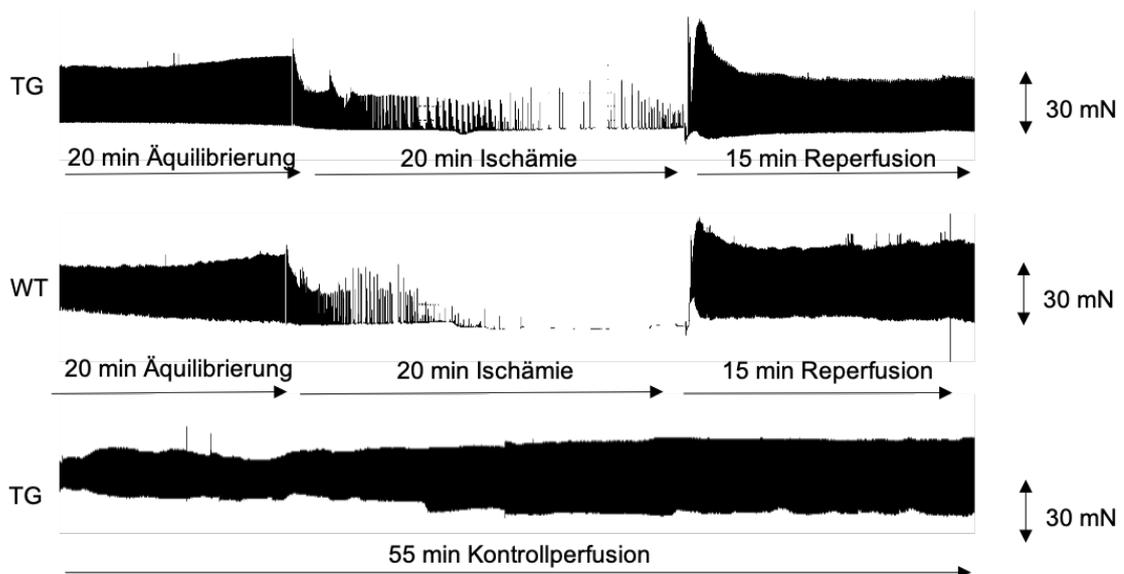


Abb. 15: Mechanogramme I/ R WT und TG, Kontrollperfusion

Die Herzen wurden nach 20-minütiger Äquilibrationszeit einer 20-minütigen Ischämiezeit ausgesetzt. Im Rahmen dieser Ischämie kam es zu einem deutlichen Kraftabfall. Nach 20 Minuten wurde die Perfusion mit Tyrode-Lösung wieder aufgenommen und es erfolgte eine Reperfusion für 15 Minuten. Die Ergebnisse wurden mit Kontrollperfusionsen über einen Zeitraum von 55 Minuten verglichen.

In Abbildung 15 sind repräsentative Originalaufzeichnungen der Ischämie/ Reperfusions-Mechanogramme sowie der Kontrollperfusion über 55 Minuten dargestellt. Innerhalb der 20-minütigen Äquilibrationsphase wurde von den Herzen Sinus-Rhythmus erreicht. Dies war

die Voraussetzung für die Versuchsdurchführung. Basal, also nach Stabilisierungsphase, wiesen WT eine Kontraktionskraft von $31,2 \pm 2,55$ mN ($n=14$) auf. TG zeigten vor Ischämie eine Kontraktionskraft von $27,6 \pm 1,73$ ($n=7$). Nach Abstellen der Peristaltik-Pumpanlage kam es zunächst bei WT und TG zu einem rapiden Kraftabfall von circa 50%, gefolgt von einer Phase multipler Arrhythmien. Nach Reperfusion kam es zunächst zu einer sehr starken Kraftzunahme (Peak). WT-Hezen erreichten nach Reperfusion eine Kontraktionskraft von $29,1 \pm 2,39$ mN ($n=14$) im Vergleich zur Ausgangslage. TG-Hezen zeigten eine Kontraktionskraft von $24,8 \pm 3,13$ mN ($n=7$). Es konnte während der Reperusionsphase keine signifikante Häufung von Reperusionsarrhythmien bei WT oder TG festgestellt werden. Die Auswertung der Daten der Kontrollperfusion im Sinne einer Zeitkontrolle im Vergleich zu Ischämie-Versuchen zeigte keine Unterschiede.

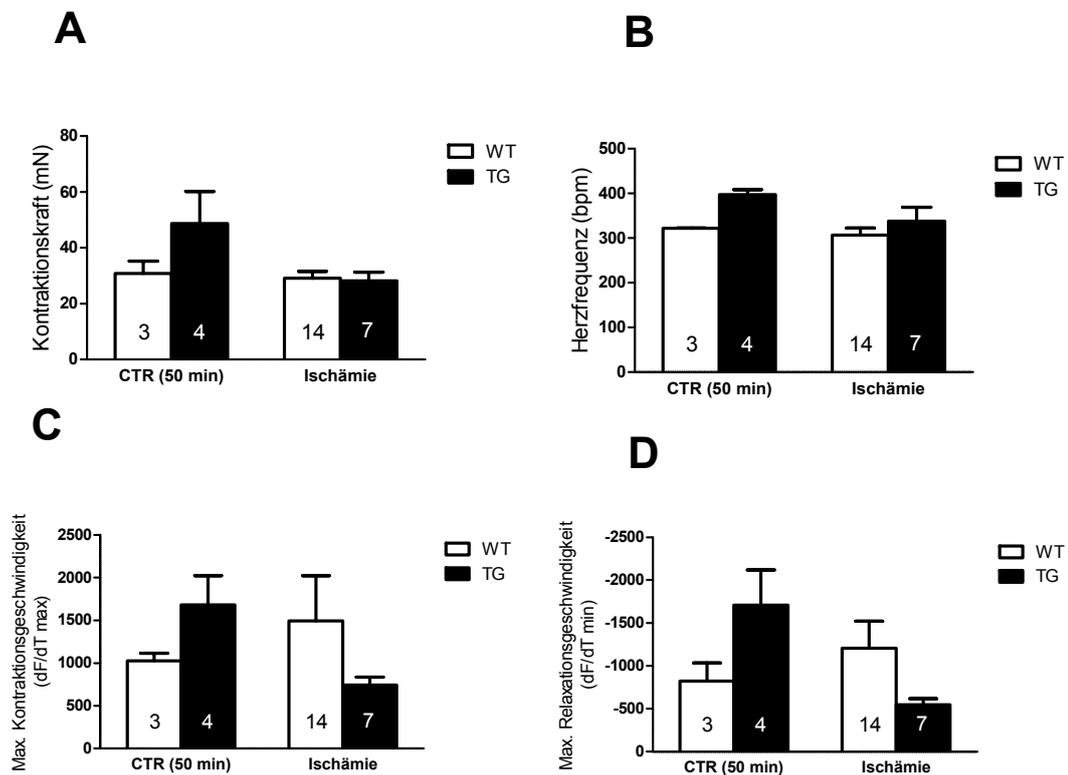


Abb. 16: Übersicht Kontrollperfusion sowie I/R WT und TG

WT und TG wurden nach I/R mit der Kontrollperfusion verglichen. Die Ergebnisse wurden nach 20 min Stabilisierungsphase, und zum Ende der Reperfusion (15 min) sowie nach 20 min Ischämie analysiert: Kontraktionskraft in mN (A), Herzfrequenz in bpm (B), maximale Kontraktionsgeschwindigkeit (dF/dt_{max}) in mN/s (C), maximale Relaxationsgeschwindigkeit (dF/dt_{min}) in mN/s (D). besser beschreiben

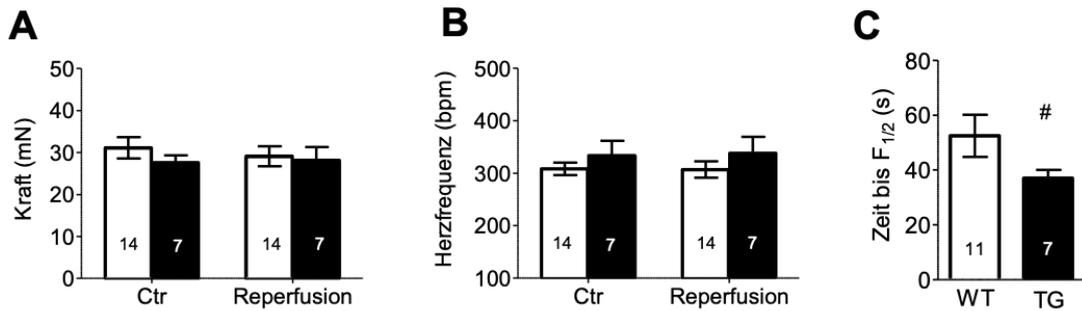


Abb. 17: Globale Ischämie bei WT und TG

Unter globaler Ischämie kam es bei transgenen Tieren (TG) zu einem schnelleren Kraftabfall als in Wildtyp-Geschwistertieren (WT) (C). Es gab keinen Unterschied bei der Kraftentwicklung und Herzfrequenz vor und nach Ischämie (A, B), sodaß anzunehmen ist, dass beide Mäusereien resistent gegenüber einer globalen Ischämie sind. Die Zeit bis zum 50%igen Kraftabfall ($F_{1/2}$) während der Ischämie war, ähnlich zu den hypoxischen Vorhöfen, in TG im Vergleich zu WT reduziert. (# $p < 0,05$)

WT-Mäuse wiesen präischämisch eine Kontraktionskraft von $31,1 \pm 2,55$ mN auf (n=14). Nach Reperfusion betrug die Kontraktionskraft $29,1 \pm 2,39$ mN (n=14) und nach 55 Minuten Kontrollperfusion $30,9 \pm 4,43$ mN (n=3). TG-Herzen zeigten präischämisch eine Kontraktionskraft von $27,6 \pm 1,73$ mN (n=7), nach Reperfusion erreichten sie $24,8 \pm 3,13$ mN (n=7) und nach 55-minütiger Kontrollperfusion $48,8 \pm 11,5$ mN (n=4). Die Herzfrequenz bei WT war präischämisch $308, \pm 11,84$ bpm (n=14), postischämisch $307,06 \pm 307,06$ bpm (n=14) und nach Kontrollperfusion $322 \pm 0,58$ bpm (n=14). TG-Herzen zeigten präischämisch eine Herzfrequenz von $334 \pm 28,42$ bpm (n=7), nach Reperfusion $339 \pm 31,48$ bpm (n=7) und nach Kontrollperfusion $397 \pm 11,38$ bpm (n=4). Die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit (dF/dt_{max}) betrug bei WT-Herzen vor Ischämie 1776 ± 577 (n=14), nach Reperfusion 1492 ± 527 (n=14) sowie nach Kontrollperfusion $1026 \pm 87,8$ (n=3). TG-Herzen wiesen präischämisch eine maximale Kontraktionsgeschwindigkeit von $751 \pm 85,4$ mN/s (n=7), nach Reperfusion von $744 \pm 90,1$ mN/s (n=7) sowie nach Zeitkontrolle von 1680 ± 342 mN/s (n=4) auf. Die maximale Relaxationsgeschwindigkeit (dF/dt_{min}) betrug bei WT präischämisch -1535 ± 375 (n=14), nach Reperfusion 1207 ± 317 (n=14) sowie nach Zeitkontrolle 824 ± 212 (n=3). Bei TG-Herzen lag präischämisch eine maximale Relaxationsgeschwindigkeit (dF/dt_{min}) von $-511 \pm 54,9$ mN/s (n=7) vor. Nach Reperfusion betrug die dF/dt_{min} $-550 \pm 69,9$ mN/s (n=7) und nach Zeitkontrolle -1712 ± 410 mN/s (n=4). Die Anspannungszeit T1 (ms) lag bei WT-Herzen präischämisch bei $32,9 \pm 2,62$ ms (n=14), postischämisch bei $30,2 \pm 3,21$ ms (n=14) sowie nach Kontrollperfusion bei

