

Charakterisierung der kardialen Effekte neuer Histamin H₂-Rezeptor-Agonisten in transgenen Mäusen und menschlichen Vorhöfen

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

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

von Maren Luise Büxel

Betreuer: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Joachim Neumann

Gutachter: Prof. Dr. Detlef Neumann, Hannover
Prof. Dr. Wolfram-Hubertus Zimmermann, Göttingen

Datum der Verteidigung: 10.04.2025

Referat

Zur Erforschung der Funktion von Histamin H₂-Rezeptoren im zentralen Nervensystem und deren mögliche fördernde Wirkung auf das Gedächtnis wurden kürzlich neue Histamin H₂-Rezeptor-Agonisten entwickelt. Weil der humane Histamin H₂-Rezeptor jedoch auch am Herzen exprimiert wird, ist es von Interesse, die kardiale Wirkung dieser Substanzen zu charakterisieren. In dieser Arbeit werden daher drei neue Histamin H₂-Rezeptor-Agonisten – UR-Po563, UR-MB-158 und UR-MB-159 – auf ihre kardialen Effekte hin untersucht.

Dazu wurden Versuche in vivo mittels Echokardiografie und in vitro an elektrisch stimulierten linken und spontan schlagenden rechten Vorhöfen sowie an isolierten retrograd perfundierten Herzen nach Langendorff von H₂-Rezeptor-überexprimierenden Mäusen (H₂-TG) im Vergleich zu Wildtyp Mäusen (WT) durchgeführt. Auch die Wirkung an elektrisch stimulierten menschlichen Vorhofpräparaten wurde untersucht. In Western Blot-Analysen der Mauspräparate wurde zudem der Phosphorylierungszustand von Phospholamban überprüft, welches in Folge der Aktivierung des Histamin H₂-Rezeptors phosphoryliert wird.

UR-Po563, UR-MB-158 und UR-MB-159 steigerten die Kontraktionskraft der isolierten linken Vorhöfe von H₂-TG mit pEC₅₀-Werten von 8,27; 9,86 und 8,21, jedoch nicht von WT. An den isolierten spontan schlagenden rechten Vorhöfen von H₂-TG steigerten die drei Substanzen die Schlagfrequenz mit pEC₅₀-Werten von 8,69; 9,24 und 8,07. Diese positiv inotropen und chronotropen Effekte der drei Substanzen konnten durch den Histamin H₂-Rezeptor-Antagonisten Famotidin gehemmt werden. An isolierten retrograd perfundierten Herzen wirkte UR-Po563 positiv inotrop und chronotrop. In vivo bewirkten alle drei Substanzen echokardiografisch eine Steigerung der Ejektionsfraktion und der Schlagfrequenz. UR-Po563 führte an menschlichen Vorhofpräparaten zu einem positiv inotropen Effekt mit einem pEC₅₀-Wert von 5,68. Außerdem steigerte UR-Po563 die Phosphorylierung von Phospholamban an Serin-16 und Threonin-17 in den linken und rechten Vorhöfen sowie dem Ventrikel von H₂-TG, nicht aber von WT.

Zusammenfassend handelt es sich bei UR-Po563, UR-MB-158 und UR-MB-159 um drei neue Substanzen, welche über den Histamin H₂-Rezeptor kardiostimulierend wirken. Im Falle eines Nutzens bei zentralnervösen Erkrankungen wie zum Beispiel Morbus Alzheimer könnte eine Hemmung der kardialen Wirkungen durch einen nicht-ZNS-gängigen H₂-Rezeptor-Antagonisten nötig sein.

Büxel, Maren Luise: Charakterisierung der kardialen Effekte neuer Histamin H₂-Rezeptor-Agonisten in transgenen Mäusen und menschlichen Vorhöfen, Halle (Saale), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Med. Fak., Diss., 77 Seiten, 2024

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	III
Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole	IV
1. Einleitung	1
1.1. Histamin und seine Rezeptoren	1
1.2. Histamin im kardiovaskulären System	2
1.3. Der Histamin H ₂ -Rezeptor.....	6
1.4. Neue H ₂ -Rezeptor-Agonisten.....	9
2. Zielsetzung.....	11
3. Material und Methoden	12
3.1. Versuchstiere	12
3.2. Genotypisierung.....	12
3.3. Kontraktionsversuche	14
3.3.1. Das Organbad.....	14
3.3.2. Die Messanlage	15
3.3.3. Organentnahme der Mausherzen	16
3.3.4. Präparation der Mausvorhöfe	17
3.3.5. Versuchsdurchführung.....	17
3.3.6. Menschliche Vorhofpräparate	19
3.4. Langendorff-Herzen	19
3.5. Echokardiografie	20
3.6. Western Blot-Analysen	21
3.7. Datenanalyse	23
4. Ergebnisse	24
4.1. Genotypisierung.....	24
4.2. Kontraktionsversuche	24
4.2.1. Histamin	24
4.2.2. UR-Po563 bei Maus und Mensch	26

4.2.3. UR-MB-158	31
4.2.4. UR-MB-159	34
4.2.5. Famotidin	37
4.2.6. Vergleich der Histamin H ₂ -Rezeptor-Agonisten	39
4.2.7. Histamin in Anwesenheit von Isoprenalin	42
4.3. Langendorff-Herzen	45
4.4. Echokardiografie	46
4.5. Western Blot-Analysen	48
5. Diskussion.....	52
5.1. Diskussion der Methoden	52
5.1.1. Tiermodell	52
5.1.2. Kontraktionsversuche	52
5.1.3. Langendorff-Methode und Echokardiografie.....	53
5.1.4. Western Blot-Analysen	53
5.2. Diskussion der Ergebnisse	53
5.2.1. Wirkung von Histamin	53
5.2.2. Wirkung von UR-Po563	54
5.2.3. Wirkung von UR-MB-158	56
5.2.4. Wirkung von UR-MB-159	57
5.2.5. Vergleich der Histamin H ₂ -Rezeptor-Agonisten	59
5.2.6. Wirkung von Famotidin	59
5.2.7. Wirkung von Histamin in Anwesenheit von Isoprenalin	61
5.3. Klinischer Ausblick	62
6. Zusammenfassung	66
7. Literaturverzeichnis	68
8. Thesen	77
Anhang.....	VII
Erklärungen.....	XIV
Publikationen	XV
Danksagung.....	XVI

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Signaltransduktion des H ₂ -Rezeptors.....	8
Abb. 2: Strukturformeln	10
Abb. 3: Transgenes Konstrukt des H ₂ -Rezeptors und Genotypisierung	14
Abb. 4: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung	16
Abb. 5: Versuchsprotokolle.....	19
Abb. 6: Wirkung von Histamin auf isolierte rechte und linke Vorhöfe	26
Abb. 7: Wirkung von UR-Po563 auf isolierte linke und rechte Vorhöfe	29
Abb. 8: Wirkung von UR-Po563 auf Präparate menschlicher Vorhöfe	31
Abb. 9: Wirkung von UR-MB-158 auf isolierte rechte und linke Vorhöfe	34
Abb. 10: Wirkung von UR-MB-159 auf isolierte rechte und linke Vorhöfe	37
Abb. 11: Wirkung von 10 µM Famotidin auf isolierte linke und rechte Vorhöfe	39
Abb. 12: Wirkung von Histamin in Anwesenheit von Isoprenalin auf isolierte linke und rechte Vorhöfe	45
Abb. 13: Echokardiografie.....	48
Abb. 14: Wirkung von 1 µM UR-Po563 auf die Serin-16-Phosphorylierung von Phospholamban in den Vorhöfen.....	49
Abb. 15: Wirkung von 1 µM UR-Po563 auf die Threonin-17-Phosphorylierung von Phospholamban in den Vorhöfen.....	50
Abb. 16: Wirkung von 1 µM UR-Po563 auf die Serin-16- und Threonin-17-Phosphorylierung von Phospholamban im Ventrikel	51

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Vergleich der Potenz verschiedener H ₂ -Rezeptor-Agonisten am Herzen.	40
Tab. 2: Wirkung von 1 µM UR-Po563 auf isoliert perfundierte Langendorff-Herzen	46
Tab. 3: Wirkungen von UR-Po563, UR-MB-158 und UR-MB-159 in der Echokardiografie	47

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
A	Ampere
AC	Adenylatcyclase
Ah	Amperestunden
AK	Antikörper
α -MHC	<i>α-Myosin heavy chain</i> = α -Isoform der schweren Kette des Myosins
AP	alkalische Phosphatase
bp	Basenpaare
bpm	<i>beats per minute</i> = Schläge pro Minute
BSA	bovines Serumalbumin (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium ²⁺ -Ionen
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaMKII	Calcium-/Calmodulin-abhängige Kinase Typ II
cAMP	cyclisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary DNA</i> = komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CSQ	Calsequestrin
Ctr	Kontrolle
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAG	Diacylglycerin
DAO	Diaminoxidase
dF/dT	Kraftänderung/Zeiteinheit (Kontraktions-/Relaxationsgeschwindigkeit)
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> = Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
ECF	<i>enhanced chemofluorescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat, Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
et al.	<i>et alii/aliae/alii</i> = und andere
Fam	Famotidin
g	Gramm
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein

G _s	stimulatorisches G-Protein
G _i	inhibitorisches G-Protein
HCN	<i>hyperpolarisation-activated cyclic nucleotid-gated cation channel</i> = „Schrittmacherkanal“ des Sinusknotens
H ₂ O	Wasser
H ₂ -R	Histamin H ₂ -Rezeptor
H ₂ -TG	transgene Mäuse, die den H ₂ -R herzspezifisch überexprimieren
Hz	Hertz
IE	Internationale Einheit
IgG	Immunglobulin G
IP ₃	Inositoltriphosphat
Iso	Isoprenalin
kb	Kilobase
kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
KWK	Konzentrations-Wirkungs-Kurve
l	Liter
log	Logarithmus zur Basis 10
LTCC	spannungsabhängiger L-Typ-Calciumkanal
M	Molar (mol/Liter)
mA	Milliampere
MAO-B	Isoform der Monoaminoxidase
min	Minute
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
mHz	Millihertz
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µM	Mikromolar
mM	Millimolar (Millimol/Liter)
mm	Millimeter
mN	Millinewton
mRNA	<i>messenger RNA</i> = Boten-RNA
ms	Millisekunden
n	Stichprobenumfang
Na ⁺	Natrium ⁺ -Ionen
NCX	Natrium ⁺ -Calcium ²⁺ -Austauscher

nm	Nanometer
nM	Nanomolar (Nanomol/Liter)
O ₂	Sauerstoff
P	Phosphat-Ionen
pEC ₅₀	negativer dekadischer Logarithmus des EC ₅₀ -Wertes (-log(EC ₅₀)), Maß für die Potenz eines Pharmakons
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> = Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A, cAMP-abhängige Proteinkinasen
pK _i	negativer dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstante, Maß für die Rezeptoraffinität
PLB	Phospholamban
PP1	Proteinphosphatase 1
RNA	<i>ribonucleic acid</i> = Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i> = Umdrehungen pro Minute
RyR	Ryanodin-Rezeptor
s	Sekunde
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> = Natriumlaurylsulfat
SDS-Page	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> = Natriumlaurylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Ser-16	Serin, als 16te Aminosäure von Phospholamban
SERCA	Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
t ₁ /t ₂	Kontraktions-/Relaxationszeit
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i> = Trisgepufferte Kochsalz- lösung mit Tween20
TG	siehe H ₂ -TG
Thr-17	Threonin, als 17te Aminosäure von Phospholamban
TnC	Troponin C
TnI	Troponin I (inhibitorisch)
UV-Licht	Ultraviolettstrahlung
u.v.m.	und vieles mehr
vs.	<i>versus</i> = im Gegensatz/im Vergleich zu
WT	Wildtyp-Mäuse
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Histamin und seine Rezeptoren

Histamin (2-(1H-Imidazol-4-yl)-ethanamin) ist ein biogenes Amin und physiologischer Bestandteil des Körpers (Übersicht: Panula et al., 2015; Neumann et al., 2023). Es ist in hohen Konzentrationen in der Haut, dem Bindegewebe, der Lunge und dem Gastrointestinaltrakt vorhanden. Daneben ist Histamin in allen Gewebearten zu finden (zwischen 1-100 µg/g) (Parsons und Ganellin, 2006) – daher auch der Name, der sich vom griechischen Wort *histos* (Gewebe) ableitet (Jutel et al., 2009). Histamin dient als Neurotransmitter und lokaler Mediator (Panula et al., 2015) und ist dadurch in viele physiologische Prozesse involviert. So ist es an der Regulation von Zellproliferation und -differenzierung, der Wundheilung, Hämatopoese und Embryonalentwicklung beteiligt (Jutel et al., 2009). Eine entscheidende Rolle spielt es in der Magensäuresekretion, bei allergischen Reaktionen und bei immunvermittelten Entzündungen (Parsons und Ganellin, 2006). Auf Grund seiner regulatorischen Funktion im Immunsystem wird auch eine Beteiligung von Histamin an Autoimmunerkrankungen diskutiert (Nielsen und Hammer, 1992). Außerdem wirken histaminerge Neurone an vielfältigen physiologischen Prozessen im zentralen Nervensystem mit, wie zum Beispiel der Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus, der Thermoregulation, der Schmerzwahrnehmung, dem Ernährungsrhythmus und Gedächtnisprozessen (Haas et al., 2008). Auch pathophysiologisch wird im ZNS eine Beteiligung von Histamin bei Schizophrenie, Epilepsie, der Alzheimer-Erkrankung u.v.m. vermutet (Haas et al., 2008).

Nachdem Histamin 1907 erstmals synthetisch hergestellt wurde (Windaus und Vogt, 1907) wurde 1910 auf Grund der Histaminbildung durch Bakterien vermutet, dass es auch in vivo gebildet werden könnte (Ackermann, 1910). Sir Henry Dale war 1910 der Erste, der die stimulierende Wirkung von Histamin auf die glatte Muskulatur bei verschiedenen Spezies beschrieb (Dale und Laidlaw, 1910). Auch die Ähnlichkeit der Wirkung zu lokalen Entzündungen und zur anaphylaktischen Reaktion wurde kurze Zeit später von ihm beschrieben (Dale und Laidlaw, 1919). Den endgültigen Nachweis des physiologischen Vorkommens von Histamin im Körper durch Isolation aus Leber- und Lungengewebe wurde 1927 durch Best et al. erbracht (Best et al., 1927).

Histamin wird in vivo durch die L-Histidin-Decarboxylase aus Histidin synthetisiert (Ohtsu et al., 2001). Viele Zellen sind in der Lage Histamin zu produzieren, typischerweise findet die Synthese aber in Mastzellen, basophilen Granulozyten, enterochromaffinen Zellen des Magens und histaminergen Neuronen statt (Jutel et al., 2009). Auf

die Aktivität der L-Histidin-Decarboxylase und somit die Histaminsynthese können viele Faktoren Einfluss nehmen (Jutel et al., 2009). So konnte zum Beispiel auch bei Endotoxämie (Matsuda et al., 2002) und Transplantatabstoßungen eine Steigerung beobachtet werden (Dy et al., 1981).

Mit der Nahrung aufgenommenes Histamin wird durch die Diaminoxidase (DAO) in der intestinalen Schleimhaut inaktiviert (Biegański et al., 1983). Bei insuffizienter DAO-Aktivität oder Verzehr von großen Mengen histaminhaltiger Nahrungsmittel (Rotwein, Käse, Sauerkraut u.v.m.) kann es zu konzentrationsabhängigen Histaminintoleranzsymptomen wie Kopfschmerzen, Tachykardie, Flush u.v.m. kommen (Maintz et al., 2006). Der Abbau von Histamin durch DAO zu Imidazolessigsäure ist auch in anderen peripheren Geweben der Hauptabbauweg von Histamin (Haas et al., 2008). Im zentralen Nervensystem hingegen wird Histamin durch die Histamin-N-Methyltransferase methyliert und im Anschluss durch die Monoaminoxidase-B (MAO-B) zu Methylimidazolessigsäure metabolisiert (Haas et al., 2008).

Derzeit sind vier Histamin Rezeptor Subtypen bekannt – H₁, H₂, H₃ und H₄. Bei allen vier Subtypen handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Die Affinität von Histamin für die Rezeptoren unterscheidet sich zwischen den Subtypen und ist für H₃ und H₄ höher als für H₁ und H₂ (Seifert et al., 2013). Neben der Bindung an die bekannten Rezeptoren konnte an Leberzellen der Ratte gezeigt werden, dass Histamin intrazellulär Komplexe mit Cytochrom P450 bildet, wodurch es möglicherweise Einfluss auf Zellfunktionen und -proliferation nehmen könnte (Brandes et al., 2002).

1.2. Histamin im kardiovaskulären System

Schon früh wurde beschrieben, dass Histamin auch Effekte im kardiovaskulären System hervorruft und sich diese zwischen den Säugetierarten unterscheiden (Dale und Laidlaw, 1910). Am Herzen wirkt es spezieübergreifend positiv chronotrop (Erhöhung der Sinusrate), positiv inotrop (Erhöhung der Kontraktionskraft) und negativ dromotrop (Verringerung der atrioventrikulären Überleitungsgeschwindigkeit) (Hattori et al., 2017). Die Wirkungen von Histamin am Herzen ähneln damit in Bezug auf Chronotropie und Inotropie denen des adrenergen Systems (Bristow et al., 1982a). Heute ist bekannt, dass diese Effekte vor allem durch Histamin H₁- und H₂-Rezeptoren an Kardiomyozyten vermittelt werden (Parsons und Ganellin, 2006).

Die Verteilung der Rezeptor-Subtypen unterscheidet sich jedoch stark zwischen verschiedenen Spezies: Während beim Meerschweinchen im Vorhofmyokard eine höhere Expression der mRNA und des Rezeptorproteins des Histamin H₁-Rezeptors gezeigt

werden konnte, wurde im Ventrikelmyokard der Histamin H₂-Rezeptor mehr exprimiert (Matsuda et al., 2004). Beim Kaninchen war die Verteilung genau umgekehrt. Hier war im Vorhof die Expression des Histamin H₂-Rezeptors höher und im Ventrikel die des Histamin H₁-Rezeptors (Matsuda et al., 2004). Dies widerspricht den Ergebnissen aus Radioliganden-Bindungsstudien am Ventrikelmyokard von Meerschweinchen und Kaninchen, die eine höhere Dichte von Histamin H₁-Rezeptoren beim Meerschweinchen und von Histamin H₂-Rezeptoren beim Kaninchen zeigten (Hattori et al., 1994). Funktionelle Ergebnisse aus pharmakologischen Studien wiederum bestätigen die Vermittlung des positiv inotropen Effektes von Histamin bei Meerschweinchen im Vorhof über Histamin H₁-Rezeptoren (Steinberg und Holland, 1975) und im Ventrikel über Histamin H₂-Rezeptoren (Hattori et al., 1994) sowie beim Kaninchen im Vorhof über Histamin H₂-Rezeptoren und im Ventrikel über Histamin H₁-Rezeptoren (Hattori et al., 1988), was mit der Expression der Rezeptor-mRNA und -proteine nach Matsuda et al. übereinstimmt.

Beim Menschen dominiert hingegen die Expression von Histamin H₂-Rezeptoren sowohl im Vorhof als auch im Ventrikel (Matsuda et al., 2004). Entsprechend der Expression konnte auch vielfach gezeigt werden, dass der positiv inotrope Effekt von Histamin am menschlichen Vorhof und Ventrikel klar an den Histamin H₂-Rezeptor gekoppelt ist (Ginsburg et al., 1980; Bristow et al., 1982b; Eckel et al., 1982). Zudem scheint eine Modifizierbarkeit des von Histamin ausgelösten positiv inotropen Effektes des Histamin H₂-Rezeptors durch Temperaturänderungen wahrscheinlich (Hoffmann et al., 2023). Der Histamin H₁-Rezeptor scheint eher eine untergeordnete Rolle am menschlichen Herz zu spielen. Einige fanden jedoch einen negativ inotropen Effekt an isolierten menschlichen Präparaten des rechten Vorhofes, der durch den Histamin H₁-Rezeptor vermittelt wurde (Guo et al., 1984). Durch Histamin H₂-Rezeptor-Antagonisten konnte der H₁-vermittelte Effekt demaskiert werden und durch Histamin H₁-Rezeptor-Antagonisten eine Verstärkung und Potenzierung des H₂-vermittelten positiv inotropen Effektes erreicht werden (Guo et al., 1984). Somit könnten Histamin H₁- und H₂-Rezeptoren am menschlichen Herz entgegengesetzte Wirkungen auf die Inotropie vermitteln. Andere fanden hingegen ausschließlich positiv inotrope Effekte durch den Histamin H₁-Rezeptor, jedoch nur an isolierten Präparaten des menschlichen Vorhofs von Patienten die monatelang mit β -Adrenozeptor Blockern vorbehandelt worden waren (Sanders et al., 1996). Aktuelle Daten fanden bei transgenen Mäusen einen vorübergehenden negativ inotropen Effekt durch den Histamin H₁-Rezeptor, welcher dann in einen positiv inotropen Effekt umschlug (Rayo Abella et al., 2024).

Die positiv chronotrope Wirkung von Histamin wird offenbar speziesübergreifend über Histamin H₂-Rezeptoren vermittelt. Dies konnte zumindest an menschlichen Vorhofpräparaten (Levi et al., 1981), beim Kaninchen (Hattori et al., 1988) und in Versuchen an isolierten Herzen sowie in vivo beim Meerschweinchen gezeigt werden (Levi et al., 1975). Des Weiteren konnte die Arbeitsgruppe um Levi den negativ dromotropen Effekt von Histamin dem Histamin H₁-Rezeptor zuordnen (Levi et al., 1975). Das Vorhandensein von Histamin H₁- und H₂-Rezeptoren im Sinus- und AV-Knoten beim Meerschweinchen wurde immunhistochemisch bestätigt (Matsuda et al., 2004). Daten vom Menschen fehlen derzeit jedoch.

Am Gefäßsystem bewirkt Histamin über Histamin H₁- und H₂-Rezeptoren an der glatten Muskulatur der Gefäße einen Abfall des arteriellen Blutdrucks und des systemischen Gefäßwiderstandes (Hattori et al., 2017). Die genaue Wirkweise ist dabei abhängig von Dosis, Region und Spezies (Hattori et al., 2017). An den Koronararterien führen Histamin H₁-Rezeptoren zu Vasokonstriktion und Histamin H₂-Rezeptoren zu einer leichten Vasodilatation (Ginsburg et al., 1980). Offenbar sind im Gefäßsystem auch Histamin H₃- und H₄-Rezeptoren vorhanden. Während Histamin H₃-Rezeptoren eine vasodilatatorische Wirkung zeigen, ist die Rolle der Histamin H₄-Rezeptoren noch nicht eindeutig geklärt (Hattori et al., 2017) – diskutiert wird ein Einfluss auf die Gefäßpermeabilität im Gehirn und auf die Angiogenese (Hattori et al., 2017).

Histamin spielt auch eine pathophysiologische Rolle im kardiovaskulären System. So ist eine arrhythmogene Wirkung von Histamin bekannt (Wolff und Levi, 1986). In elektrisch stimulierten menschlichen Vorhofpräparaten konnten histamininduzierte Arrhythmien durch Famotidin (ein selektiver Histamin H₂-Rezeptor-Antagonist) blockiert werden (Sanders et al., 1996). Durch Mepyramin (ein selektiver Histamin H₁-Rezeptor-Antagonist) gelang dies nicht, was auf einen Histamin H₂-Rezeptor-vermittelten Effekt schließen lässt (Sanders et al., 1996). Daneben trägt Histamin offenbar zu den hämodynamischen Störungen während eines septischen Schocks bei (Matsuda et al., 2002). Bei Kaninchen konnte gezeigt werden, dass bei Endotoxämie, die durch E.coli-Lipopolysaccharide induziert wurde ein starker Anstieg der Histamin Konzentration im Plasma, eine vermehrte Expression der L-Histidin-Decarboxylase im Vorhof sowie von Histamin H₁- und H₂-Rezeptoren in Vorhof und Ventrikel ausgelöst wird (Matsuda et al., 2002). Des Weiteren wurde über histamininduzierte Koronarspasmen (Ginsburg et al., 1981) und eine mögliche Beteiligung von Histamin an Fibrosierung und Kardiomyopathie berichtet (Patella et al., 1998).

Doch woher stammt das Histamin, welches am Herz wirkt? Der Spiegel von zirkulierendem Histamin ist normalerweise relativ niedrig, da es schnell vom Gewebe

aufgenommen und metabolisiert wird (Bristow et al., 1982a). Allerdings enthält das menschliche Herz selbst pro Gramm Ventrikelgewebe $5,4 \pm 0,6 \mu\text{g}$ Histamin (Patella et al., 1995). Dies stammt zum Teil aus kardialen Mastzellen, die perivaskulär und interstitiell in Gewebeproben nachweisbar sind und auf verschiedene Reize Histamin freisetzen können (Patella et al., 1995). Die Menge des durch Mastzellen freigesetzten Histamins am menschlichen Vorhof ist ausreichend um einen positiv inotropen Effekt hervorzurufen und somit Einfluss auf die Herzfunktion zu nehmen (Gristwood et al., 1981).