31,23±3,54 ms (n=3). TG-Herzen wiesen eine T1 von 32,29± 3,99 ms (n=7) präischämisch auf. Postischämisch betrug die T1 35,3±3,61 ms (n=7) sowie nach Kontrollperfusion 39,4± 4,76 ms (n=4). Die Erschlaffungszeit T2 (ms) betrug bei WT-Herzen präischämisch 44,8± 2,77 ms (n=14), postischämisch 38,9± 4,10 ms (n=14) sowie nach Kontrollperfusion 37,4± 4,22 ms (n=3). Die Erschlaffungszeit bei TG-Herzen war präischämisch 42,6± 4,31 ms (n=14), postischämisch 44,7± 3,61 ms (n=14) sowie nach Kontrollperfusion 44,0± 4,32 ms (n=4)

Tabelle 3: Übersicht Parameter I/R und 50-minütige Zeitkontrolle

	WT n=14	WT n=14	WT n=3	TG n=7	TG n=7	TG n=4
	Prä- ischämisch	Post- ischämisch	Zeit- kontrolle 50 min	Prä- ischämisch	Post- ischämisch	Zeit- kontrolle 50 min
Kontraktions- kraft (mN)	31,1 ± 2,55	29,1 ± 2,39	30,9 ± 4,43	27,6 ± 1,73	24,8 ± 3,13	48,8 ± 11,5
Herzfrequenz (bpm)	309 ± 11,8	307 ± 15,8	322 ± 0,58	334 ± 28,4	338 ± 31,5	397 ± 11,4
Max. Kontraktions- geschwindigkeit dF/dt _{max} (mN/s)	1775 ± 577	1492 ± 527	1026 ± 87,8	751 ± 85,4	744 ± 90,1	1680 ± 342
Max. Relaxations- geschwindigkeit dF/dt _{min} (mN/s)	-1535 ± 375	-1207 ± 317	-824 ± 212	-511 ± 54,9	-550 ± 69,9	-1712 ± 410
Anspannungszeit T1 (ms)	32,9 ± 2,62	30,2 ± 3,21	31,2 ± 3,54	32,3 ± 3,99	35,3 ± 3,61	39,4 ± 4,76
Erschlaffungszeit T2 (ms)	44,8 ± 2,77	38,9 ± 4,10	37,4 ± 4,22	42,6 ± 4,31	44,7 ± 3,61	44,0 ± 4,32

* $p < 0,05$

4.5 Reperfusion mit exogenem 5-HT – Teil II

Es erfolgte die I/R-Perfusion von TG-Herzen mit exogenem 5-HT bei Reperfusion (Abb. 18, Tab. 5).

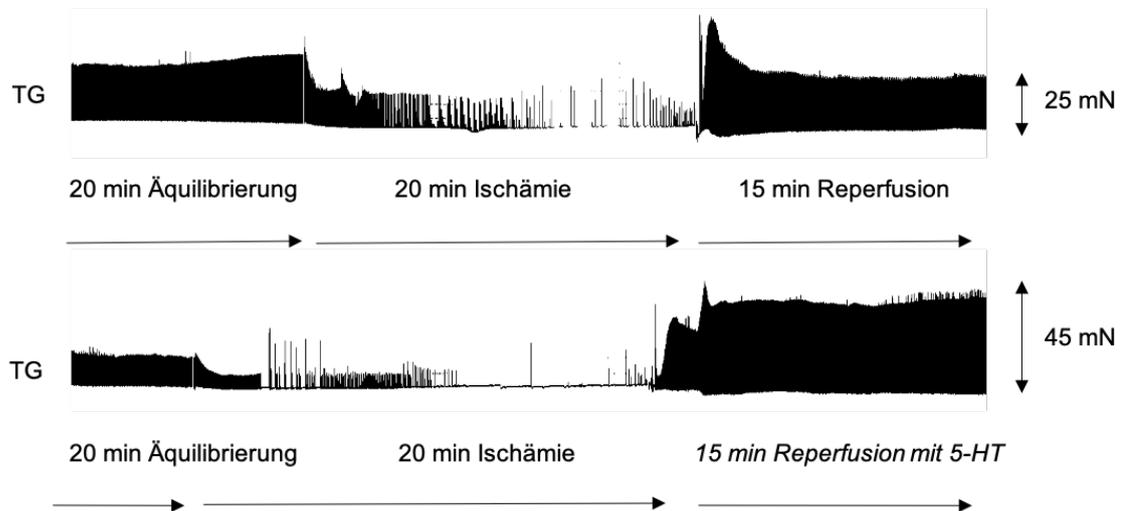


Abbildung 18: I/R mit Tyrode-Lösung und I/R mit Tyrode-Lösung+5-HT bei TG

20-minütige Ischämiezeit und Reperfusion mit Tyrode-Lösung bzw. mit Tyrode-Lösung und 5-HT von TG-Herzen. Es erfolgte eine Äquilierungsphase von 20 Minuten bis Erreichen des Sinus-Rhythmus. Dies galt als Voraussetzung für die weitere Versuchsdurchführung. Das TG-Herz zeigt exemplarisch nach 20-minütiger Ischämiezeit bei Reperfusion mit 5-HT eine stärkere Kraftzunahme als TG ohne 5-HT-Gabe, vor Allem zu Beginn der Reperfusionsphase, und vermehrtes Arrhythmie-Auftreten in der Reperfusionsphase.

Tabelle 4: Übersicht Werte I/R TG vs. I/R+5-HT TG

	Gruppe 1		Gruppe 2	
	TG n=7	TG n=7	TG n=3	TG+5-HT n=3
	Prä- Ischämisch	Post- Ischämisch	Prä- Ischämisch	Post- ischämisch
Kontraktions-kraft (mN)	27,6 ± 1,73	24,8 ± 3,13	19,0 ± 1,43	43,6 ± 9,43*
Herzfrequenz (bpm)	334 ± 28,4	338 ± 31,5	264 ± 34,0	355 ± 52,13
Max. Kontraktions- geschwindigkeit (dF/dt max)	750,86 ± 85,43	743,73 ± 90,13	449,54 ± 37,27	1470 ± 239*
Max. Relaxations- geschwindigkeit (dF/dt min)	-511 ± 54,9	-550 ± 69,9	-264 ± 54,1	-1402 ± 277*

(* $p < 0,05$ vs TG prä-ischämisch der entsprechenden Gruppe)

Analog zur Analyse der I/R-Versuche ohne 5-HT erfolgte die Analyse der Daten vor Ischämie und zu Beginn der Reperfusion mit 5-HT (Tabelle 4). Erhoben wurden die Parameter Kraftentwicklung in mN, Herzfrequenz in bpm, maximale Kontraktionsgeschwindigkeit (dF/dt_{max}) sowie maximale Relaxationsgeschwindigkeit (dF/dt_{min}). Die TG-Herzen wiesen nach Reperfusion mit 5-HT eine höhere Kraft von $43,9 \pm 9,43$ mN auf ($n=3$) als TG ohne 5-HT ($n=7$) ($p < 0,05$), während sie nach der Reperfusion mit Tyrode-Lösung eine Kraft von $24,8 \pm 3,13$ mN hatten ($n=7$). TG-Herzen zeigten nach Reperfusion ohne 5-HT eine Herzfrequenz von $338 \pm 31,5$ ($n=7$) und nach Reperfusion mit 5-HT $355 \pm 52,1$ ($n=3$). Die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit nach Reperfusion ohne 5-HT betrug $745 \pm 90,1$ ($n=7$) und war nach Reperfusion mit 5-HT 1470 ± 239 erhöht ($n=3$) ($p < 0,05$). Die maximale Relaxationsgeschwindigkeit betrug nach Reperfusion ohne 5-HT $-550 \pm 69,9$ ($n=7$) und nach Reperfusion mit 5-HT -1402 ± 277 ($n=3$) ($p < 0,05$). Es kam während der Reperfusion mit 5-HT zu einer messbaren Veränderung der Herzmechanik.

5. Diskussion

5.1 Methoden

5.1.1 Kardiale Überexpression des 5-HT_{4a}-Rezeptors

Die seinerzeitige Generierung des transgenen Tiermodells erfolgte durch genomische Integration einer Expressionskassette, welche die cDNA des menschlichen 5-HT_{4a}-Rezeptors unter Kontrolle des Maus- α -MHC-Promoters enthielt (Gergs et al. 2010). Dadurch konnte eine kardialen Überexpression des 5-HT_{4a}-Rezeptors erzielt werden. Zur Rezeptordichte des 5-HT_{4a}-Rezeptors in den verwendeten Mäuseherzen kann gegenwärtig keine Aussage getroffen werden, weil mit kommerziell verfügbaren Antikörpern gegen den 5-HT_{4a}-Rezeptor mangels Spezifität bisher keine erfolgreichen Westernblot-Untersuchungen durchgeführt werden konnten. Allerdings konnte gezeigt werden, daß keine funktionellen 5-HT_{4a}-Rezeptoren am WT-Mausherz vorkommen (Gergs et al. 2010), daher ist ein Vergleich der verwendeten Versuchsgruppen zur Untersuchung dieses Rezeptors sinnvoll. Außerdem legen die funktionellen Untersuchungen nahe, daß von einer ähnlich hohen Rezeptordichte wie für den β -Rezeptor ausgegangen werden kann. So wurde mit Serotonin die gleiche maximale Kraftzunahme in isolierten Herzpräparaten erzielt wie mit dem β -Adrenozeptoragonisten Isoprenalin (Gergs et al. 2010, 2013).