Neben den Mastzellen existieren allerdings auch noch Mastzell-unabhängige Speicher von kardialem Histamin (Dai und Ogle, 1990). Zum einen erscheint eine Bildung von Histamin in Kardiomyozyten des menschlichen Vorhofs durch die Histidin-Decarboxylase wahrscheinlich (Neumann et al., 2021c). Zum anderen konnte in Mastzell-defizienten Mäusen eine Histaminfreisetzung unter ischämischen Bedingungen festgestellt werden, die durch Vergleich mit sympathektomierten Präparaten und L-Histidin-Decarboxylase-Knockout-Mäusen einem sympathischen Ursprung zugeordnet werden konnte (He et al., 2012). Dass neben Noradrenalin auch Histamin in sympathischen Neuronen vorkommt und bei Stimulation der Nerven freigesetzt wird wurde mehrfach gezeigt, auch am Herzen des Meerschweinchens (Li et al., 2006; He et al., 2008).

In diesem Zusammenhang spielen auch Histamin H_3 - und H_4 -Rezeptoren eine Rolle: Zwar sind Histamin H_3 - und H_4 -Rezeptoren nicht direkt an den Kardiomyozyten zu finden, wohl aber präsynaptisch an den sympathischen Nervenendigungen des Herzens, wo sie die Freisetzung von Noradrenalin und Histamin hemmen (Imamura et al., 1996; Li et al., 2006; Chan et al., 2012). Sie wirken kardioprotektiv, da die sympathische Freisetzung von Noradrenalin bei Ischämie zu Arrhythmien führen kann (Dart und Du, 1993).

Histamin kann somit unabhängig von seiner direkten kardialen Wirkung über Histamin H_1 - und H_2 -Rezeptoren auch über Histamin H_3 - und H_4 -Rezeptoren die Sympathikuswirkung auf das Herz modulieren. An isolierten Meerschweinchenherzen mit bilateral erhaltenem Sympathikus konnte eine erhebliche Reduktion der sympathisch ausgelösten Steigerung von linksventrikulärer Ejektionsfraktion, Perfusionsdruck und Herzfrequenz durch Histamin gezeigt werden (Gross et al., 1984). Welche Wirkung überwiegt scheint konzentrationsabhängig zu sein, da die Affinität von Histamin zum H_3 - und H_4 -Rezeptor höher ist als zu den H_1 - und H_2 -Rezeptoren (siehe 1.1.) (He et al., 2008). Bei Freisetzung von niedrigen Konzentrationen überwog an den sympathischen Nervenendigungen des Vas afferens des Meerschweinchens die inhibierende Wirkung über präsynaptische Histamin H_3 -Rezeptoren, während bei Freisetzung von höheren

Konzentrationen die postsynaptischen H₁-Rezeptoren zur Muskelkontraktion führten (He et al., 2008).

Einen weiteren kardioprotektiven Effekt haben Histamin H₄-Rezeptoren auf kardiale Mastzellen durch Hemmung der Renin Freisetzung bei Ischämie und folglich fehlende Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, welches wiederum zu erhöhter Noradrenalinfreisetzung und somit zu Reperfusionsarrhythmien bei Ischämie führen kann (Aldi et al., 2014).

1.3. Der Histamin H₂-Rezeptor

Nach der Entdeckung des Histamins und der ersten Antihistaminika in den 1930er Jahren gab es schon früh die Vermutung, dass es mehr als einen Rezeptor geben müsste, denn nicht alle Wirkungen von Histamin konnten durch die Histamin-(H₁-)Antagonisten effektiv gehemmt werden, wie zum Beispiel die Magensäuresekretion, die positive Chronotropie und die Relaxation des Uterus der Ratte (Hill et al., 1997). Die eindeutige Identifizierung des Histamin H₂-Rezeptors gelang allerdings erst 1972, als Black et al. mit Burimamid den ersten Histamin H₂-Rezeptor-Antagonisten entdeckten (Black et al., 1972). Histamin H₂-Rezeptor-Antagonisten revolutionierten daraufhin in den 70er Jahren die Behandlung von gastroösophagealen Reflux und peptischen Ulzera (Parsons und Ganellin, 2006). Die molekulare Klonierung des humanen Histamin H₂-Rezeptors gelang erstmals 1991 (Gantz et al., 1991).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Histamin H₂-Rezeptoren am Herzen. Wie bereits unter 1.2. erwähnt, vermitteln Histamin H₂-Rezeptor am Herzen einen positiv inotropen und chronotropen Effekt. Doch wie entstehen diese Wirkungen?

Das Gen für den Histamin H₂-Rezeptor befindet sich auf Chromosom fünf und kodiert für einen 359 Aminosäuren langen, G-Protein-gekoppelten Rezeptor (siehe 1.1.) (Hill et al., 1997) aus sieben transmembranären Helices mit extrazellulären N-Terminus und intrazellulärem C-Terminus (Panula et al., 2015). Es wird davon ausgegangen, dass die Signaltransduktion mit der von β -Adrenozeptoren übereinstimmt (Gergs et al., 2019): Der Histamin H₂-Rezeptor im Myokard aktiviert über Kopplung an ein stimulatorisches G-Protein (G_s) die Adenylatzyklase (AC) (Bristow et al., 1982b), wodurch der intrazelluläre cAMP-Spiegel steigt (Sanders et al., 1996). Dies führt zur Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA), welche verschiedene Zielproteine phosphoryliert (Neumann et al., 2021d) – darunter auch L-Typ-Calcium-Kanäle. Deren Öffnungswahrscheinlichkeit wird dadurch erhöht und es kommt zum Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels, was mit dem positiv inotropen Effekt gekoppelt ist (Eckel et al., 1982).

Vermutlich wird auch der Ryanodin-Rezeptor phosphoryliert, wodurch es zur erhöhten Freisetzung von Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum kommt. (Neumann et al., 2021d). Außerdem wird der Phosphatase Inhibitor 1 phosphoryliert, woraufhin dieser an die Serin/Threonin-Proteinphosphatase 1 (PP1) bindet und diese hemmt (Herzig und Neumann, 2000). PP1 würde Phosphorylierungen durch die PKA wieder dephosphorylieren, somit wird durch ihre Hemmung der PKA-vermittelte Effekt verlängert (Neumann et al., 2021d).

Des Weiteren phosphoryliert die PKA das Protein Phospholamban (PLB) an der Aminosäure Serin-16 (Simmerman und Jones, 1998). Die Calcium-/Calmodulin-abhängige Kinase (CaMKII), die durch hohe zytoplasmatische Calcium-Konzentrationen aktiviert wird, phosphoryliert PLB außerdem an Threonin-17 (Simmerman und Jones, 1998). Phospholamban dient als Regulator der kardialen Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) (Simmerman und Jones, 1998). Im dephosphorylierten Zustand wirkt PLB inhibitorisch (Simmerman und Jones, 1998). Durch die Phosphorylierung entfällt die hemmende Wirkung und zytoplasmatisches Calcium wird vermehrt in das sarkoplasmatische Retikulum gepumpt (Simmerman und Jones, 1998). Dies führt zu einer schnelleren Relaxation in der Diastole – also zu einem positiv lusitropen Effekt (Simmerman und Jones, 1998). Zur schnelleren Relaxation trägt außerdem bei, dass die PKA auch die inhibitorische Untereinheit von Troponin (TnI) phosphoryliert, wodurch es die Sensibilität der Myofilamente für Calcium reduziert wird (Neumann et al., 2021d). (Zusammenfassung in Abbildung 1)

Der positiv chronotrope Effekt wird auch über die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels durch die Adenylatcyclase vermittelt. Satoh zeigte an Präparaten des Sinusknotens von Kaninchen durch Histamin eine Erhöhung der Sinusfrequenz und der dafür entscheidenden Ionenströme, wie den hyperpolarisationsaktivierten Einwärtsstrom („Schrittmacherstrom“) (Satoh, 1993). Diese konnten sowohl durch Cimetidin (einen weiteren selektiven Histamin H_2 -Rezeptor-Antagonisten) als auch durch Acetylcholin, welches über G_i -Protein-gekoppelte Rezeptoren die Adenylatzyklase hemmt, unterdrückt werden (Satoh, 1993). Tatsächlich scheint der für den Schrittmacherstrom zuständige HCN-Kanal im Sinusknoten direkt durch cAMP – also phosphorylierungsunabhängig – aktiviert zu werden, wodurch die generierte Frequenz steigt (DiFrancesco und Tortora, 1991; DiFrancesco und Mangoni, 1994).

Zusätzlich spielt beim positiv chronotropen Effekt der Calcium-Einstrom über L-Typ Calcium-Kanäle eine Rolle: Durch Hemmung des L-Typ Calcium-Kanals mit Verapamil konnten in Versuchen an menschlichen Herzmuskelfasern die durch Histamin getriggerte Automatizität sowie späte Nachdepolarisationen unterdrückt werden (Levi et al.,

Neben G_s -Proteinen koppelt der Histamin H_2 -Rezeptor teilweise auch an $G_{q/11}$ -Proteine (Wellner-Kienitz et al., 2003). Dadurch wird die Phospholipase C aktiviert, die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) hydrolysiert. Im Folgenden führt auch dieser Signalweg zum Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration und verstärkt somit den Effekt der G_s -Proteine (Wellner-Kienitz et al., 2003). Zusätzlich koppeln Histamin H_2 -Rezeptoren – wie auch weitere kardiale G_s -Protein-gekoppelte Rezeptoren – an inhibitorische G-Proteine (G_i), wodurch die Adenylatcyclase tonisch gehemmt wird (Kilts et al., 2000; Belevych et al., 2004). Die physiologische Funktion dieser doppelten Kopplung ist jedoch noch nicht vollständig geklärt.

1.4. Neue H_2 -Rezeptor-Agonisten

Mittlerweile sind mehrere Histamin H_2 -Rezeptor-Agonisten bekannt und auf ihre Wirkung am Herzen untersucht: Neben Histamin (Abbildung 2) gibt es zum Beispiel den ähnlich potenten vollen Agonist Amthamin, den weniger potenten vollen Agonist Dimaprit (Abbildung 2) und den potenteren partiellen Agonist Impromidin (Übersicht siehe Tabelle 1) (Bristow et al., 1982b; Poli et al., 1993; Poli et al., 1994). Dimaprit und Impromidin interagieren daneben noch mit dem Histamin H_3 - und H_4 -Rezeptor (Panula et al., 2015).

Im Zuge der Erforschung der Wirkung von Histamin im zentralen Nervensystem wurden kürzlich neue H_2 -Rezeptor-Agonisten vorgestellt, welche von der Arbeitsgruppe von Dr. rer. nat. Steffen Pockes (Institut für Pharmazie, Universität Regensburg) entwickelt wurden. Da viele H_2 -Rezeptor-Agonisten die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren können (Panula et al., 2015), wurden Agonisten hergestellt, welche eine bessere Bioverfügbarkeit im ZNS aufweisen. Dabei handelte es sich um monomere Carbamoylguanidine mit verschiedenen Seitenketten (Biselli et al., 2021). Die folgende Arbeit beschäftigt sich mit drei dieser neuen H_2 -Rezeptor-Agonisten: UR-Po563, UR-MB-158 und UR-MB-159. Alle drei Substanzen verfügen über eine Carbamoylguanidin- und eine Benzylgruppe. Sie unterscheiden sich jedoch darin, dass UR-Po563 zusätzlich über einen 2-Aminothiazol-Ring (Biselli et al., 2021), UR-MB-158 über einen 2-Amino-1,3,4-Thiadiazol-Ring und UR-MB-159 über einen 1,2,4-Triazol-Ring (Tropmann et al., 2021) verfügt (Abbildung 2). Biselli et al. und Tropmann et al. wiesen bereits in Radioligandenbindungsassays hohe Rezeptoraffinitäten und -selektivitäten der drei Substanzen zum H_2 -Rezeptor im Vergleich zum H_1 -, H_3 - und H_4 -Rezeptor nach. Auch zeigten sie an spontan schlagenden rechten Vorhöfen von Meerschweinchen einen positiv chronotropen

Effekt der Substanzen. UR-Po563 zeigte zudem eine hohe Affinität zum Dopamin-D3-Rezeptor (Biselli et al., 2021), welche UR-MB-158 und UR-MB-159 nicht aufwiesen (Tropmann et al., 2021).