5.1.4 Langendorff-Apparatur

Mit Hilfe der Langendorff-Apparatur kann, wie bereits beschrieben (siehe Kapitel Material und Methoden) ein Herz über einen längeren Zeitraum *ex vivo* perfundiert werden und somit die Herzfunktion ohne neuronale und humorale Einflüsse des Gesamtorganismus untersucht werden. Auch die Anwendung verschiedener Pharmaka durch das Einleiten über eine separate Pumpanlage ist ohne die Beeinträchtigung, Schädigung oder das Auslösen von Stresssituationen anderer Organsysteme möglich. Durch die Isolation des Herzes sinkt jedoch im Gegenzug die klinische Relevanz, da wichtige hormonelle Regelkreise des Organismus gänzlich fehlen (Bell et al. 2011). Zwar können Herzen mittels der von Langendorff beschriebenen Methode über mehrere Stunden perfundiert werden und somit außerhalb eines Organismus schlagen, jedoch kommt es trotzdem zu einem gewissen Zeitpunkt zum Herzstillstand. Außerdem kommt es im Laufe der Versuchsdurchführung zu einer kontinuierlichen Abnahme der Kontraktionskraft und Herzfrequenz um etwa 5-10% (Sutherland und Hearse 2000). Dies kann zu einer Verfälschung der Untersuchungsergebnisse führen. Bei der retrograden Perfusion nach Langendorff erfolgt eine Ventrikel des Herzes nicht gefüllt. Eine andere Methode der Perfusion nach Langendorff stellt das „working-heart-model“ dar, wobei das Herz anterograd perfundiert wird. Dabei kommt es zur Ventrikel-Füllung. Dadurch kommt es zu einer klassischen Zirkulation, die vergleichbar mit dem Kreislauf beim Menschen ist. Durch die sich einstellende Nachlast können mit dieser Methode andere Effekte auftreten als bei der Methode des retrograd perfundierten Herzes (Gergs et al. 2010).

5.2 Basale Charakteristika, Agonisten- und Antagonistenversuche

Die Herzfrequenz war bei TG im Vergleich zu WT signifikant erhöht. Die dF/dt_{max} war basal bei TG im Vergleich zu WT signifikant vermindert. Wie bereits beschrieben (siehe Kapitel 1.7), bewirkt die Signalkaskade des Rezeptors eine Steigerung der Inotropie. Dies konnte bereits in anderen Studien am 5-HT_{4a}-Rezeptor gezeigt werden (Gergs et al. 2013). Eine basale Stimulation weist damit möglicherweise darauf hin, daß die Generierung des Tiermodells mit 5-HT_{4a}-Rezeptor-Überexpression erfolgreich war.

Es erfolgte die Perfusion von isolierten WT- und TG-Herzen mit Tyrode-Lösung, 5-HT, Isoprenalin, GR113808+5-HT sowie GR113808 und GR125438. Wir haben auch aus folgendem Grund einige Versuche zur basalen Antwort auf 5-HT₄ Agonisten (erste Teil der Arbeit) wiederholt. Im hier vorliegenden Projekt, wurden die Herzen nach Langendorff also retrograd mit Puffer perfundiert. In unserer Vorarbeit (Gergs et al. 2010) hatten wir die Herzen anterograd perfundiert - als sogenanntes „Arbeit leistendes Herz“, bei dem es zum Druckaufbau in der Aorta kommt und somit Arbeit geleistet wird. Unterscheidungen der Basalwerte zwischen retrograd perfundierten Herzen und „Herzarbeit“ leistender Herzen kann somit durch den unterschiedlichen Versuchsaufbau erklärt werden. Die Kraft war unter basalen Bedingungen beim Arbeit leistenden Herzen nicht verändert, während die Frequenz erhöht war. Es war für die weiteren Versuche wichtig zu klären, ob diese methodischen Veränderungen sich in einem geänderten Phosphorylierungszustand typischer regulatorischer Protein widerspiegeln. Kurz zusammenfassend beobachteten wir sehr ähnliche Effekte, was die Vergleichbarkeit dieser Daten mit den früheren (Gergs et al. 2010) nahe legt.

5-HT bewirkte bei TG eine signifikante Veränderung aller aufgezeichneten Parameter. Es kam zu einer Zunahme der Kontraktionskraft und Herzfrequenz. Dieser Effekt blieb bei WT aus. Die Zugabe von 5-HT bewirkte bei TG eine Zunahme der dF/dt_{max} und Abnahme der dF/dt_{min} , die bei WT ausblieb. Bach et al. zeigten bereits, daß 5-HT_{4a} und 5-HT_{4b}-Rezeptoren eine fast identische Pharmakologie besitzen und beide in menschlichen Vorhöfen und Ventrikeln exprimiert werden (Bach et al. 2001b). Gergs et al. untersuchten den 5-HT_{4a}-Rezeptor an isolierten Vorhofpräparaten (Gergs et al. 2013). 5-HT führte zur Steigerung der Kontraktionskraft in linken Vorhofpräparaten. Die Stimulation mit 5-HT bewirkte eine Phospholamban-Phosphorylierung von Ser-16 und Thr-17 bei TG, nicht aber WT. Dies konnten bereits frühere Studien an menschlichen Vorhofpräparaten in vitro zeigen (Gergs et al. 2009). Isoprenalin erhöhte die Kontraktionskraft und Herzfrequenz in WT und TG. Dies würden wir als Kontrolle interpretieren, die zeigt: der β -Adrenozeptor ist funktionell bei WT intakt. Beide Versuchsgruppen wiesen eine Zunahme der dF/dt_{max} sowie eine Abnahme der dF/dt_{min} auf. Es handelt sich hier um eine Stimulation des β -Adrenozeptors, der funktionell in beiden Versuchsgruppen aktiv ist. Dadurch kann, im Vergleich

zur Stimulation mit 5-HT, auch bei WT, ein Effekt erzielt werden. Analog war bei WT und TG nach der Perfusion mit Isoprenalin eine signifikante Zunahme der Phospholamban-Phosphorylierung an Ser-16 und Thr-17 in früheren Versuchen nachweisbar (Gergs et al. 2010). Die Effekte von 5-HT konnten wie in der Vergangenheit durch GR125487 und GR113808 in linken Vorhofpräparaten von Maus und Mensch blockiert werden (Gergs et al. 2009, 2013). Diese Ergebnisse stimmen mit der hier durchgeführten Studie überein. Die Gabe der Antagonisten GR125487 und GR113808 zeigten keine Veränderung der Herzmechanik in WT und TG. Die Blockade des 5-HT₄-Rezeptors durch Rezeptor-Antagonisten an kontrahierenden Präparaten des Schweines und des Menschen konnte bereits durch Kaumann et al. 1993 festgestellt werden (Kaumann 1993). Durch diese Versuche konnte ebenfalls gezeigt werden, daß der 5-HT_{4a}-Rezeptor durch den G_s-Protein-vermittelten Signalweg in den TG Tieren funktionell aktiv war.

5.3 *In vitro* Perfusion nach Langendorff - Ischämie und Reperfusion

Ziel dieser Arbeit war es unter anderem, das Verhalten des 5-HT_{4a}-Rezeptors unter pathophysiologischen Bedingungen, also Ischämie (O₂ - und Nährstoffminderversorgung) näher zu charakterisieren. Nach einer Stabilisierungsphase von 20 min (Ctr) erfolgte eine 20-minütige Ischämie und 15-minütige Reperfusion von jeweils WT und TG. Parallel erfolgte vergleichend in einer Zeitkontrolle (CTR) die Perfusion isolierter Herzen mit Tyrode-Lösung ohne I/R über den gleichen Zeitraum (50 min) untersuchen sollte. An diesen Präparaten konnten somit Kraftmessungen im Zeitverlauf und biochemische Untersuchungen zum Zeitpunkt des Einfrierens durchgeführt werden. In Bezug auf die Herzmechanik wiesen beide Versuchsgruppen während und nach I/R keine Veränderungen im Vergleich zur Ausgangslage (Ctr) oder Zeitkontrolle (CTR) auf. Beide Versuchsgruppen (WT und TG) wiesen Arrhythmien in der Reperfusionsphase auf, aber deren Inzidenz war nicht verschieden. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Dies lässt Grund zur Annahme, dass es im Rahmen der Ischämieversuche zu keinerlei Schädigung der Herzgewebe kam. Mißlinger et al. verglichen im Ischämie- und Reperfusions-Versuch unter identischen Versuchsbedingungen Histamin-H₂-Rezeptor überexprimierende Mäuse mit WT und es zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied in Bezug auf Arrhythmien und Herzmechanik (Mißlinger 2019; Gergs et al. 2019). Dies entspricht nicht den erwarteten Ergebnissen. Eine Studie an Vorhöfen von Histamin-H₂-überexprimierenden Mäusen zeigten nach einer Hypoxie bei Reoxygenierung eine schnellere Erholung der Kontraktionskraft der TG im Vergleich zu WT (Gergs et al. 2020). Ein solcher Effekt konnte in den Versuchen nicht beobachtet werden; dies könnte aber auch methodische Gründe haben, da sich isolierte rechte Vorhöfe anders als isolierte Herzen verhalten werden: an isolierten Herzen wird die Kraft an der Apex cordis und somit am linken Ventrikel gemessen und

nicht am rechten Vorhof: in anderen Worten es könnte sein daß wir aus ethischen Gründen am isolierten Herzen lokale Arrhythmien am rechten Vorhof übersehen haben, weil sie für die Mechanik des linken Ventrikels irrelevant wären. Studien an Ventrikeln von Ratten mit Herzinsuffizienz zeigten nach einem Herzinfarkt eine positiv inotrope Reaktion auf 5-HT, welche 5-HT₄- sowie 5-HT_{2A}-Rezeptor-moduliert war. Außerdem kam es zu einer Hochregulation von der 5-HT₄-Rezeptor messenger-RNA in Ventrikeln von menschlichen Herzinsuffizienz-Patienten sowie Rattenherzen mit Herzinfarkt, Herzinsuffizienz und Hypertrophie (Brattelid et al. 2004c, 2007; Qvigstad et al. 2005).

Dieses Rattenmodell ist aber sicher nicht direkt mit unserem Model vergleichbar, weil an den Ratten intrinsisch Serotonin auf die Kraft des Herzes wirkt, aber über 5-HT₂-Rezeptoren und weil erst mehrere Tage nach stattgehabtem und überlebtem Infarkt die Neuexpression des 5-HT₄-Rezeptors und seine Kopplung an die Kraft begann. Wir würden im Gegenteil argumentieren können, unser Model ist mit dem menschlichen Vorhof eher vergleichbar als Versuche an der Ratte, weil TG von Beginn der Versuche an, genauso wie der Mensch, kontraktile aktive 5-HT₄-Rezeptoren besitzen.