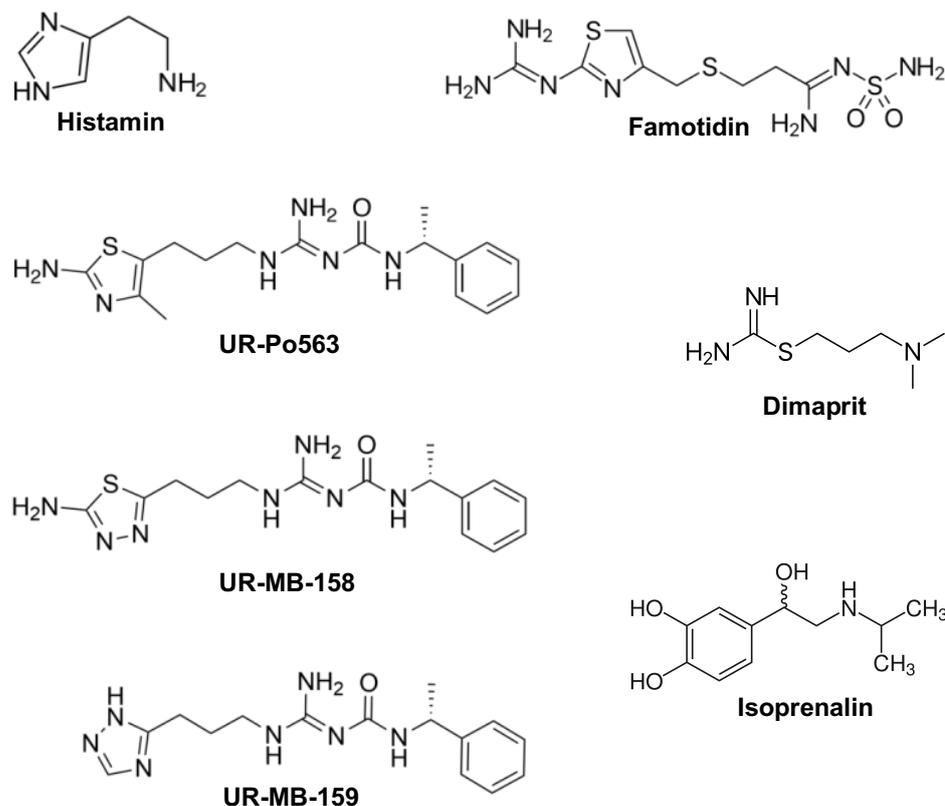


Abb. 2: Strukturformeln von Histamin; dem H₂R-Antagonisten Famotidin; den H₂R-Agonisten UR-Po563 ((R)-1-(Amino((3-(2-amino-4-methylthiazol-5-yl)propyl)amino)methylen)-3-(1-phenylethyl)harnstoff), UR-MB-158 (1-(Amino((3-(5-amino-1,3,4-thiadiazol-2-yl)propyl)amino)methylen)-3-((R)-(1-phenylethyl))harnstoff), UR-MB-159 (1-(Amino((3-(1H-1,2,4-triazol-5-yl)propyl)amino)methylen)-3-((R)-(1-Phenylethyl))-harnstoff); dem H₂R-, H₃R- und H₄R-Agonisten Dimaprit; sowie dem nicht-selektiven β-Adrenozeptor-Agonisten Isoprenalin.

Quellen: Gergs et al., 2021a; Structure of (±)-isoproterenol (isoprenaline). URL: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Isoproterenol.svg> (07.09.2024); Skeletal formula of dimaprit — an H₄ histamine receptor agonist. Created with ChemDoodle 7.0.2 and Adobe Illustrator CC 2015. URL: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dimaprit.svg> (07.09.2024)

2. Zielsetzung

Die drei neuen Histamin H₂-Rezeptor-Agonisten UR-Po563, UR-MB-158 und UR-MB-159 wurden von der kooperierenden Arbeitsgruppe des Instituts für Pharmazie der Universität Regensburg als ZNS-gängige Substanzen zur weiteren Erforschung der Rolle von Histamin H₂-Rezeptoren im Gehirn entwickelt. Tatsächlich liegen Hinweise vor, dass der Histamin H₂-Rezeptor eine fördernde Wirkung auf das Gedächtnis haben könnte (Khan et al., 2016; Sadek et al., 2016), weshalb die Substanzen womöglich für die Behandlung von Erkrankungen wie Morbus Alzheimer in Frage kommen.

Wie bereits in der Einleitung erläutert, kommen Histamin H₂-Rezeptoren neben dem Gehirn auch am Herzen vor und vermitteln dort eine Vielzahl von Effekten. Bei einer Behandlung von Patienten mit den neuen Substanzen könnte es also auch zu einer Beeinflussung der Herzfunktion kommen. Ziel dieser Arbeit war es, diese kardialen Effekte von UR-Po-563, UR-MB-158 und UR-MB-159 zu charakterisieren.

Mit Hilfe von Mäusen und Proben aus menschlichen Vorhöfen wurde der Einfluss der Substanzen auf Inotropie und Chronotropie sowie die Signaltransduktion untersucht. Da bei Wildtyp-Mäusen kein histaminvermittelter positiv inotroper und chronotroper Effekt nachweisbar ist, wurden dazu transgene Mäuse eingesetzt, die den humanen Histamin H₂-Rezeptor überexprimieren und zuvor am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg entwickelt wurden. (Gergs et al., 2019).

3. Material und Methoden

3.1. Versuchstiere

Für die Versuche wurden Histamin H₂-Rezeptor überexprimierende, transgene Mäuse (H₂-TG) und Wildtyp-Geschwistertiere (WT) verwendet. Zur Generierung der transgenen Mäuse wurde cDNA des humanen H₂-Rezeptors zusammen mit einem C-terminalen 6x Histidin-tag in eine Expressionskassette eingefügt (Abb. 3A). Als Promotor wurde die kardiomyozytenspezifische α -Isoform der schweren Kette des Myosins (α -MHC) der Maus verwendet. Hierdurch konnte gewährleistet werden, dass der H₂-Rezeptor spezifisch in diesem Gewebe exprimiert wird. Vervollständigt wurde die Expressionskassette durch eine Simian Virus 40 (SV40) Poly-A-Sequenz, die als Terminierungssequenz diente. Das Genkonstrukt wurde in befruchtete Eizellen von FVB/N-Mäusen injiziert, woraufhin Nachkommen mit herzspezifischer Expression des H₂-Rezeptors nachgewiesen werden konnten. Diese transgenen Tiere wurden abschließend in den CD1-Stamm eingekreuzt. (Gergs et al., 2019)

Die H₂-TG-Tiere waren zum Versuchszeitpunkt durchschnittlich $155 \pm 7,72$ Tage alt und $38,4 \pm 0,98$ g schwer. Die WT-Mäuse waren durchschnittlich $162 \pm 5,91$ Tage alt und wogen $37,7 \pm 1,25$ g. Es wurden insgesamt 45 H₂-TG verwendet, davon waren 29 weiblich und 16 männlich. Bei den WT wurden insgesamt 41 Tiere verwendet, 26 weibliche und 15 männliche. Die Haltung und Zucht der Tiere wurde durch die Core Facility Tierhaltung der medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt. Sämtliche Genehmigungen liegen dort vor. Tierversuche (Echokardiografie) erfolgten entsprechend dem genehmigten Tierversuchsantrag vom 01. März 2021 mit dem Aktenzeichen 203.m-42502-2-1662 MLU.

3.2. Genotypisierung

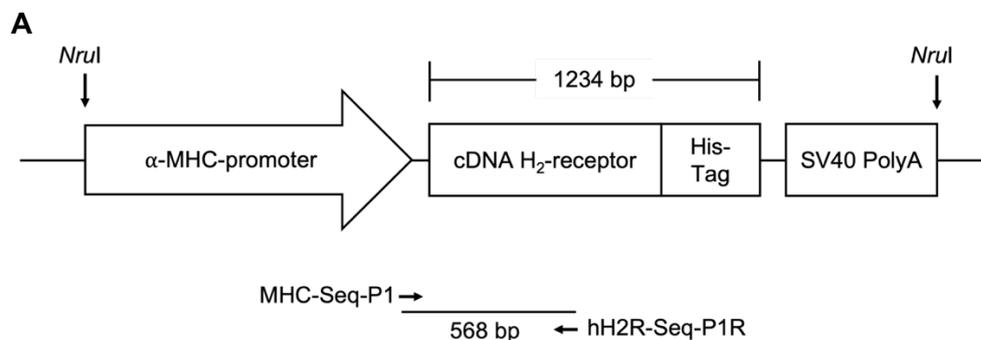
Alle verwendeten Tiere wurden vor den Versuchen anhand von Schwanzspitzen-DNA genotypisiert und zur späteren Identifizierung mit einer Ohrmarke versehen.

Im ersten Schritt wurde die DNA isoliert. Hierfür wurde etwa 2 mm der Schwanzspitze entfernt und mit 250 μ l Lysispuffer (siehe Anhang) in ein Reaktionsgefäß gegeben. Dieses wurde über Nacht bei 56 °C im Thermomixer schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde 250 μ l Neutralisationspuffer (siehe Anhang) hinzugegeben und gut gemischt.

Im nächsten Schritt wurde die DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Dieses Verfahren ermöglicht es, eine bekannte DNA-Sequenz – in diesem

Fall die für den humanen Histamin-H₂-Rezeptor kodierende – mit Hilfe spezifischer Primer exponentiell zu vervielfältigen. Dafür wurde ein Reaktionsansatz (Mastermix) aus forward- und reverse-Primer, einem vorgefertigten 2-fach Mastermix (Vazyme #P211) und zweifach destilliertem Wasser (aqua bidest) hergestellt (siehe Anhang) und schließlich 19 µl dieses Reaktionsansatzes mit 1 µl der isolierten DNA gemischt. Mit dem entsprechenden Programm zur PCR (siehe Anhang) wurde die DNA-Sequenz in einem Eppendorf „Mastercycler gradient“ vervielfältigt.

Zuletzt wurde die vervielfältigte DNA mittels Agarosegelelektrophorese analysiert, mit der elektrisch geladene Moleküle in einem Agarosegel ihrer Größe nach getrennt werden. Im elektrischen Feld haben die DNA-Fragmente – abhängig von ihrer Größe – eine unterschiedliche Laufweite im Gel. Dazu wurde zunächst ein 1 %iges Agarosegel hergestellt (siehe Anhang), in einer Gelkammer mit Kämmen versetzt, etwa 20 Minuten polymerisiert und dann die Kämmen entfernt. Anschließend wurde in die erste Tasche des Gels 8 µl eines Größenmarkers (Gene Ruler 1 kb DNA Ladder) zur Größenkontrolle und in die weiteren Taschen je 15 µl PCR-Produkt pipettiert. Der Strom (Stromstärke 100 mA) wurde angelegt und nach einer Laufzeit von 20 bis 30 Minuten konnte das Ergebnis unter UV-Licht sichtbar gemacht, fotodokumentiert und ausgewertet werden (Abb. 3B).



MHC-Seq-P1 (forward primer): 5'-ACCCTTACCCACATAGACC-3'

hH2R-Seq-P1R (reverse primer): 5'-AGCAGGTCAGTGATAGCCAA-3'

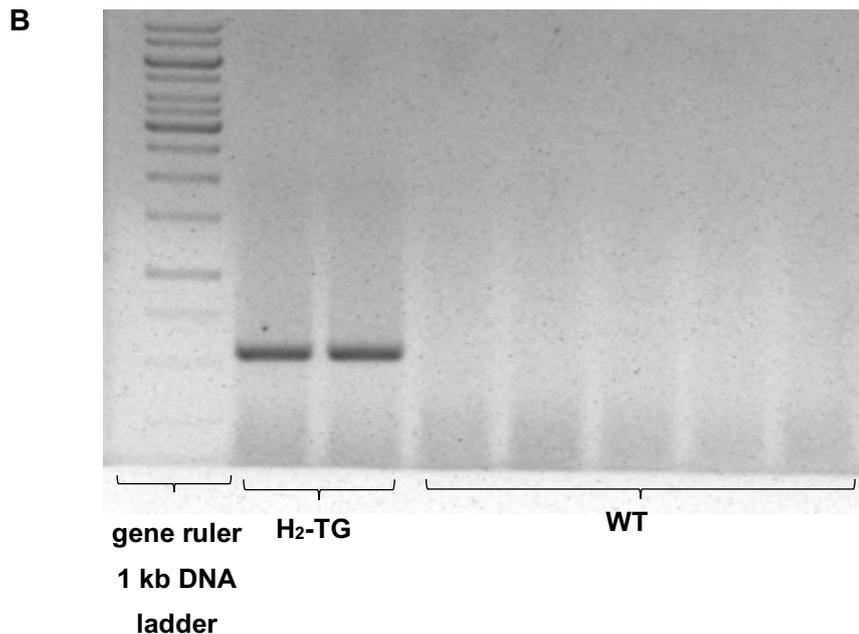


Abb. 3: (A) Transgenes Konstrukt des H₂-Rezeptors. Die humane H₂-Rezeptor-cDNA wurde zusammen mit einem c-terminalen 6xHistidin-tag hinter die herzmuskelspezifische α -Myosin schwere Kette Promotor Expressionskassette eingefügt. **(B)** Genotypisierung der H₂-Rezeptor-transgenen (H₂-TG) Mäuse im Vergleich zu Wildtyp (WT) Mäusen durch PCR und Agarosegelelektrophorese von DNA der Schwanzspitzen. Bei H₂-TG konnte das DNA-Fragment des H₂-Rezeptors vervielfältigt werden und ist als Bande im Gel sichtbar. WT verfügen nicht über diese DNA-Sequenz, demzufolge ist auch keine Bande im Gel zu erkennen. Quelle: (A) in Anlehnung an Gergs et al., 2019, (B) eigene Darstellung

3.3. Kontraktionversuche

3.3.1. Das Organbad

Um während der Versuche ein möglichst physiologisches Milieu zu schaffen, befanden sich die Präparate in einem Organbad gefüllt mit 10 ml sogenannter Tyrode-Lösung, die an jedem Versuchstag frisch hergestellt wurde. Dazu wurden drei vorbereitete Stammlösungen in definierter Menge zusammengefügt (siehe Anhang) und zur pH-Stabilisierung 10 Minuten mit Carbogen (95 % O₂ und 5 % CO₂) begast. Anschließend wurden 0,8 ml Calciumchloridlösung (32,2 g CaCl₂/100 ml H₂O), 1 g Glucose, 49,9 g Ascorbinsäure und 19 g Na₂EDTA hinzugefügt und die Lösung mit aqua bidest auf 1 Liter aufgefüllt. Die Tyrode-Lösung wurde auf 37 °C erwärmt, fortan auf dieser Temperatur gehalten und kontinuierlich mit Carbogen begast, um einen gleichbleibenden pH-Wert von 7,4 zu halten.

3.3.2. Die Messanlage

Die Messanlage bestand aus mehreren doppelwandigen Gefäßen, die jeweils zur Aufnahme eines Vorhofes dienten (Abb. 4). Der innere Teil wurde mit 10 ml Tyrode-Lösung befüllt und durch einen Carbogen-Anschluss durchgehend begast. Die Flüssigkeit konnte über einen Abfluss am unteren Ende des Lumens abgelassen werden, in das offene, obere Ende konnten Wirkstoffe und frische Flüssigkeit eingefüllt werden. Der äußere Teil des Doppelwandgefäßes war über einen Ein- und Ausfluss an einen auf 37 °C beheizten Wasserkreislauf angeschlossen, wodurch das Organbad während des Versuchs indirekt temperiert wurde.

Mit Hilfe einer Haltevorrichtung, an der der Vorhof mit zwei Metalldrähten befestigt wurde, konnte das Präparat in das Organbad eingetaucht werden. Der obere Draht war mit einem Kraftaufnehmer verbunden, der die Kontraktionskraft aufnahm und – verstärkt durch einen Brückenverstärker – an einen Digitalisierer und zur Aufzeichnung mit der Software Labchart 8 (ADInstruments, Oxford, UK) weiter an den Computer leitete.

Zwei Reizelektroden an der Haltevorrichtung boten die Möglichkeit, den Vorhof elektrisch zu stimulieren. Diese wurden bei den linken Vorhofpräparaten eingesetzt, wobei die Reizung mit einer Frequenz von 1 Hz, einer Impulsdauer von 5 ms und einer Spannung etwa 10-20 % oberhalb des Schwellenwertes erfolgte. Die linken Vorhofpräparate dienten der Analyse der Kontraktionskraft.

Die rechten Vorhofpräparate dienten dagegen vorrangig der Frequenzmessung. Da sie den Sinusknoten enthielten, konnten sie spontan schlagen – vorausgesetzt das Reizbildungs- und -leitungssystem wurde während der Präparation nicht beschädigt.

Vor Beginn jedes Versuches wurde die Messanlage kalibriert: Der Nullpunkt wurde bei frei hängendem Metalldraht festgelegt und nach Belastung des Drahtes mit einem 500 mg Gewicht wurde der entsprechende Ausschlag mit 5 mN als Referenz gespeichert. Anschließend konnte die Anlage in Betrieb genommen werden.

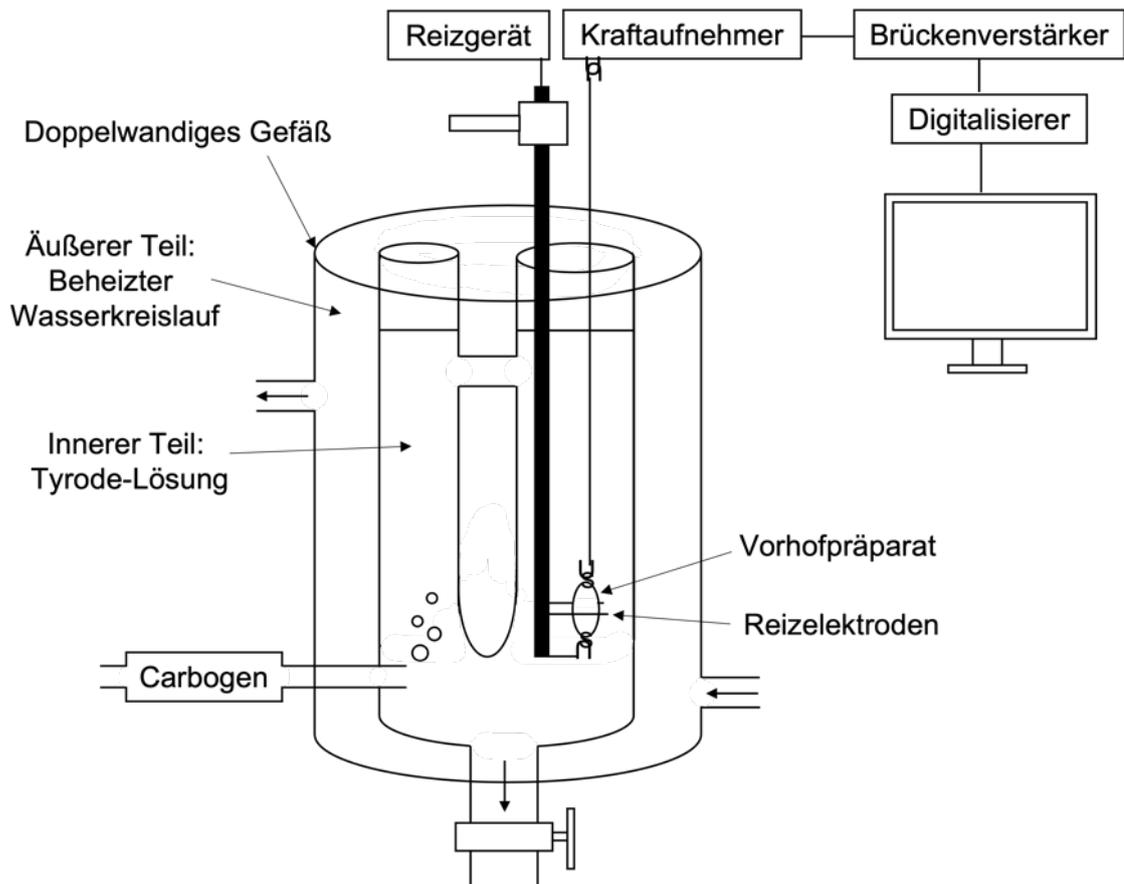


Abb. 4: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung. Der Vorhof hängt im Organbad im inneren Teil des doppelwandigen Gefäßes, das kontinuierlich mit Carbogen begast wird. Durch die Reizelektroden können die linken Vorhöfe elektrisch stimuliert werden. Der äußere Teil ist an einen beheizten Wasserkreislauf angeschlossen und temperiert das Organbad auf 37 °C. Über den Kraftaufnehmer wird die Kontraktionskraft abgeleitet. Quelle: eigene Darstellung

3.3.3. Organentnahme der Mauserzen

Zuerst wurde bei jeder Maus anhand der Ohrmarke die Identität überprüft und das Tier gewogen. Anschließend wurden intraperitoneal 500 IE Heparin injiziert, um eine Thrombenbildung zu vermeiden. Durch eine intraperitoneal applizierte Dosis Pentobarbital (50-75 mg/kg Körpergewicht) wurden die Tiere narkotisiert. Nach dem Wirkungseintritt, der mittels Schmerzreiz überprüft wurde, konnte die Maus in Rückenlage an der Haut von Thorax und Abdomen in einer Präparierschale fixiert werden. Mit einem Schnitt ventral wurden Fell und Oberhaut entfernt und mit einem weiteren das Peritoneum eröffnet, sodass das Zwerchfell von kaudal einsehbar war. Dieses wurde vorsichtig entlang des Rippenbogens aufgeschnitten und anschließend die Rippen links und rechts seitlich in Richtung kranial durchtrennt. Dadurch konnten das Sternum und die vorderen Rippen

nach kranial aufgeklappt werden und die Thoraxorgane wurden gut sichtbar. Nun konnten die zu- und abführenden Gefäße durchtrennt und das Herz-Lungen-Paket in ein Becherglas mit raumtemperierter Tyrode überführt werden. Die Eigenkontraktion und eine vorsichtige Komprimierung spülten das restliche Blut aus dem Herzen. Bevor der restliche Körper entsorgt wurde, wurde abschließend von der Schwanzspitze des Tieres ein etwa 0,5 cm langes Stück entnommen, um eventuell eine nachträgliche Genotypisierung zu ermöglichen.

3.3.4. Präparation der Mausvorhöfe

Zur Präparation der Vorhöfe wurde das entnommene Herz-Lungen-Paket in eine mit Tyrode befüllte und Carbon begaste Präparierschale gelegt, am Herzapex fixiert und zunächst die Lungenflügel, die großen Gefäße und der Thymus entfernt. Anschließend konnte der linke Vorhof vom restlichen Gewebe gelöst und am oberen und unteren Pol mit einem kleinen Haken durchstoßen werden. So war das Einhängen in die Haltevorrichtung möglich. Die elektrische Reizung wurde gestartet und der Vorhof auf 5 mN vorgespannt. Bis auf die elektrische Reizung wurde mit dem rechten Vorhof genauso verfahren. Dabei musste äußerst vorsichtig gearbeitet werden, um den empfindlichen Sinusknoten nicht zu schädigen.

Die ersten 30 Minuten in der Anlage dienten der Equilibrierung der Vorhöfe. In dieser Zeit wurde alle 10 Minuten die Tyrode-Lösung gewechselt und die Vorhöfe gegebenenfalls nachgespannt, um die optimale isometrische Kraftmessung zu gewährleisten.

3.3.5. Versuchsdurchführung

Die Versuchsprotokolle sind in Abbildung 5 schematisch dargestellt und erfolgten jeweils bei H₂-TG- und WT-Mäusen. Zu Beginn eines jeden Versuches erfolgte die Zugabe von Histamin, wodurch sich die vorangegangene Genotypisierung anhand der physiologischen Reaktion bestätigte. Die Zugabe erfolgte kumulativ von 10⁻⁹ M bis 10⁻⁶ M (Einzelschritte: 10⁻⁹ M, 3x10⁻⁹ M, 10⁻⁸ M, 3x10⁻⁸ M, usw.) oder in späteren Versuchen als Bolusgabe von 10⁻⁶ M. Die kumulative Gabe ermöglichte es, eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve (KWK) zu erstellen. Die Steigerung auf die nächsthöhere Konzentration erfolgte erst, wenn die Wirkung ein Plateau erreicht hatte, also die jeweilige Konzentration die maximale Wirkung zeigte. Bei Histamin dauerte dies fünf Minuten pro Konzentrationsstufe. Anschließend wurde innerhalb von 30 Minuten drei Mal die Tyrode-Lösung im Organbad gewechselt, um den Wirkstoff vollständig auszuspülen (wash out). Dadurch wurde wieder die Ausgangskraft und -frequenz erreicht.

Im weiteren Ablauf unterschieden sich die Versuche: In Versuchsreihe 1 erfolgte eine Bolusgabe von 1 μM Isoprenalin und nach Erreichen des Wirkmaximums eine erneute kumulative Gabe von 10^{-9} M bis 10^{-6} M Histamin ohne zwischenzeitliches wash out. In Versuchsreihe 2, 4 und 6 wurde durch kumulative Gabe eine KWK der neuen H_2 -Rezeptor-Agonisten UR-Po563 (10^{-9} M bis 10^{-6} M), UR-MB-158 (10^{-11} M bis 10^{-5} M) und UR-MB-159 (10^{-11} M bis 10^{-6} M) erstellt. Die kumulative Gabe erfolgte wieder bis zum Erreichen des Plateaus. Die angewendeten Konzentrationsbereiche wurden den experimentell ermittelten, unterschiedlichen Wirkungsbereichen der Substanzen angepasst.

Versuchsreihe 5 bis 7 dienten der Überprüfung der Antagonisierbarkeit von UR-Po563, UR-MB-158 und UR-MB-159 durch den H_2 -Rezeptor-Antagonisten Famotidin. Zu diesem Zweck erfolgte die Bolusgabe von 10 μM Famotidin. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurde eine KWK von UR-Po563 (10^{-9} M bis 10^{-5} M), UR-MB-158 (10^{-9} M bis 10^{-5} M) und UR-MB-159 (10^{-9} M bis 10^{-5} M) durchgeführt. Um den Verbrauch von Versuchstieren zu reduzieren, wurden teilweise die Versuche 5 bis 7 direkt im Anschluss an Versuch 2 bis 4 durchgeführt. In diesem Fall fand keine erneute Histamin KWK statt. Nach Abschluss der ersten KWK (Versuch 2/3/4) wurde der Wirkstoff über 30 Minuten mit Tyrode ausgespült, die bereits 10 μM Famotidin enthielt. Anschließend folgte die zweite KWK (Versuch 5/6/7) mit derselben Substanz, die auch in der ersten KWK verwendet wurde.