Jennings et al. unterzogen Hunden durch Ligation der Herzkranzgefäße *in vivo* 15 min Ischämie und 20 min Reperfusion. Die Ergebnisse korrelieren mit den in dieser Arbeit gewonnenen Daten. Er fand heraus, daß die mitochondriale Adenosintriphosphat-Produktion nach drei Minuten wieder komplett hergestellt war. Außerdem konnte kein Anstieg des zytosolischen Calciums detektiert werden, jedoch blieben ein myokardiales Ödem sowie gesteigerte Kalium-Werte über 20 min hinweg bestehen. Außerdem konnten ultrastrukturelle Konsequenzen der Ischämie konnten nach 20 min der Reperfusion wieder aufgehoben werden (Jennings et al. 1985). Dies stimmt mit den hier erhobenen Daten überein. Demnach konnten sowohl WT als auch TG nach 15-minütiger Reperfusion wieder präischämische Werte der basalen Kontraktion erreichen, weil die Herzen nicht strukturell in der kurzen Ischämie-Zeit geschädigt wurden. Ein Anstieg auf Ausgangswerte konnte ebenfalls bereits nach kurzer Zeit (≥ 3 min) beobachtet werden. Ein fehlender Unterschied der Herzmechanik der Versuchsgruppen könnte somit auch durch die Dauer der Ischämie und Reperfusion begründet sein. Bognik et al. zeigten jedoch an A2A-überexprimierenden Tieren im Langendorff-Versuch, dass der Unterschied der Versuchsgruppen bei einer Ischämiezeit von 20 Minuten am größten war, ferner fanden sie eine irreversible Schädigung der Herzkraft von WT Mäusen erst bei 40- und 60-minütiger Ischämie in einer ähnlichen aber nicht identischen Langendorff-Apparatur von einem kommerziellen Anbieter (Bognik et al. 2018).

Die Krankheitsbilder koronare Herzkrankheit und Herzinsuffizienz sind beim Menschen mit erhöhten 5-HT-Plasmakonzentrationen assoziiert (van den Berg et al. 1989; Vikenes et al. 1999; Hirowatari et al. 2004; Hara et al. 2004), was natürlich keine Kausalität beweist, sondern nur eine Korrelation die eine Kausalität aber nicht ausschließt. Außerdem kommt es durch ein I/R-Ereignis kommt es zur Akkumulation von 5-HT im Gewebe. Dies führt zu einem schnellen Fortschreiten der myokardialen Schädigung und zu kardialer Dysfunktion (Shimizu et al. 2002; Du et al. 2017). Im Rahmen der Organentnahme der hier zu besprechenden Versuchsserie wurde das Herz mit Tyrode-Lösung gespült, sodaß Blutbestandteile aus dem Herz entfernt wurden. Pönicke et al. zeigten jedoch, daß 5-HT im Herzen nicht nur aus Blut, sondern auch aus Endothel-Zellen und Kardiomyocyten stammt (Pönicke et al. 2012). Somit ist fraglich, ob es bei der Perfusion mit Tyrode-Lösung zu einem so hohen Anstieg der 5-HT-Konzentration im Herzen kam, wie es *in vivo* der Fall wäre. Dies könnte in weiteren Versuchsserien durch 5-HT-Messungen von Herzen, die während der Ischämie und der frühen Reperfusion eingefroren würden geklärt werden, war aber aus zeitlichen Gründen in dieser Arbeit nicht zu leisten.

Dort wird die Freisetzung aus Mastzellen, sympathischen Nervenendigungen sowie einer geringen Anzahl noch vorhandener Thrombozyten im myokardialen Kapillarsystem erklärt (Shimizu et al. 2002). Shimizu et al. fanden zudem heraus, daß der 5-HT₂-Antagonist Sarpogrelate die Infarktgröße am Myokard durch die Hemmung der 5-HT-Freisetzung verkleinerte. Dies ist auf die PKC-Translokation und die Öffnung der mitochondrialen KATP-Kanäle in ischämischen Myozyten zurückzuführen (Shimizu et al. 2002). Auch eine Synthese von 5-HT am Herzen ist möglich. Gergs et al. stellten fest, daß inotrop aktives 5-HT vermutlich im Herzen und sogar in Kardiomyocyten gebildet wird (Pönicke et al. 2012; Gergs et al. 2017). Um *in vivo*-Bedingungen besser nachzuahmen, erfolgte die Reperfusion nach Ischämie in einem weiteren Versuchssarm mit exogen appliziertem 5-HT. Dies gab Grund zur Annahme, daß die exogene Applikation von 5-HT über eine zusätzliche Spritzeanlage eine deutliche Unterscheidung der Versuchsgruppen WT und TG nach Ischämie verursachen würde. Es wurde eine erhöhte Ansprechbarkeit von TG auf 5-HT und ein positiv inotroper Effekt bei Reperfusion erwartet. TG Tiere sollten schneller präischämische Werte erreichen, als WT. Die Perfusion mit exogenem 5-HT während Reperfusion führte zu einer signifikanten Veränderung der Herzmechanik. TG- Herzen wiesen nach Reperfusion mit 5-HT eine höhere Kraft auf als TG- Herzen nach Reperfusion ohne 5-HT. Die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit war nach Reperfusion mit 5-HT erhöht. Es kam zu einer Abnahme der maximalen Relaxationsgeschwindigkeit nach Reperfusion mit 5-HT. In weiterführenden Studien wäre die Messung der 5-HT-Konzentration während der I/R ein wichtiger Parameter, um interstitielle Konzentrationen von 5-HT im Myokard zu messen.

5.4 Weiterführende Untersuchungen (entnommen der Dissertation C. Röttger 2021)

5.4.1 Phosphorylierung Phospholamban an Serin-16 und Threonin-17

Wie eingangs erläutert, war ein Ziel dieser Arbeit, unter bekannten (Gergs et al. 2010) Bedingungen frisches Gewebe (also nicht fast zehn Jahre alt nutzen zu müssen), um biochemischen Mechanismen der 5-HT₄-Rezeptor bedingten Serotonin-Wirkung am Säugetierherzen als Model für das menschliche Herz vertieft nachgehen zu können. Wie bereits beschrieben, löst 5-HT über einen G_s-Protein-Signalweg durch den Anstieg von cAMP und die PKA-Aktivität kardiale Effekte aus (siehe Kapitel 1.7, Seite 17). Dazu gehört die PKA-abhängige Phosphorylierung von Phospholamban an der AS Serin-16. Auch die Phospholamban-Phosphorylierung an Threonin-17 wurde anhand von Western Blots untersucht. Diese erfolgt Ca²⁺-abhängig, also nur im kontrahierenden Herzen, indem es entsprechend zu einem Anstieg des zytosolischen Calciums kommt. Eine 5-HT₄-Rezeptor-vermittelte Phosphorylierung von Phospholamban konnte in menschlichen und 5-HT₄-TG-Vorhöfen bereits gezeigt werden (Gergs et al. 2009, 2013). Die untenstehende Tabelle zeigt die Ergebnisse von Western Blots mit den in dieser Arbeit generierten Gewebeproben der Versuche mit den Substanzen 5-HT, ISO, GR113808+5-HT, GR113808 und GR125487. Dabei ist erkennbar, daß eine gesteigerte Phospholamban -Phosphorylierung an TG bei 5-HT-Zugabe und ISO-Zugabe nachweisbar war, nicht jedoch bei der Zugabe von GR113808 oder GR125487. Bei WT kam es unter 5-HT-Zugabe zu keiner Phospholamban -Phosphorylierung, bei ISO-Zugabe jedoch schon (Tabelle 5). Dadurch konnten Signalwege des 5-HT am 5-HT₄-Rezeptor am isolierten Herzen gezeigt werden. Die biochemischen Ergebnisse korrelieren mit den aufgezeichneten funktionellen Werten aber auch mit historischen Vergleichswerten (Gergs et al. 2010).

Tabelle 5: Phosphorylierungszustand an Phospholamban-Ser-16 und Thr-17 (Röttger et al. 2019, Dissertation C. Röttger 2021)

	WT					
	Ctr	5-HT	ISO	GR113808	GR125487	5-HT+GR113808
Ser-16	=	=	+*	=	=	=
Thr-17	=	=	+*	=	=	=
	TG					
	Ctr	5-HT	ISO	GR113808	GR125487	5-HT+GR113808
Ser-16	=	+*	+*	=	=	=
Thr-17	=	+*	+*	=	=	=

Die Tabelle zeigt den Phosphorylierungszustand an Phospholamban-Ser-16 und Thr-17 in WT und TG bei Zugabe herzspezifischer Pharmaka (siehe Versuche 1-5). Die Zugabe von ISO bei WT führt zu einer Phospholamban-Phosphorylierung an Ser-16 und Thr-17. Bei TG führt die Zugabe von 5-HT und ISO zu einer Phospholamban-Phosphorylierung an Ser-16 und Thr-17 ($*p < 0,05$). (Röttger et al. 2019, Dissertation C. Röttger 2021) (=unverändert, +erhöht)

Ein neuer Aspekt, der erst mit Proben der hier vorliegenden Versuchsserie zum ersten Mal untersucht wurde, ist Folgender: Die Phospholamban-Phosphorylierung wurde ebenso in den Gewebeproben der Herzen überprüft, die einer I/R ausgesetzt waren. Dabei kam es unter Zugabe von 5-HT während der Reperfusionphase zu einer deutlichen Zunahme des p-Ser16 und p-Thr17 bei TG, nicht aber WT Herzen. Unter Abwesenheit von 5-HT konnte weder in WT noch in TG eine Phospholamban-Phosphorylierung beobachtet werden. Analog zu den vorgehenden Versuchen führte die Zugabe von 5-HT bei TG im Rahmen der Zeitkontrolle zu einer Steigerung des Phospholamban-Phosphorylierungsgrades (Tabelle 6): das könnte man zumindest so deuten, daß die Präparate lange genug stabil sind um auch nach 50 Minuten noch einen Anstieg der Phosphorylierung grundsätzlich an TG messen zu können und damit wohl aussagefähig und glaubwürdig sind.