Am Ende eines jeden Versuches wurden die Vorhöfe in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung zur Bestimmung der Proteinphosphorylierung (siehe 3.6.) bei -80 °C gelagert. Auch die Schwanzspitze und das Restherz wurden unmittelbar nach der Präparation so eingelagert.

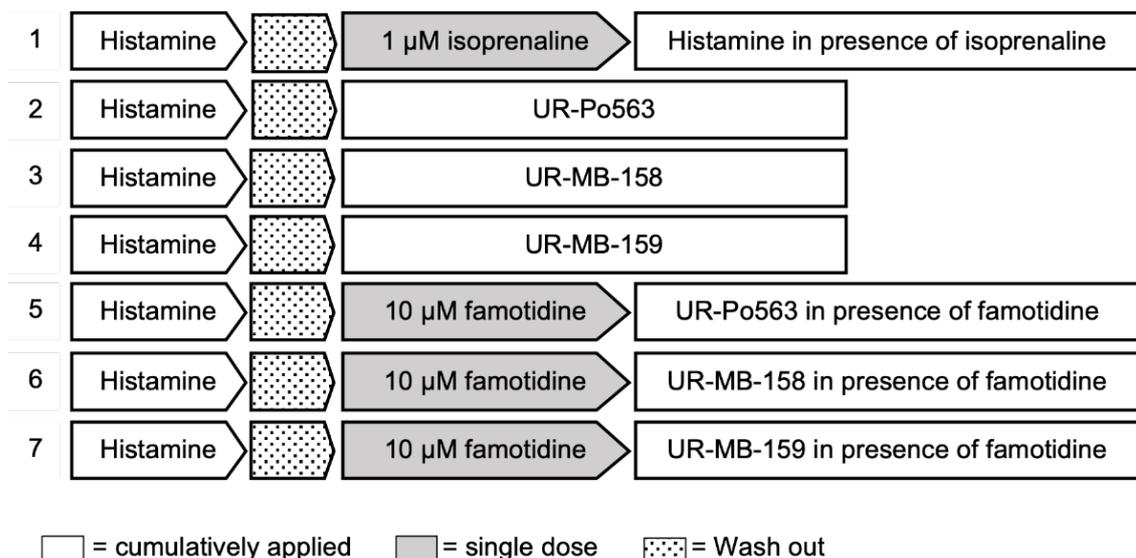


Abb. 5: Versuchsprotokolle. In jeder Versuchsreihe wurde zu Beginn Histamin gegeben, um die Differenzierung zwischen H₂-Rezeptor-transgenen und Wildtyp Mäusen zu bestätigen. Anschließend wurde das Histamin über 30 Minuten ausgewaschen. In Versuchsablauf (1) folgte auf einen Bolus von 1 µM Isoprenalin ohne zwischenzeitliches Auswaschen Histamin in steigender Konzentration. Die H₂-Rezeptor-Agonisten UR-Po563, UR-MB-58 und UR-MB-159 wurden in steigender Konzentration sowohl einzeln (2,4,6), als auch nach Bolusgabe von 10 µM Famotidin (3,5,7) gegeben. Quelle: eigene Darstellung

3.3.6. Menschliche Vorhofpräparate

In Zusammenarbeit mit der Herzchirurgie des Universitätsklinikums Halle konnten auch sieben menschliche Vorhofpräparate für Kontraktionsversuche genutzt werden. Die Gewebeproben aus dem rechten Vorhof wurden im Rahmen von Bypass-Operationen von Patienten mit koronarer 3-Gefäß-Erkrankung entnommen. Anschließend wurden im Institut für Pharmakologie und Toxikologie einzelne Trabekel von 5-8 mm Länge abpräpariert und mit kleinen Haken versehen. So konnten die Präparate analog zu den linken Mausvorhöfen in die Messanlage eingehängt, elektrisch gereizt und equilibriert werden. Anschließend wurde UR-Po563 kumulativ (10⁻⁹ M bis 10⁻⁶ M) in das Organbad pipettiert.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg genehmigt (hm-bü 04.08.2005), entsprach der Deklaration von Helsinki und die Patienten gaben ihr informiertes Einverständnis.

Alle Patienten waren männlich, 52 bis 72 Jahre alt und hatten eine linksventrikuläre Ejektionsfraktion von 40 bis 60 % sowie eine Angina pectoris Grad III nach CCS-Skala (Canadian Cardiovascular Society). Die Erkrankungen entsprachen dem Stadium III bis IV der NYHA-Klassifikation (New York Heart Association). Bekannte Komorbiditäten waren arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie und Diabetes mellitus. An Medikamenten wurden Antikoagulanzen, Thrombozytenaggregationshemmer, β-Adrenozeptor-Antagonisten, Kalziumkanalblocker (Dihydropyridine), Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer oder Angiotensin-Rezeptor-Blocker, Diuretika, Protonenpumpenhemmer und Metformin oder Insulin eingenommen bzw. gespritzt.

3.4. Langendorff-Herzen

Die Langendorff-Apparatur (Langendorff, 1895) bietet die Möglichkeit, Beobachtungen am isolierten, spontan schlagenden, kompletten Herz anzustellen. Nach Vorbereitung der Tyrode-Lösung (entsprechend 3.3.1.) wurde diese durch eine Filteranlage filtriert. Die Apparatur wurde vor Versuchsbeginn gereinigt und die Tyrode auf 37 °C erwärmt,

mit Carbogen begast und mit Hilfe einer Blasenfalle blasenfrei in die Anlage eingespeist. Das Filtrieren und blasenfreie Einspeisen war wichtig, um Embolien durch Partikel oder Luftbläschen zu vermeiden, da die Tyrode als Perfusionsflüssigkeit diente. Die Organentnahme der Herzen von H₂-TG und WT erfolgte in der bereits unter 3.3.3. beschriebenen Art, wobei darauf geachtet wurde einen möglichst großen Anteil des Aortenbogens zu belassen. Die weitere Präparation erfolgte in einer Tyrode-befüllten Präparierschale unter dem Mikroskop. Das Herz wurde sofort an einer 20 Gauge Kanüle über die Aorta fixiert. Die Kanüle wurde dabei nur so weit vorgeschoben, dass sie kurz vor der Aortenklappe endete. So konnte gewährleistet werden, dass sich bei Injektion von Flüssigkeit die Aortenklappe durch den hydrodynamischen Druck verschloss und die Perfusionsflüssigkeit in die Koronararterien gelangte. Somit konnte die Durchblutung des Herzens in Form einer retrograden Perfusion imitiert werden. Das Herz wurde mit Tyrode gespült und Lungen- und Thymusreste entfernt. Dann konnte es über die Kanüle blasenfrei in die Anlage eingehängt werden. Ein am Herzapex befestigtes Metallhäkchen war über eine Umlenkrolle mit einem Kraftaufnehmer verbunden, der die Herzkontraktionen erfasste und über einen Brückenverstärker und Digitalisierer an den Computer weiterleitete, welcher sie mit Hilfe des Programmes LabChart 8 aufzeichnete. In der Anlage wurde das Herz durch eine Pumpe mit einem konstanten Fluss von 2 ml/min mit der erwärmten und oxygenierten Tyrode perfundiert. Nach 30-minütiger Equilibrierungszeit wurde 1 µM UR-Po563 über eine angeschlossene Spritzenpumpanlage in das System eingespeist. Wie bei den Kontraktionsversuchen (siehe 3.3.5.) wurde auch hier das Herz nach dem Versuch in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung (Bestimmung der Proteinphosphorylierung, siehe 3.6.) bei -80 °C gelagert.

3.5. Echokardiografie

Die Wirkung der neuen H₂-Rezeptor-Agonisten in vivo wurde echokardiografisch beurteilt. Dazu wurden Versuche sowohl an H₂-TG als auch an WT durchgeführt. Die Einleitung der Narkose erfolgte durch Inhalation von 2 % Isofluran, wobei die Spontanatmung erhalten blieb. Die Tiere wurden in Rückenlage auf einem beheizten Untersuchungstisch an integrierten EKG-Elektroden fixiert und die Narkose durch Inhalation von 1,5 % Isofluran über eine Nasensonde aufrechterhalten. Durch eine rektale Temperatursonde konnte die Körpertemperatur der Mäuse kontrolliert und mit Hilfe des Tisches bei 37 °C gehalten werden. Der ventrale Thorax wurde enthaart und anschließend 100 µl einer 1 mM Stammlösung von UR-Po563, UR-MB-158 oder UR-MB-159 intraperitoneal injiziert. Bei UR-Po563 wurde außerdem die Antagonisierbarkeit durch Famotidin untersucht. Hierfür erfolgte zuerst eine intraperitoneale Injektion von 100 µl einer 1 mM

Stammlösung von Famotidin. Fünf Minuten später folgte die gleiche Menge UR-Po563 ebenfalls intraperitoneal.

Die Untersuchungen wurden transthorakal mit einer 10 MHz Ultraschallsonde in der parasternalen kurzen Achse durchgeführt. Es wurden zunächst Untersuchungen im B-Mode gemacht und dann auf den M-Mode gewechselt. Die Untersuchung und Datenanalyse erfolgte mit dem Ultraschallsystem Vevo 2100 und der dazugehörigen Software Vevo 2100 4.1.0 (Visual Sonic, Toronto, Kanada), wobei jeweils unmittelbar vor und fünf Minuten nach der Injektion die Schlagfrequenz und die Ejektionsfraktion des linken Ventrikels beobachtet wurden.

3.6. Western Blot-Analysen

Um den Signalweg von UR-Po563 besser zu verstehen, wurde in den Vorhöfen und Ventrikeln der Maus Herzen der Phosphorylierungszustand von Phospholamban an den Aminosäuren Serin-16 und Threonin-17 untersucht. Diese Aminosäuren werden bekanntermaßen in der Signalkaskade des Histamin H₂-Rezeptors phosphoryliert (siehe 1.3. und Abb. 1), was durch Western Blots mit phosphorylierungsspezifischen Antikörpern gut nachgewiesen werden kann. Hierfür wurden die Präparate aus den Kontraktions- und Langendorff-Versuchen verwendet, die im Wirkmaximum von je 1 µM UR-Po563 eingefrorenen und bei -80 °C gelagerten wurden.

Im ersten Schritt wurden die Proben homogenisiert. Dies erfolgte zunächst mittels Mikrodismembrator (1 min, 2000-2700 rpm), wobei 50-100 mg Gewebe mit 100 µM Homogenisationspuffer (siehe Anhang) gemischt, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und durch eine Stahlkugel zermahlt wurde. Das entstandene Gewebepulver wurde erneut mit 100 µM Homogenisationspuffer gemischt und nach dem Auftauen zweimal für je 30 Sekunden ultraschallhomogenisiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 25 °C und anschließender Zentrifugation (30 min, 14000 rpm) konnten die Überstände (Homogenate) abpipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert werden.

Im nächsten Schritt erfolgte die quantitative Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry et al., 1951). Als Standard diente 1 mg Albumin/ml aqua bidest in einer Verdünnung von 1:100. Hiermit wurden die Standardverdünnungen angesetzt. Die Proben (Homogenate) wurden mit aqua bidest auf 1:50 (Vorhöfe) bzw. 1:100 (Ventrikel) vorverdünnt und anschließend 100 µl zu 400 µl aqua bidest gegeben. Nach Zugabe von je 500 µl Lösung D (siehe Anhang) zu den Proben und Standards und 15-minütiger Inkubation wurde je 0,1 ml Lösung E (siehe Anhang) beigemischt und erneut 15 Minuten inkubiert. Anschließend konnte die Absorption der Standard- und Probenlösungen bei 595 nm im

Photometer gemessen werden. Anhand der Standardkurve konnte der Proteingehalt der Proben berechnet werden, sodass für die folgenden Analysen die Mengen für eine Verdünnung sämtlicher Proben auf eine einheitliche Konzentration von 1 µg Protein/µl Endvolumen bekannt waren.

Als nächstes sollten die Proteine mittels SDS-Page ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Dies erfolgte mit Hilfe einer vertikalen Elektrophorese-Apparatur, welche mit einem Trenn- und einem Sammelgel sowie Elektrophorese-Puffer (siehe Anhang) befüllt wurde. Das Trenngel (siehe Anhang) wurde bereits am Vortag gegossen, polymerisiert und über Nacht im Kühlraum gelagert. Am Versuchstag wurde dann das Sammelgel gegossen (siehe Anhang), mit Kämmen versehen und polymerisiert. Nach Aufbau der Elektrophorese-Apparatur wurden die nach Lowry berechneten Mengen der Probenlösungen mit 2-fach-Probenpuffer (siehe Anhang) verdünnt und 10 Minuten auf 95 °C erhitzt. Danach konnten die Geltaschen mit 60 µl Probenlösung (entspricht 60 µg Protein) pro Spur geladen werden. Eine Tasche wurde zudem mit einem Größenmarker befüllt. Die Trennung erfolgte, indem eine Stromstärke von 40 mA pro Gel so lang an die Kammer angelegt wurde, bis die Bande beinahe das untere Ende des Gels erreichte (3-4 Stunden).

Im Anschluss erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran. Zu diesem Zweck wurde das Gel aus der Elektrophorese-Apparatur in eine Transferkassette überführt. Dabei wurde in der Kassette ein Transfersandwich geschichtet, welches von Kathode (-) zu Anode (+) aus den Lagen Schwamm, Filterpapier, Gel, Nitrozellulosemembran, Filterpapier und Schwamm bestand. Die Kassette wurde in die mit Transferpuffer gefüllte (siehe Anhang) Blottingkammer überführt und es wurde bei einer Temperatur von 4 °C für 16 Stunden ein Strom von 0,25 A angelegt (4 Ah). Die negativ geladenen Proteine wanderten nun in Richtung Anode in die Nitrozellulosemembran. Nach dem Transfer wurde diese mittels Ponceau-Rot (siehe Anhang) gefärbt und eingescannt.

Der Nachweis spezifischer Proteine auf der Membran erfolgte mit Hilfe primärer und sekundärer Antikörper. Die primären Antikörper waren spezifisch gegen phosphoryliertes Serin-16 (Ser-16), phosphoryliertes Threonin-17 (Thr-17) und als Beladungskontrolle gegen Calsequestrin gerichtet. Die sekundären Antikörper waren gegen die primären Antikörper gerichtet und an ein Enzym gekoppelt (alkalische Phosphatase; AP), welches die nachfolgende Farbreaktion ermöglichte und somit eine optische Darstellung der spezifischen Proteine erlaubte. Für den Nachweis wurde die Membran zuerst auf den zu erwartenden Bereich zugeschnitten und in TBST (siehe Anhang) gewaschen. Nach Blockierung mit 2 % BSA (Ser-16, Thr-17) bzw. mit 5 % Milchpulver (CSQ) (siehe

Anhang) wurde die Membran mit den primären Antikörpern anti-Ser16P-PLB, anti-Thr17P-PLB oder anti-CSQ-1 über Nacht bei 4 °C im Blockierungspuffer inkubiert. Am Folgetag konnte nach Waschen mit TBST die Inkubation mit den sekundären Antikörpern anti-rabbit-IgG erfolgen. Abschließend wurde die Membran erneut dreimal für 10 Minuten mit TBST und zweimal für 2 Minuten mit AP-Puffer (siehe Anhang) gespült und die Farbreaktion mit ECF durchgeführt. Hierfür wurde die ECF-Substrat-Lösung (siehe Anhang) 1:10 mit AP-Puffer verdünnt und die Membran mit 10 ml der Verdünnung für 5 Minuten dunkel inkubiert. Nach erneutem Spülen mit AP-Puffer wurde die Membran in einen Typhoon-Scanner überführt und die Fluoreszenz bei 532 nm mit der Software ImageQuant quantifiziert.

3.7. Datenanalyse

Zur Auswertung der Daten wurde Microsoft Excel und GraphPad Prism verwendet. Es handelt sich um Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Die statistische Signifikanz wurde je nach Fragestellung mithilfe von verbundenen und unverbundenen t-Test sowie Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von einem Bonferroni-Test betrachtet. Ein p-Wert kleiner 0,05 galt dabei als signifikant. Des Weiteren wurden EC_{50} -Werte berechnet. Zur Erstellung von Grafiken wurden GraphPad Prism und Microsoft PowerPoint genutzt.

4. Ergebnisse

4.1. Genotypisierung

Wie unter 3.2. beschrieben wurden der Genotyp aller Tiere vor der Verwendung für weitere Versuche mittels PCR und Gelelektrophorese festgestellt. Die verwendeten Primer waren dabei spezifisch für die DNA-Sequenz des humanen Histamin H₂-Rezeptors, wodurch die eindeutige Unterscheidung zwischen H₂-TG und WT möglich war. Das entstandene Produkt hatte eine Länge von 568 bp. Wenn bei dieser Größe eine Bande zu sehen war, konnte das Tier folglich als H₂-TG eingeordnet werden (siehe Abb. 3B). War bei 568 bp keine Bande zu sehen, musste es sich um WT handeln, da diese nicht über die gesuchte DNA-Sequenz verfügen.

4.2. Kontraktionsversuche

4.2.1. Histamin

In elektrisch stimulierten linken Vorhöfen erhöhte Histamin die Kontraktionskraft bei H₂-TG, jedoch nicht bei WT (repräsentative Aufnahmen in Abb. 6A). Die basale Kontraktionskraft betrug durchschnittlich $3,26 \pm 0,34$ mN bei H₂-TG und $3,13 \pm 0,22$ mN bei WT. Nach kumulativer Gabe von 1 μ M Histamin stieg die Kontraktionskraft bei H₂-TG konzentrationsabhängig bis auf $7,0 \pm 0,5$ mN (229 %) an. Bei WT war kein positiv inotroper Effekt festzustellen. Die Daten sind in Abbildung 6B dargestellt.

Des Weiteren wurde die Kontraktions- (t_1) und Relaxationszeit (t_2) (Abb. 6D) sowie die maximale Kontraktions- (dF/dt_{max}) und Relaxationsgeschwindigkeit (dF/dt_{min}) (Abb. 6E) untersucht. Dabei wurde eine Verkürzung der Kontraktionszeit von $14,1 \pm 0,34$ ms auf $12,7 \pm 0,15$ ms und der Relaxationszeit von $31,5 \pm 2,55$ ms auf $26,7 \pm 0,94$ ms bei H₂-TG festgestellt. Bei WT war dieser Effekt nicht vorhanden. Die Kontraktionsgeschwindigkeit stieg bei H₂-TG von $212 \pm 21,2$ mN/s auf $498 \pm 31,6$ mN/s, bei WT blieb sie unverändert. Auch bei der Relaxationsgeschwindigkeit war bei WT keine Steigerung durch Histamin zu sehen, während sie bei H₂-TG stieg ($-110 \pm 9,06$ mN/s auf $-257 \pm 15,3$ mN/s). Da die Relaxationsgeschwindigkeit der minimalen Geschwindigkeit der Spannungsentwicklung entspricht, ist eine stärkere Negativierung des Wertes als eine Beschleunigung der Relaxation zu verstehen.

Die spontan schlagenden rechten Vorhöfe unterschieden sich bereits in den Ausgangswerten in ihrer Schlagfrequenz. H₂-TG Vorhöfe schlugen mit $452 \pm 26,2$ bpm, während

WT Vorhöfe Frequenzen von $369 \pm 8,18$ bpm hatten. Bei WT war jedoch nach kumulativer Gabe von $1 \mu\text{M}$ Histamin keine Zunahme nachzuweisen. Die Schlagfrequenz von $\text{H}_2\text{-TG}$ stieg dagegen auf $580 \pm 24,7$ bpm (129 %) an (Abb. 6C).

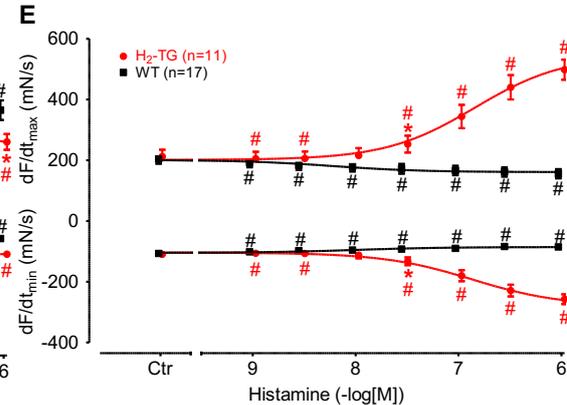
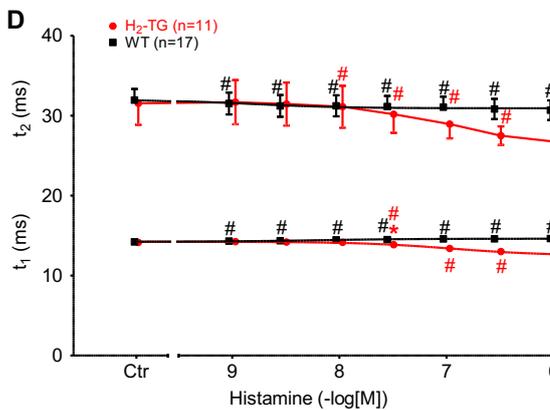
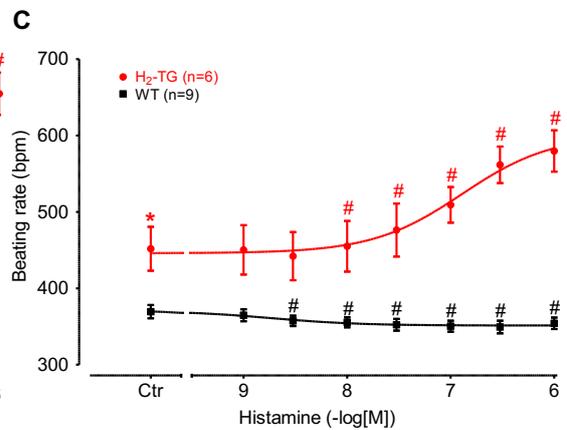
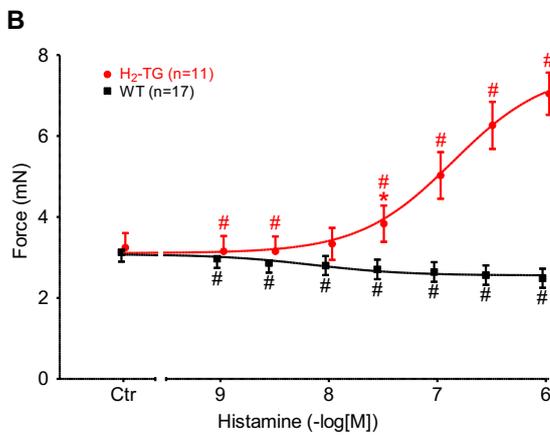
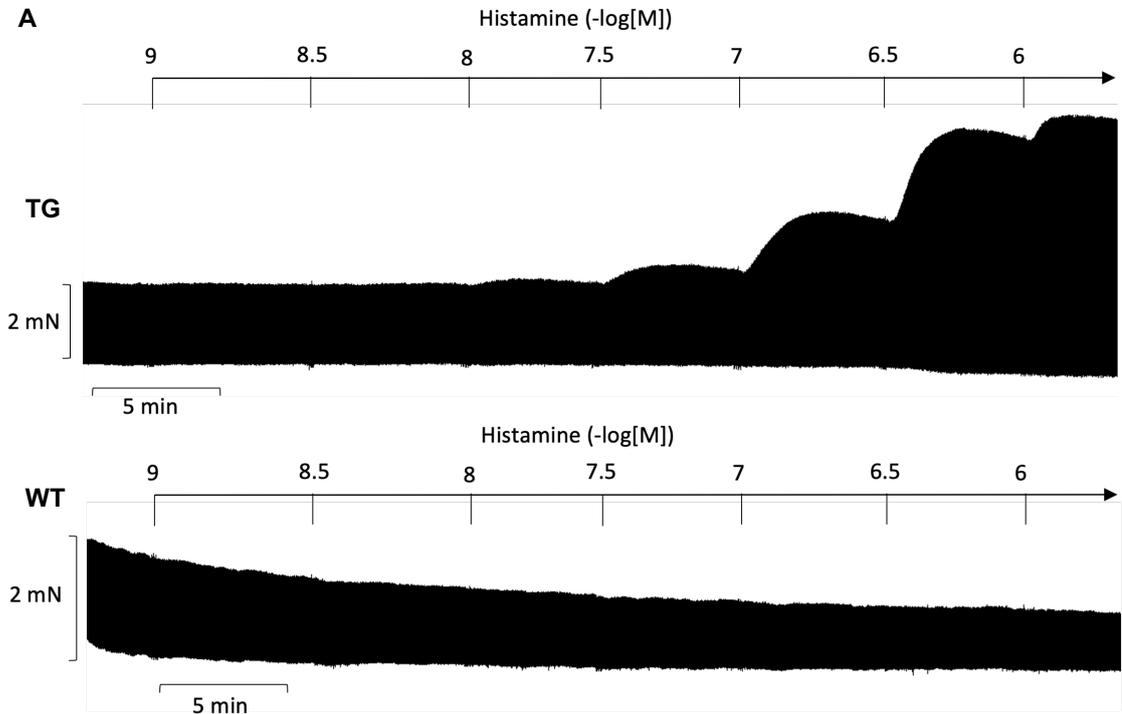
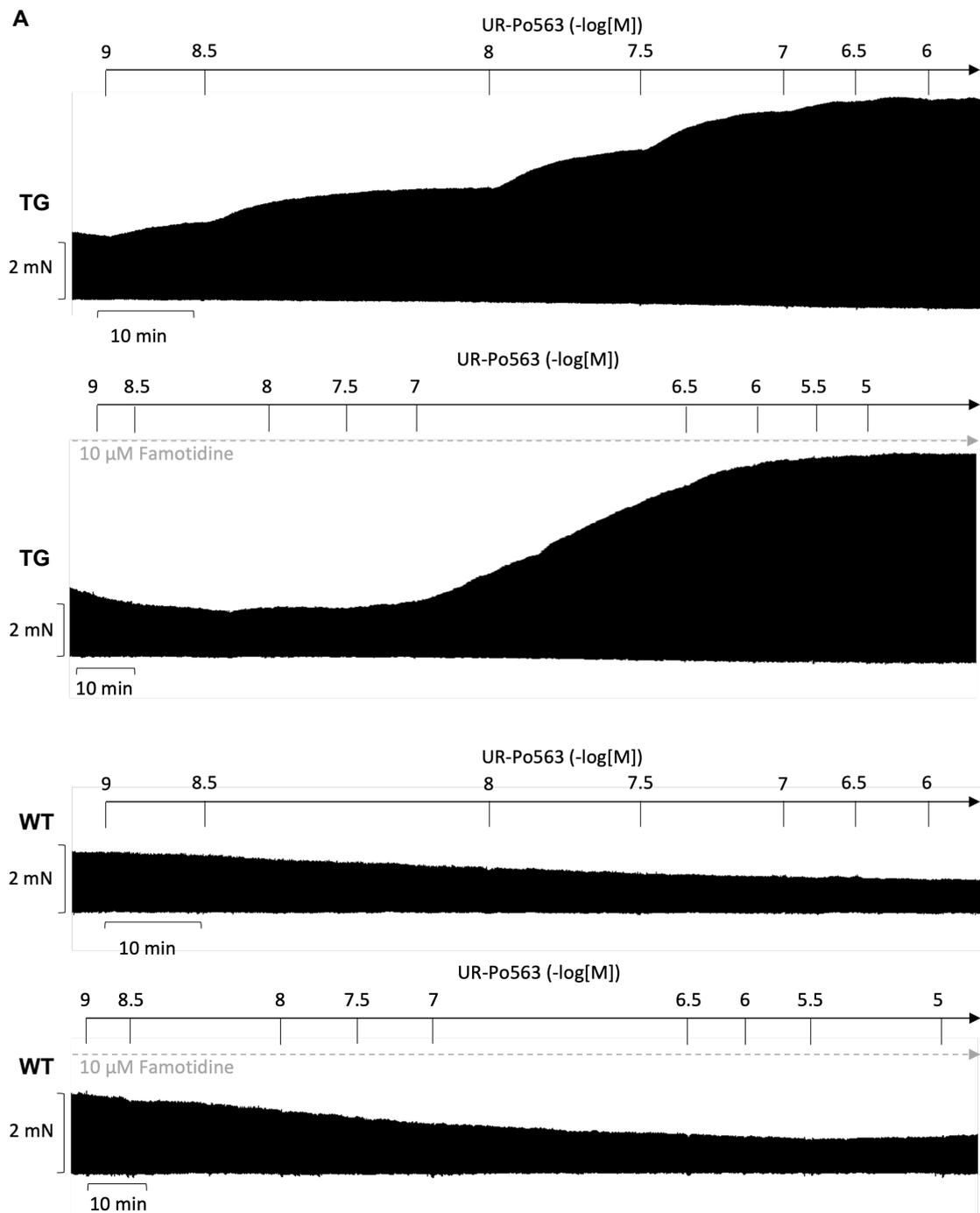