Tabelle 6: Phosphorylierungszustand von Phospholamban-Ser-16 und Phospholamban-Thr-17 in I/R Versuchen: WT und TG (*<0,05 vs. Ctr) (Röttger et al. 2019, Dissertation C. Röttger 2021)

	WT			
	Ctr	Ischämie	Ischämie+5-HT	tCtr+5-HT
Ser-16	=	=	=	=
Thr-17	=	=	=	=
	TG			
	Ser-16	=	=	+*
	Thr-17	=	=	+*

Die Tabelle zeigt den Phosphorylierungszustand von Phospholamban -Ser-16 und Phospholamban -Thr-17 in I/R Versuchen: WT und TG (*<0,05 vs. Ctr) (Röttger et al. 2019, Dissertation C. Röttger 2021) (Ctr=Kontrollperfusion 20 min. Perfusion mit Tyrode-Lösung, tCTR=Zeitkontrolle 50 min Perfusion mit Tyrode-Lösung). tCTR=Zeitkontrolle 50 min Perfusion mit Tyrode-Lösung (=unverändert, +erhöht)

5.4.2 Phosphorylierung von p38 und ERK1/2

Bei der Reperfusion nach Ischämie kommt es zur Veränderung der Signaltransduktion und der Immunregulation im Myokard, darunter auch zur Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK). Hier muß man einschieben, daß die Signaltranduktion der G-Protein gekoppelten Rezeptoren wie wir heute wissen subtiler ist, als die Abb 1 vermuten läßt. Robert Lefkowitz und andere Gruppen haben in überzeugender Weise gezeigt, daß G-Proteingekoppelte Rezeptoren nicht nur über G-Proteine and intrazelluläre Signalkaskaden koppeln können, sondern z.B. über β -Arrstin direkt an weitere Wege wie MAPK. Bisher war dies jedoch für 5-HT4 Rezeptoren am Herzen nicht untersuchte worden, da dies nur am Schwein oder Menschen machbar wäre oder eben an unseren TG. MAPK sind Enzyme, welche verschiedene Zellfunktionen wie z.B. die Apoptose regulieren. Besondere Bedeutung kommt den MAPK bei I/R zu, da verschiedene Studien eine Aktivierung von MAPK unter I/R belegten (Knight und Buxton 1996; (Mizukami und Yoshida 1997). Es kann momentan noch nicht abschließend beurteilt werden, ob die Aktivierung von MAPK eine kardioprotektive oder schädliche Funktion

hat. In Studien konnten Effekte beider Art festgestellt werden (Übersicht: Murphy and Steenbergen 2008). Im Rahmen dieses Projekts mit Herz-Proben dieser Arbeit wurden die MAPK p38 sowie ERK1/2 untersucht. Da die Befunde die vorgelegten Kraftdaten vielleicht besser verstehen lassen, soll hier kurz auf die Ergebnisse eingegangen werden. Details sind in der ausführlichen Dissertation von Frau Röttger nachzulesen, der hier nicht zuvorgekommen werden soll (Röttger 2021, Gergs et al. 2021). Bei beiden MAPK konnte bereits in vorangegangenen Studien eine Aktivierung durch I/R nachgewiesen werden (Knight und Buxton 1996; Mizukami und Yoshida 1997).

Die Aktivierung der MAPK wurde im Zusammenhang mit dem 5-HT_{4a}-Rezeptor untersucht. Durch die Stimulation des 5-HT_{4a}-Rezeptors kommt es zum Anstieg von cAMP. Dies kann auch zur Phosphorylierung von MAPK führen (Gerits et al. 2008). Es wurde deshalb eine mögliche Wechselwirkung zwischen dem 5-HT_{4a}-Rezeptor und MAPK untersucht. Im Rahmen der gewonnenen Proben der *in vitro* Versuchsreihe isolierter Herzen nach Zugabe der erwähnten Pharmaka wies der ermittelte relative Phosphorylierungsgrad keine Wechselwirkung zur Bildung von cAMP auf, welches leider nicht direkt gemessen wurde. Der im Western Blot ermittelte Phosphorylierungsgrad stimmte nicht mit der PKA-Aktivierung überein (Röttger et al. 2019). Ein Effekt bei der Gabe von ISO im Sinne einer erhöhte MAPK-Phosphorylierung wurde erwartet, da dies in einigen Studien bereits nachgewiesen werden konnte (Knight and Buxton 1996). Auf Grund der starken Streuung der Western-Blot-Ergebnisse ist davon auszugehen, daß entweder mehr Versuche oder ein modifiziertes Versuchsprotokoll notwendig sind um eine eindeutigere Aussage machen zu können.

Die Gewebeproben der Ischämie-und Reperfusion-Versuchsreihen wurden mittels Western Blots analysiert. Dadurch konnte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen I/R und der Aktivierung des MAPK-Signalwegs besteht. Bei WT kam es nach I/R gegenüber der Zeitkontrolle zu einer Zunahme der p-38-Phosphorylierung ($p < 0,05$). Nach I/R kam es bei TG bei zusätzlicher 5-HT-Zugabe zu einer p-38-Phosphorylierung ($p < 0,05$). Die I/R führte bei WT zu keiner messbaren Veränderung des Phosphorylierungszustands von ERK1/2, doch bei TG zeigte sich eine signifikante Zunahme der ERK1/2-Phosphorylierung gegenüber WT ($p < 0,05$). Vergleicht man nun die biochemischen Ergebnisse mit den Aufzeichnungen der Herzarbeit, so wird deutlich, daß man zwar auf makroskopischer Ebene nur Unterschiede in der Erholung der Kraft zwischen den Versuchsgruppen feststellen kann, doch unter biochemischen Aspekten Unterschiede auftreten und die bessere Erholung der Kraft doch vielleicht erklären können, wenn auch genauere mechanistische biochemische Untersuchungen zu begrüßen wären.

Table 7: Phosphorylierungszustand von ERK1/2 (A) und p38 (B) bei WT und TG – I/R (Röttger et al. 2019, Dissertation C. Röttger 2021)

	WT			
	Ctr	I/R		
P-ERK 1/2	=	=		
P-p38	=	+*		
	TG			
	Ctr	I/R	Ischämie+5-HT	tCtr+5-HT
P-ERK 1/2	=	+#	=	=
P-p38	=	=	=	=

Dargestellt sind die im Western Blot anhand von Antikörpern ermittelten Daten an P-p38 und p38 sowie p-ERK1/2 und ERK1/2 im Rahmen der Zeitkontrolle, Ischämie, Ischämie+5-HT sowie Zeitkontrolle+5-HT. Bei TG kam es zu einer signifikanten p-ERK1/2-Phosphorylierung nach Ischämie. WT zeigten bei nach Ischämie eine p-38-Phosphorylierung. TG zeigten ebenfalls eine p-38-Phosphorylierung nach Ischämie, jedoch unter zusätzlicher Zugabe von 5-HT bei Ischämie. (*<0,05 vs. Ctr WT, #<0,05 vs. Ctr TG) (Ctr=Kontrollperfusion 20 min. Perfusion mit Tyrode-Lösung, tCTR=Zeitkontrolle 50 min Perfusion mit Tyrode-Lösung). (=unverändert, +erhöht)

5.4.3 Expression regulatorischer Proteine (qPCR-Methode)

Die Analyse der Expression regulatorischer Proteine und deren möglicher Einfluss auf den 5-HT_{4a}-Rezeptor erfolgte des weiteren mittels quantitativer PCR im Rahmen der Dissertation der Frau Röttger. Untersucht wurde eine mögliche messenger-RNA-Expression der natriuretischen Peptide Typ A (ANP) und Typ B (BNP). ANP und BNP sind etablierte Parameter im Herzgewebe und im Blut von Patienten, um das Vorliegen sowie das Ausmaß und den Verlauf einer Herzinsuffizienz zu bestimmen. ANP und BNP dienen als Marker zur Detektion einer möglichen kardialen Dysfunktion, die zu Herzinsuffizienz und Hypertrophie führt. Aufgrund vorangegangener Studien wurde eine gesteigerte Expression von ANP und BNP erwartet. An

Kardiomyocyten von Ratten-Herzvorhöfen konnte beispielsweise bereits eine Steigerung der Synthese und Freisetzung von ANP und BNP nach I/R gezeigt werden (Bugrova 2016). Die gesteigerte ANP-Expression in der TG-Kontrollgruppe ohne I/R sollte genauer untersucht werden. Ursächlich könnte auch in diesem Fall eine basale Aktivität des 5-HT₄-Rezeptors sein.

Es erfolgte außerdem die Quantifizierung der messenger-RNA-Expression des Transkriptionsfaktors NF- κ B sowie dessen Gegenspieler I- κ B sowie der proinflammatorischen Proteine Interleukin 6 (IL-6) und Interleukin 1 β (IL-1 β), um eine mögliche Immunaktivierung während I/R darzustellen. Es besteht ein Zusammenhang zwischen I/R und der Aktivierung der myokardialen Zytokinsynthese; der myokardiale Reperfusionsschaden steht demnach wohl auch in direktem Zusammenhang mit einer Entzündungsreaktion, *In vivo* Versuchsreihen zeigten eine Zunahme der Produktion proinflammatorischer Proteine IL-6 sowie IL-1 β nach Ischämie und Reperfusion (Kukielka et al. 1994; Chandrasekar et al. 1998). IL-6-messenger-RNA war bei TG in der Zeitkontrolle gegenüber der TG-I/R-Gruppe und der 5-HT-reperfundierten TG-I/R-Gruppe erhöht (Röttger et al. 2019). IL-1 β war bei TG ebenfalls in der Zeitkontrolle gegenüber der TG-I/R-Gruppe und der 5-HT-reperfundierten TG-I/R-Gruppe erhöht sowie gegenüber der 5-HT behandelten TG-Zeitkontrolle. Verschiedene Aspekte für diese Ergebnisse müssen in Betracht gezogen werden. Auch in diesem Fall könnte die Abkühlung des Herzes während Ischämie einen Einfluss auf die Expression auf messenger-RNA-Level gehabt haben.

Im Rahmen der Ischämie und Reperfusion im Myokard kommt es zu einer sterilen Inflammation (Hristov and Weber 2015). Diese wird unter anderem durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B und das zugehörige Inhibitor-Protein I- κ B reguliert. Es wurde deshalb die Expression von NF- κ B und I- κ B mittels qPCR untersucht. Ischämie und Reperfusion im Myokard verschiedener tierischer Versuchsgruppen wie Rattenherzen und Hundeherzen *in vivo* zeigte in vorangegangenen Studien eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Chandrasekar und Freeman 1997; Fan et al. 2002). I- κ B wies eine erhöhte Expression bei TG der Zeitkontrolle im Vergleich zur TG I/R-Gruppe auf. Auch im Vergleich zur Zeitkontrolle mit 5-HT wies die Zeitkontrolle ohne 5-HT höhere I- κ B Werte auf. Die vorliegenden Ergebnisse weisen nicht auf eine gesteigerte Expression auf messenger-RNA-Level hin. Eine Bindungsaktivität ist jedoch trotzdem nicht auszuschließen, da sie auch ohne eine Expression auf messenger-RNA-Level vorliegen kann. Eine gesteigerte Expression auf messenger-RNA-Level in der TG-Kontrollgruppe könnte richtungsweisend für weiterführende Forschungen an der basalen Aktivität des 5-HT_{4a}-Rezeptors sein.

6. Klinische Bedeutung und Ausblick

Der 5-HT₄-Rezeptor ist wohl in einer Vielzahl pathologischer Prozesse im menschlichen Körper involviert, darunter das Reizdarmsyndrom, manisch-depressive Erkrankungen sowie Herz-Kreislaufkrankungen, wie Hypertonus und Herzinsuffizienz. Um weitere therapeutische Ansätze für diverse Krankheitsbilder entwickeln zu können, könnten weiterführende Forschungen an 5-HT₄-Rezeptoren aufschlussreiche Erkenntnisse liefern.

Im Rahmen dieser Arbeit sind einige Fragen offengeblieben bzw. aufgetreten, die weiterer Untersuchungen bedürfen. So könnte beispielweise die Zugabe von 5-HT bereits vor oder zu Beginn der Ischämie die Ausschüttung von 5-HT aus aktivierten Thrombozyten nachahmen wie es z.B. bei Vorhofflimmern oder Myokardinfarkt vorkommt.

Desweiteren wäre interessant, die Effekte einer ischämischen Präkonditionierung in diesem Modell zu untersuchen. Dabei könnte erarbeitet werden, ob die ischämische Präkonditionierung im Zusammenhang mit dem 5-HT₄-Rezeptor einen kardioprotektiven Effekt in Bezug auf I/R hat und ob es dadurch bei TG zu einer besseren Kompensation kommt.

Serotonin hat unter Ischämie und Reperfusion möglicherweise eine große Bedeutung.

7. Zusammenfassung

In dieser experimentellen Dissertation wurde die kardiale Funktion des menschlichen 5-HT_{4a}-Rezeptors mit Hilfe eines transgenen Tiermodells und der Versuchsanordnung des isoliert retrograd perfundierten Herzen mittels der von Langendorff beschriebenen Methode näher charakterisiert. Die Aktivität des 5-HT_{4a}-Rezeptors konnte sowohl unter basalen Bedingungen sowie unter der Perfusion mit verschiedenen Rezeptor-Agonisten und Antagonisten bestätigt werden. Die Auswirkungen eines simulierten Myokardinfarkts durch Ischämie und Reperfusion an Wildtyp-Herzen und transgenen 5-HT_{4a}-Rezeptor-überexprimierenden-Tieren wurden gegenübergestellt und verglichen. Die Versuche erfolgten an der Langendorff-Apparatur mittels konstantem Fluss. In weiterführenden Studien (Dissertation C. Röttger 2021) wurden die Versuchsreihen auf biochemischer Ebene untersucht.

Die Analyse der basalen Charakteristika zeigte bei den transgenen Tieren eine unveränderte Kontraktionskraft, wohingegen die Frequenz erhöht war. Die erste Ableitung der Zeit (maximale Kontraktionsgeschwindigkeit dF/dt_{max}) war bei transgenen Tieren erhöht und maximale Relaxationsgeschwindigkeit dF/dt_{min} war bei transgenen Tieren unter nicht stimulierten Bedingungen verkürzt. Serotonin bewirkte nur bei transgenen Tieren einen positiv inotropen und chronotropen Effekt, der antagonisiert werden kann und bei Wildtyp-Geschwistertieren ausblieb. Der β -Adrenozeptoragonist Isoprenalin löste sowohl bei Wildtyp-Geschwistertieren als auch bei transgenen Tieren Effekte aus. Bei der Ischämie und Reperfusion mittels Tyrode-Lösung sowie Tyrode-Lösung und zusätzlich Serotonin kam es zu einer schnelleren Erholung der Kraft bei transgenen Tieren als bei Wildtyp-Geschwistertieren. Mittels der angewandten Methoden konnte ein stärkerer Reperfusionsschaden des myokardialen Gewebes bei transgenen Tieren als Wildtyp-Geschwistertieren detektiert werden.

Da der 5-HT_{4a}-Rezeptor im Rahmen verschiedener kardiovaskulärer Krankheitsbilder in den Fokus gerät, ist dessen Untersuchung und die seiner Agonisten und Antagonisten, ein interessantes Ziel für weitere Entwicklung neuer Pharmaka zur Therapie der akuten und/ oder chronischen Herzinsuffizienz. Potentielle kardiale Wechselwirkungen von Medikamenten, welche 5-HT_{4a}-Rezeptoren auf unterschiedliche Art und Weise beeinflussen könnten wie z.B. Antidepressiva oder Gastroprokinetika, geben Anlass zur weiteren Erforschung. Ferner gibt es Ansätze mit 5-HT₄-Agonisten die Alzheimersche Erkrankung besser zu behandeln. Hier spielen kardiale 5-HT₄-Rezeptoren eher eine Rolle als Ursache von unerwünschten Wirkungen dieser Medikamente.

8. Literaturverzeichnis

- Adamo L, Rocha-Resende C, Prabhu SD, Mann DL (2020) Reappraising the role of inflammation in heart failure. *Nat Rev Cardiol* 17:269–285.
<https://doi.org/10.1038/s41569-019-0315-x>
- Bach T, Syversveen T, Kvingedal AM, et al (2001a) 5HT4(a) and 5-HT4(b) receptors have nearly identical pharmacology and are both expressed in human atrium and ventricle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 363:146–160
- Bach T, Syversveen T, Kvingedal AM, et al (2001b) 5HT4(a) and 5-HT4(b) receptors have nearly identical pharmacology and are both expressed in human atrium and ventricle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 363:146–160
- Baganz NL, Blakely RD (2013) A Dialogue between the Immune System and Brain, Spoken in the Language of Serotonin. *ACS Chem Neurosci* 4:48–63.
<https://doi.org/10.1021/cn300186b>
- Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM (2011) Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol* 50:940–950.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.02.018>
- Bellivier F, Leboyer M, Courtet P, et al (1998) Association between the tryptophan hydroxylase gene and manic-depressive illness. *Arch Gen Psychiatry* 55:33–37
- Bender E, Pindon A, van Oers I, et al (2000) Structure of the human serotonin 5-HT4 receptor gene and cloning of a novel 5-HT4 splice variant. *J Neurochem* 74:478–489
- Bers DM, Xiang YK, Zaccolo M (2019) Whole-Cell cAMP and PKA Activity are Epiphenomena, Nanodomain Signaling Matters. *Physiology* 34:240–249.
<https://doi.org/10.1152/physiol.00002.2019>
- Blondel O, Vandecasteele G, Gastineau M, et al (1997) Molecular and functional characterization of a 5-HT4 receptor cloned from human atrium. *FEBS Lett* 412:465–474
- Bockaert J, Claeysen S, Compan V, Dumuis A (2004) 5-HT4 receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 3:39–51
- Boknik P, Drzewiecki K, Eskandar J, et al (2018) Phenotyping of Mice with Heart Specific Overexpression of A2A-Adenosine Receptors: Evidence for Cardioprotective Effects of A2A-Adenosine Receptors. *Front Pharmacol* 9:13.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00013>
- Bonner TI (2014) Should pharmacologists care about alternative splicing? IUPHAR Review 4: Alternative splicing. *Br J Pharmacol* 171:1231–1240. <https://doi.org/10.1111/bph.12526>
- Bortolato M, Chen K, Shih JC (2010) The Degradation of Serotonin: Role of MAO. In: *Handbook of Behavioral Neuroscience*. Elsevier, pp 203–218
- Brattelid T, Kvingedal AM, Krobert KA, et al (2004a) Cloning, pharmacological characterisation and tissue distribution of a novel 5-HT4 receptor splice variant, 5-HT4(i). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369:616–628.
<https://doi.org/10.1007/s00210-004-0919-4>
- Brattelid T, Qvigstad E, Birkeland JAK, et al (2007) Serotonin responsiveness through 5-HT2A and 5-HT4 receptors is differentially regulated in hypertrophic and failing rat cardiac ventricle. *J Mol Cell Cardiol* 43:767–779. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2007.08.019>
- Brattelid T, Qvigstad E, Lynham JA, et al (2004b) 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.
<https://doi.org/10.1007/s00210-004-0963-0>
- Brattelid T, Qvigstad E, Lynham James A, et al (2004c) 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. <https://doi.org/10.1007/s00210-004-0963-0>
- Brattelid T, Qvigstad E, Moltzau LR, et al (2012) The Cardiac Ventricular 5-HT₄ Receptor Is Functional in Late Foetal Development and Is Reactivated in Heart Failure. *PLoS ONE* 7:e45489. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045489>
- Bugrova ML (2016) [ATRIAL AND BRAIN NATRIURETIC PEPTIDES OF CARDIAC MUSCLE CELLS IN POSTREPERFUSION PERIOD IN RATS]. *Tsitologiya* 58:129–134
- Chandrasekar B, Freeman GL (1997) Induction of nuclear factor κ B and activation protein 1 in postischemic myocardium. *FEBS Lett* 401:30–34. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(96\)01426-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(96)01426-3)
- Chandrasekar B, Streitman JE, Colston JT, Freeman GL (1998) Inhibition of nuclear factor κ B attenuates proinflammatory cytokine and inducible nitric-oxide synthase expression in postischemic myocardium. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis* 1406:91–106. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(97\)00062-8](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(97)00062-8)
- Chen M, Xu D, Wu AZ, et al (2018) Phospholamban regulates nuclear Ca²⁺ stores and inositol 1,4,5-trisphosphate mediated nuclear Ca²⁺ cycling in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 123:185–197. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.09.008>
- Cichon S, Kesper K, Propping P, Nöthen MM (1998) Assignment of the human serotonin 4 receptor gene (HTR4) to the long arm of chromosome 5 (5q31–q33). *Mol Membr Biol* 15:75–78. <https://doi.org/10.3109/09687689809027521>
- Côté F, Thévenot E, Fligny C, et al (2003) Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13525–13530. <https://doi.org/10.1073/pnas.2233056100>
- Dahlstroem A, Fuxe K (1964) EVIDENCE FOR THE EXISTENCE OF MONOAMINE-CONTAINING NEURONS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. I. DEMONSTRATION OF MONOAMINES IN THE CELL BODIES OF BRAIN STEM NEURONS. *Acta Physiol Scand Suppl SUPPL* 232:1-55
- De Maeyer JH, Straetemans R, Schuurkes JAJ, Lefebvre RA (2006) Porcine left atrial and sinoatrial 5-HT₄ receptor-induced responses: fading of the response and influence of development. *Br J Pharmacol* 147:140–157. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706497>
- Du C-K, Zhan D-Y, Akiyama T, et al (2017) Myocardial interstitial levels of serotonin and its major metabolite 5-hydroxyindole acetic acid during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 312:H60–H67. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00471.2016>
- Dumuis A, Bouhelal R, Sebben M, et al (1988) A nonclassical 5-hydroxytryptamine receptor positively coupled with adenylate cyclase in the central nervous system. *Mol Pharmacol* 34:880–887
- Duncker DJ, Schulz R, Ferrari R, et al (1998) “Myocardial stunning.” *Cardiovasc Res* 38:549–558. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(98\)00061-3](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(98)00061-3)
- Durham PL, Russo AF (2002) New insights into the molecular actions of serotonergic antimigraine drugs. *Pharmacol Ther* 94:77–92
- Ersparmer V (1940) Pharmakologische Studien über Enteramin: I. Mitteilung: Über die Wirkung von Acetonextrakten der Kaninchenmagenschleimhaut auf den Blutdruck und auf

- isolierte überlebende Organe. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Für Exp Pathol Pharmacol* 196:343–365. <https://doi.org/10.1007/BF01861121>
- Erspamer V, Asero B (1952) Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature* 169:800–801
- Fan H, Sun B, Gu Q, et al (2002) Oxygen radicals trigger activation of NF- κ B and AP-1 and upregulation of ICAM-1 in reperfused canine heart. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 282:H1778–H1786. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00796.2000>
- Gerald C, Adham N, Kao HT, et al (1995) The 5-HT₄ receptor: molecular cloning and pharmacological characterization of two splice variants. *EMBO J* 14:2806–2815
- Gergs U, Baumann M, Böckler A, et al (2010) Cardiac overexpression of the human 5-HT₄ receptor in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299:H788–798. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00691.2009>
- Gergs U, Böckler A, Ebelt H, et al (2013) Human 5-HT₄ receptor stimulation in atria of transgenic mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 386:357–367. <https://doi.org/10.1007/s00210-013-0831-x>
- Gergs U, Boknik P, Buchwalow I, et al (2004) Overexpression of the Catalytic Subunit of Protein Phosphatase 2A Impairs Cardiac Function. *J Biol Chem* 279:40827–40834. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405770200>
- Gergs U, Jung F, Buchwalow IB, et al (2017) Pharmacological and physiological assessment of serotonin formation and degradation in isolated preparations from mouse and human hearts. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 313:H1087–H1097. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00350.2017>
- Gergs U, Kirchhefer U, Bergmann F, et al (2020) Characterization of Stressed Transgenic Mice Overexpressing H₂-Histamine Receptors in the Heart. *J Pharmacol Exp Ther* 374:479–488. <https://doi.org/10.1124/jpet.120.000063>
- Gergs U, Neumann J, Simm A, et al (2009) Phosphorylation of phospholamban and troponin I through 5-HT₄ receptors in the isolated human atrium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 379:349–359. <https://doi.org/10.1007/s00210-008-0371-y>
- Gerits N, Kostenko S, Shiryaev A, et al (2008) Relations between the mitogen-activated protein kinase and the cAMP-dependent protein kinase pathways: Comradeship and hostility. *Cell Signal* 20:1592–1607. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.02.022>
- Gershon MD (1999) Review article: roles played by 5-hydroxytryptamine in the physiology of the bowel. *Aliment Pharmacol Ther* 13 Suppl 2:15–30
- Gershon MD, Tack J (2007) The Serotonin Signaling System: From Basic Understanding To Drug Development for Functional GI Disorders. *Gastroenterology* 132:397–414. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.11.002>
- Hara K, Hirowatari Y, Yoshika M, et al (2004) The ratio of plasma to whole-blood serotonin may be a novel marker of atherosclerotic cardiovascular disease. *J Lab Clin Med* 144:31–37. <https://doi.org/10.1016/j.lab.2004.03.014>
- Hausenloy DJ, Yellon DM (2013) Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest* 123:92–100. <https://doi.org/10.1172/JCI62874>
- Heusch G (2020) Myocardial ischaemia–reperfusion injury and cardioprotection in perspective. *Nat Rev Cardiol* 17:773–789. <https://doi.org/10.1038/s41569-020-0403-y>
- Hirowatari Y, Hara K, Kamihata H, et al (2004) High-performance liquid chromatographic method with column-switching and post-column reaction for determination of serotonin levels in platelet-poor plasma. *Clin Biochem* 37:191–197. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2003.11.009>

- Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, et al (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. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(01\)00746-8](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(01)00746-8)
- Hristov M, Weber C (2015) Myocardial Infarction and Inflammation: Lost in the Biomarker Labyrinth. *Circ Res* 116:781–783. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.305919>
- Jacobs BL, Azmitia EC (1992) Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 72:165–229. <https://doi.org/10.1152/physrev.1992.72.1.165>
- 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* 346:482–485
- Jennings RB, Schaper J, Hill ML, et al (1985) Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury. Changes in cell volume, electrolytes, metabolites, and ultrastructure. *Circ Res* 56:262–278. <https://doi.org/10.1161/01.RES.56.2.262>
- Kaumann A, Levy F (2006) 5-Hydroxytryptamine receptors in the human cardiovascular system. *Pharmacol Ther* 111:674–706. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.12.004>
- Kaumann AJ (1994) Do human atrial 5-HT₄ receptors mediate arrhythmias? *Trends Pharmacol Sci* 15:451–455
- Kaumann AJ (1993) Blockade of human atrial 5-HT₄ receptors by GR 113808. *Br J Pharmacol* 110:1172–1174
- Kaumann AJ, Lynham JA, Brown AM (1996) Comparison of the densities of 5-HT₄ receptors, beta 1- and beta 2-adrenoceptors in human atrium: functional implications. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 353:592–595
- Kaumann AJ, Sanders L (1994) 5-Hydroxytryptamine causes rate-dependent arrhythmias through 5-HT₄ receptors in human atrium: facilitation by chronic beta-adrenoceptor blockade. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 349:331–337
- Kaumann AJ, Sanders L, Brown AM, et al (1990) A 5-hydroxytryptamine receptor in human atrium. *Br J Pharmacol* 100:879–885
- Kaumann AJ, Sanders L, Brown AM, et al (1991) A 5-HT₄-like receptor in human right atrium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 344:150–159. <https://doi.org/10.1007/BF00167212>
- Keller N, Dhein S, Neumann J, Gergs U (2018) Cardiovascular effects of cisapride and prucalopride on human 5-HT₄ receptors in transgenic mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 391:975–985. <https://doi.org/10.1007/s00210-018-1519-z>
- Kim DY, Camilleri M (2000) Serotonin: a mediator of the brain-gut connection. *Am J Gastroenterol* 95:2698–2709. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2000.03177.x>
- Kjekshus JK, Torp-Pedersen C, Gullestad L, et al (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. <https://doi.org/10.1093/eurjhf/hfp087>
- Knight RJ, Buxton DB (1996) Stimulation of c-Jun Kinase and Mitogen-Activated Protein Kinase by Ischemia and Reperfusion in the Perfused Rat Heart. *Biochem Biophys Res Commun* 218:83–88. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0016>
- Krug A, De Rochemont WDM, Korb G (1966) Blood Supply of the Myocardium after

- Temporary Coronary Occlusion. *Circ Res* 19:57–62.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.19.1.57>
- Kukielka GL, Youker KA, Hawkins HK, et al (1994) Regulation of ICAM-1 and IL-6 in Myocardial Ischemia: Effect of Reperfusion a. *Ann N Y Acad Sci* 723:258–270.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb36732.x>
- Kultschitzky N (1897) Zur Frage über den Bau des Darmkanals. 47:7–35
- Läer S, Remmers F, Scholz H, et al (1998) Receptor mechanisms involved in the 5-HT-induced inotropic action in the rat isolated atrium. *Br J Pharmacol* 123:1182–1188.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701702>
- Langendorff O (1895) Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Pflüg Arch Für Gesamte Physiol Menschen Thiere* 61:291–332. <https://doi.org/10.1007/BF01812150>
- Lemessurier DH, Schwartz CJ, Whelan RF (1959) Cardiovascular effects of intravenous infusions of 5-hydroxytryptamine in man. *Br J Pharmacol Chemother* 14:246–250
- Levy FO, Qvigstad E, Krobert KA, et al (2008) Effects of serotonin in failing cardiac ventricle: Signalling mechanisms and potential therapeutic implications. *Neuropharmacology* 55:1066–1071. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.07.010>
- Liu M, Geddis MS, Wen Y, et al (2005) Expression and function of 5-HT4 receptors in the mouse enteric nervous system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289:G1148–1163. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00245.2005>
- Lucki I (1998) The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol Psychiatry* 44:151–162
- Mann JJ, Brent DA, Arango V (2001) The neurobiology and genetics of suicide and attempted suicide: a focus on the serotonergic system. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 24:467–477. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(00\)00228-1](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(00)00228-1)
- Mekontso-Dessap A, Brouri F, Pascal O, et al (2006) Deficiency of the 5-hydroxytryptamine transporter gene leads to cardiac fibrosis and valvulopathy in mice. *Circulation* 113:81–89. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.554667>
- Minamino T, Kitakaze M, Asanuma H, et al (1999) Plasma adenosine levels and platelet activation in patients with atrial fibrillation. *Am J Cardiol* 83:194–198.
[https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(98\)00823-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(98)00823-6)
- Mißlinger N (2019) Charakterisierung isoliert perfundierter Herzen von Histamin-H2-Rezeptor überexprimierenden Mäusen. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Mizukami Y, Yoshida K (1997) Mitogen-activated protein kinase translocates to the nucleus during ischaemia and is activated during reperfusion. *Biochem J* 323:785–790.
<https://doi.org/10.1042/bj3230785>
- Murphy E, Steenbergen C (2008) Mechanisms Underlying Acute Protection From Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury. *Physiol Rev* 88:581–609.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2007>
- Neri M, Riezzo I, Pascale N, et al (2017) Ischemia/Reperfusion Injury following Acute Myocardial Infarction: A Critical Issue for Clinicians and Forensic Pathologists. *Mediators Inflamm* 2017:1–14. <https://doi.org/10.1155/2017/7018393>
- Neumann J, Hofmann B, Gergs U (2017) Production and Function of Serotonin in Cardiac Cells. In: Shad KF (ed) *Serotonin - A Chemical Messenger Between All Types of Living Cells*. InTech
- Nichols DE, Nichols CD (2008) Serotonin Receptors. *Chem Rev* 108:1614–1641.
<https://doi.org/10.1021/cr078224o>
- Nigmatullina RR, Kirillova VV, Jourjikiya RK, et al (2009) Disrupted Serotonergic and

- Sympathoadrenal Systems in Patients with Chronic Heart Failure May Serve as New Therapeutic Targets and Novel Biomarkers to Assess Severity, Progression and Response to Treatment. *Cardiology* 113:277–286. <https://doi.org/10.1159/000205962>
- Palego L, Betti L, Rossi A, Giannaccini G (2016) Tryptophan Biochemistry: Structural, Nutritional, Metabolic, and Medical Aspects in Humans. *J Amino Acids* 2016:1–13. <https://doi.org/10.1155/2016/8952520>
- Pönicke K, Gergs U, Buchwalow IB, et al (2012) On the presence of serotonin in mammalian cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem* 365:301–312. <https://doi.org/10.1007/s11010-012-1270-6>
- Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, et al (2016) 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* 37:2129–2200. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw128>
- Qvigstad E, Brattelid T, Sjaastad I, et al (2005) Appearance of a ventricular 5-HT receptor-mediated inotropic response to serotonin in heart failure. *Cardiovasc Res* 65:869–878. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.11.017>
- Rahimtoola SH (1989) The hibernating myocardium. *Am Heart J* 117:211–221. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(89\)90685-6](https://doi.org/10.1016/0002-8703(89)90685-6)
- Rapport MM, Green AA, Page IH (1948) Crystalline Serotonin. *Science* 108:329–330. <https://doi.org/10.1126/science.108.2804.329>
- Rodríguez MJ, Saura J, Billett EE, et al (2001) Cellular localization of monoamine oxidase A and B in human tissues outside of the central nervous system. *Cell Tissue Res* 304:215–220
- Röttger C, Gergs U, Schmidbaur CT, Neumann J (2019) Altered signaling and gene expression after ischemia/reperfusion in 5-HT₄ receptor overexpressing mouse hearts. 392 (Suppl 1): S42
- Ruddick JP, Evans AK, Nutt DJ, et al (2006) Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications. *Expert Rev Mol Med* 8:1–27. <https://doi.org/10.1017/S1462399406000068>
- Sakowski SA, Geddes TJ, Thomas DM, et al (2006) Differential tissue distribution of tryptophan hydroxylase isoforms 1 and 2 as revealed with monospecific antibodies. *Brain Res* 1085:11–18. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.02.047>
- Selim AM, Sarswat N, Kelesidis I, et al (2017) Plasma Serotonin in Heart Failure: Possible Marker and Potential Treatment Target. *Heart Lung Circ* 26:442–449. <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2016.08.003>
- Shimizu Y, Minatoguchi S, Hashimoto K, et al (2002) The role of serotonin in ischemic cellular damage and the infarct size-reducing effect of sarpgrelate, a 5-hydroxytryptamine-2 receptor blocker, in rabbit hearts. *J Am Coll Cardiol* 40:1347–1355. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(02\)02158-7](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(02)02158-7)
- Sole MJ, Shum A, Van Loon GR (1979) Serotonin metabolism in the normal and failing hamster heart. *Circ Res* 45:629–634
- Sutherland FJ, Hearse DJ (2000) THE ISOLATED BLOOD AND PERFUSION FLUID PERFUSED HEART. *Pharmacol Res* 41:613–627. <https://doi.org/10.1006/phrs.1999.0653>
- van den Berg EK, Schmitz JM, Benedict CR, et al (1989) Transcardiac serotonin concentration is increased in selected patients with limiting angina and complex coronary lesion

- morphology. *Circulation* 79:116–124. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.79.1.116>
- Vikenes K, Farstad M, Nordrehaug JE (1999) Serotonin Is Associated with Coronary Artery Disease and Cardiac Events. *Circulation* 100:483–489. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.100.5.483>
- Weiss O (1896) Ueber die Wirkung von Blutserum-Injectionen ins Blut. *Pflüg Arch* 65:215–230
- Wollenberger A (1960) Eine einfache Technik der extrem schnellen Abkühlung größerer Gewebestücke. *Pflüg Arch* 270:399–412
- Zipes DP, Libby P, Bonow RO, et al (eds) (2019) Braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular medicine, Eleventh edition, international edition. Elsevier, Philadelphia, PA

9. Thesen

1. Mittels einer α -MHC-Kassette kann ein transgenes Mausmodell zur herzspezifischen Überexpression des 5-HT_{4a}-Rezeptors generiert werden und mittels Genotypisierung bewiesen werden.
2. Die *in vitro* retrograde Perfusion isolierter Mäuseherzen nach Langendorff erlaubt die Beurteilung der Herzfunktion ohne Einfluss humoraler und neuronaler Einflüsse.
3. Unter basalen Bedingungen weisen transgene Tiere im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistertieren eine erhöhte Herzfrequenz auf.
4. Die dF/dt_{\max} ist bei transgenen Tieren im Vergleich zu ihren WT-Geschwistertieren unter basalen Bedingungen verkürzt und dF/dt_{\min} verlängert.
5. 1 μ M Serotonin wirkt an isolierten Herzen von transgenen Mäusen positiv inotrop und chronotrop.
6. 1 μ M Serotonin zeigt keine inotrope oder chronotrope Wirkung an den isolierten Herzen der Wildtyp-Geschwistertieren
7. 1 μ M des β -Adrenozeptoragonisten Isoprenalin bewirkt sowohl bei TG als auch WT eine Steigerung der Kontraktionskraft und Herzfrequenz.
8. Der 5-HT_{4a}-Rezeptor ist über eine G_s-PCR-vermittelte Signalkaskade in TG funktionell aktiv.
9. Eine Ischämiedauer von 15 Minuten führt nicht zu einer messbaren Veränderung der Herzfunktion.
10. Die Zugabe von Serotonin bewirkt in transgenen Mäusen, jedoch nicht in Wildtyp-Geschwistertieren, die Phosphorylierung von Phospholamban

10. Anhang

Puffer und Lösungen

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

Langendorff-Versuche

Tyrode-Lösung:

Stamm-Lösung Nummer 1:

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

Stamm-Lösung Nummer 2:

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

Stamm-Lösung Nummer 3:

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-EDTA	0,05 mM

pH 7,4

Anästhesie:

Stammlösung: Pentobarbital 0,5g/10ml physiologische Kochsalzlösung
Heparin 1000 IE intraperitoneal

Molekularbiologische Versuche

Genotypisierung der Versuchstiere

Protokoll:

Lösung 1:

1 M NaOH	250 µl
10 mM EDTA pH 8.0	100 µl
ddH ₂ O	10 ml

250 µl je Probe, über 12 Stunden bei 55°C schüttelnde Inkubation

Lösung 2:

Tris-HCl	0,23g/50 ml
----------	-------------

250 µl je Probe zur Neutralisation

PCR-Mastermix: (Mengenangabe je PCR-Reaktion)

dd H ₂ O	8 µl
2-Fach Super Master Mix (Biotool)	10 µl
Reverse Primer hH2R-SEQ-P1R (5'-AGCAGGTCAGTGATAGCCAA-3')	0,5 µl
Forward Primer MHC-SEQ-P1 (5'-ACCCTTACCCACATAGACC-3')	0,5 µl
DNA	1 µl

2-Fach Super Master Mix (Biotool) Komponenten

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

100 U/ml Taq DNA polymerase, 0,5 mM dNTPs, 4 mM MgCl₂, Stabilisatoren, Farbstoff

Agarosegel

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

50x TAE-Puffer

Tris Base	1,99 M
Eisessig	0,99 M
EDTA	59,5 mM

GeneRuler

100 bp DNA Ladder

PCR-Programm

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

Substanzen

Agarose, Typ SeaKem	FMC bioproducts, Philadelphia, USA
Ammoniumpersulfat 10% (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
L (+) - Ascorbinsäure	Merck, Darmstadt
Bovine Serum Albumine	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
CuSO ₄	Merck, Darmstadt
DNA-Ladder GeneRuler™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
dNTP MBI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ECF dilution buffer	GE Healthcare, Berlin
ECF Substrat	GE Healthcare, Berlin
Eisessig	Merck, Darmstadt
Essigsäure 100 %	Merck, Darmstadt
Ethanol 100 % C.	Roth GmbH, Karlsruhe
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	Merck, Darmstadt
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerol	Roth, Karlsruhe
HCl	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Heparin	Biochrom AG, Berlin
Isoprenalin	Sigma-Aldrich, Steinheim
KCl	Roth, Karlsruhe
K ⁺ -Na ⁺ -Tartrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magermilchpulver	TSI GmbH, Zeven
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Merck, Darmstadt
Na ₂ -EDTA	C. Roth GmbH, Karlsruhe
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Pentobarbital	Spofa, Prag, Tschechien
Polyacrylamid	Roth, Karlsruhe
Ponceau S-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
RedSafe™-Farbstoff	iNTRON, Seongnam, South Korea
Super-PCR-Mastermix	Biotoool GmbH, Oberasbach

N,N,N',N'-Tetramethyl- ethylendiamin	Serva, Heidelberg
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Triethanolamin	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Tween 20	Merck, Darmstadt

Geräte, Zubehör und Software

AlphaDigiDoc RT 312nm/254nm	Sigma-Aldrich, Steinheim
Biophotometer	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Elektrophorese-Einheit SE 600	Hoefler, San Francisco, USA
Elektrophoresekammer Typ Horizon 58	Life Technologies, Gaithersburg, USA
Filtersystem	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Peristaltik-Pumpanlage	Ismatec, Cole-Parmer GmbH, Wertheim
Flussmessgerät	Transonic Systems Inc., Ithaca, USA
Glasware	Schott AG, Mainz
Gefäße 1 ml, 2 ml	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Heizgerät Lauda Alpha	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen
Langendorff Datenerfassung PowerLab	ADInstruments, Sydney, Australien
Microsoft Excel	Microsoft, Redmont, USA
Mikrodismembrator S	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Mikroskop	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Mastercycler gradient	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
pH-Meter	WTW GmbH, STH 600, Weilheim
Präparationsbesteck Aesculap	B.Braun AG, Melsungen
Prism 5	GraphPad Software, San Diego, USA
Rütteltisch: Kreisrüttler 3015	GFL GmbH, Hannover
Spritzanlage Injekt®, Injektionsbesteck	B.Braun AG, Melsungen
Stromstärkegeber Standard Powerpack p25	Biometra GmbH, Göttingen
ThermoMixer® F	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Transfer-Einheit TE 62	Hoefler, San Francisco, USA
Typhoon 9410 Variable Mode Imager	Amersham Biosciences, Freiburg
UV-Betrachter	PEQLAB GmbH, Erlangen
Vortex Shaker Eppendorf Mixer 5432	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Waage Typ AT261 DeltaRange	Mettler Instruments GmbH, Gießen
Waage Typ XS205 Teldeo Dualrange	Mettler Instruments GmbH, Gießen
Zentrifuge Modell 5415 C	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

11. Selbstständigkeitserklärung

(1) Ich, Constanze Schmidbaur, erkläre, daß ich an keiner anderen Hochschule ein Promotionsverfahren 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.

12. Publikationen

Schmidbaur CT, Mißlinger N, Gergs U, Neumann J (2019) Ischemia and reperfusion in the mouse heart overexpressing the 5-HT₄ receptor. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 39 (Suppl1): S41

Röttger C, Gergs U, Schmidbaur CT, Neumann J (2019) Altered signaling and gene expression after ischemia/reperfusion in 5-HT₄ receptor overexpressing mouse hearts. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 392 (Suppl 1): S42

Gergs U, Gerigk T, Wittschier J, Schmidbaur CT, Röttger C, Mahnkopf M, Edler H, Wache H, Neumann J (2021) Influence of serotonin 5-HT₄ receptors on cardiac stress in transgenic mouse models. (in Revision)