Abb. 6: Wirkung von Histamin auf isolierte rechte und linke Vorhöfe. **(A)** Repräsentatives Mechanogramm der Wirkung von Histamin in steigender Konzentration auf die Kontraktionskraft elektrisch stimulierter (1 Hz) linker Vorhöfe von H₂-TG im Vergleich zu WT. Die horizontale Achse gibt die Zeit an, die vertikale Achse die Kontraktionskraft (mN). Zu sehen ist ein deutlicher positiv inotroper Effekt bei H₂-TG, jedoch nicht bei WT. **(B)** Wirkung von Histamin auf die Kontraktionskraft (Ordinate in mN) der linken Vorhöfe von H₂-TG (n=11) und WT (n=17). **(C)** Wirkung von Histamin auf die Schlagfrequenz (in bpm, Ordinate) spontan schlagender rechter Vorhöfe von H₂-TG (n=6) und WT (n=9). **(D)** Wirkung von Histamin auf die Kontraktions- (t₁) und Relaxationszeit (t₂) (in ms, vertikale Achse) der linken Vorhöfe von H₂-TG (n=11) und WT (n=17). **(E)** Wirkung von Histamin auf Kontraktions- (dF/dt_{max}) und Relaxationsgeschwindigkeit (dF/dt_{min}) in mN/s (Ordinate) linker Vorhöfe von H₂-TG (n=11) und WT (n=17). *Erstes p < 0,05 vs. WT. #p < 0,05 vs. Ctr. Abszisse: negativ logarithmische Konzentration von Histamin in Mol (M). Quelle: eigene Darstellung

4.2.2. UR-Po563 bei Maus und Mensch

Analog zu Histamin ist in den Einzelmechanogrammen der linken Vorhöfe (Abb. 7A) unter kumulativer Gabe von UR-Po563 ein eindeutiger positiv inotroper Effekt bei H₂-TG, nicht aber bei WT, zu sehen. Auch ist eine Rechtsverschiebung der Wirkung – also ein Eintreten dieser erst bei höheren Konzentrationen – bei H₂-TG durch vorherige Gabe des H₂-Rezeptor-Antagonisten Famotidin zu erkennen. Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen wider, die in den Abbildungen 7B bis H zusammengefasst sind. Die Kontraktionskraft von H₂-TG stieg von $1,84 \pm 0,53$ mN Ausgangskraft auf $6,54 \pm 0,36$ mN (607 %) an (Abb. 7B und 7C). Der Effekt war konzentrationsabhängig mit einem pEC₅₀-Wert von $8,27 \pm 0,18$ (Übersicht der pEC₅₀-Werte in Tab. 1). Der pEC₅₀-Wert, welcher als Maß für die Potenz eines Pharmakons dient, wurde als negativ dekadischer Logarithmus des EC₅₀-Wertes berechnet. Der EC₅₀-Wert beschreibt dabei die Konzentration eines Wirkstoffes, bei der 50 % der maximalen Wirkung erreicht werden. In Anwesenheit von Famotidin wurden ähnlich hohe Werte erreicht, allerdings erst bei höheren Konzentrationen von UR-Po563. Während bei alleiniger UR-Po563-Gabe bereits bei Konzentrationen von 10⁻⁹ M ein Anstieg der Kraft im Mechanogramm zu erkennen war (erstes p < 0,05 vs. WT bei 3x10⁻⁹ M), sah man dies in Anwesenheit von Famotidin erst bei 10⁻⁷ M (erstes p < 0,05 vs. WT bei 3x10⁻⁶). Es wurde eine Verkürzung der Kontraktionszeit (Abb. 7E) bei H₂-TG festgestellt und es war eine Tendenz zur Verkürzung der Relaxationszeit zu sehen (Abb. 7F). Wie durch Histamin stiegen auch durch UR-Po563 bei H₂-TG die Kontraktions- (Abb. 7G) und die Relaxationsgeschwindigkeit an (Abb. 7H). Durch Famotidin konnten diese Effekte gehemmt werden. WT zeigte keine positiv inotrope Reaktion auf UR-Po563.

In den rechten Vorhöfen hatte UR-Po563 einen positiv chronotropen Effekt bei H₂-TG (435 ± 8,43 bpm auf 618 ± 7,36 bpm, entspricht 142 %) und bei sehr hohen Konzentrationen auch bei WT. Durch Famotidin wurde dieser bei H₂-TG blockiert (Abb. 7D).



4. Ergebnisse

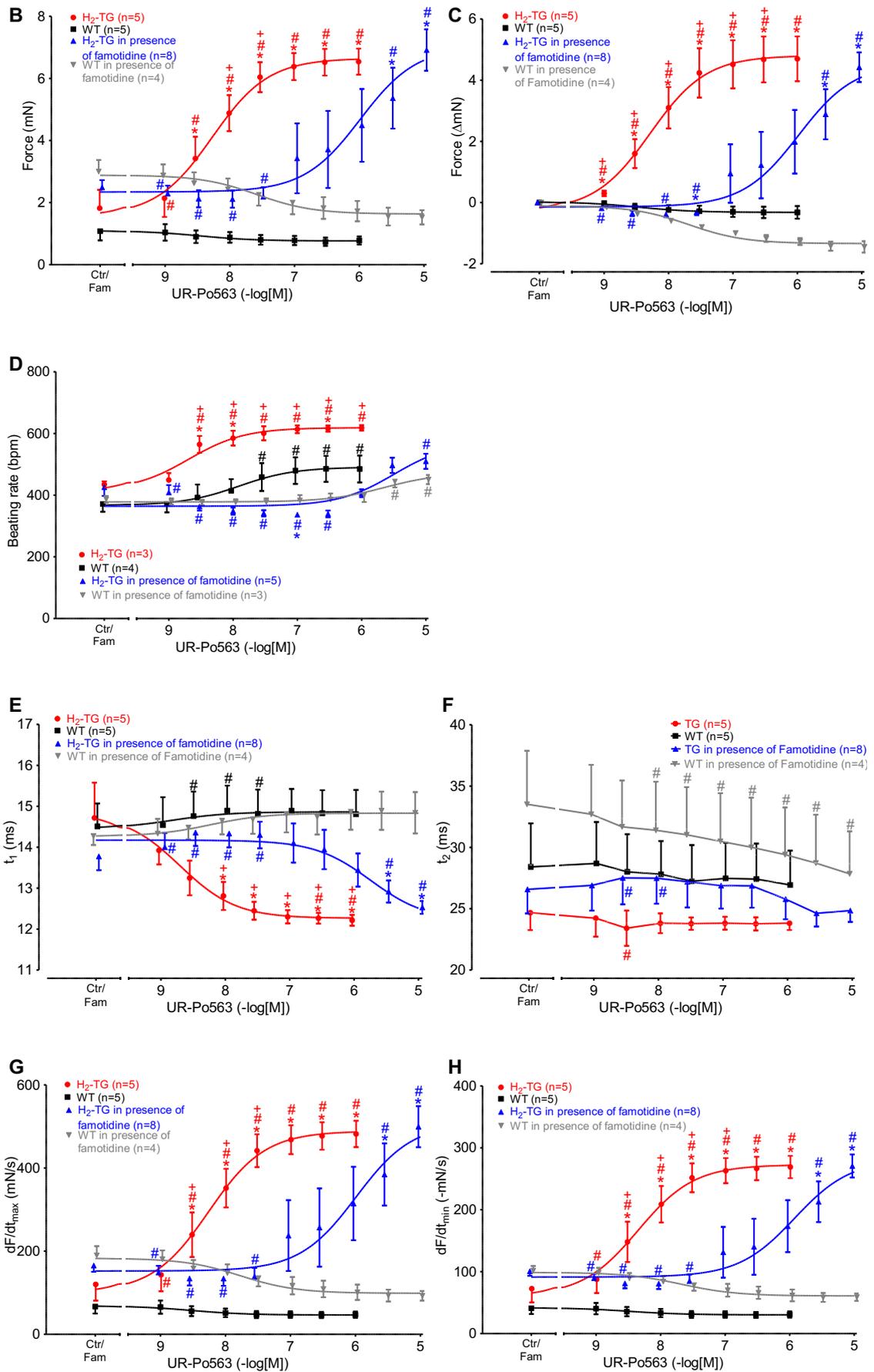


Abb. 7: Wirkung von UR-Po563 auf isolierte linke und rechte Vorhöfe. **(A)** Repräsentatives Mechanogramm der Wirkung von UR-Po563 in steigender Konzentration auf die Kontraktionskraft elektrisch stimulierter (1 Hz) linker Vorhöfe von H₂-TG im Vergleich zu WT einzeln und in Anwesenheit von Famotidin. Die horizontale Achse gibt die Zeit an, die vertikale Achse die Kontraktionskraft (mN). **(B)** Wirkung von UR-Po563 auf die Kontraktionskraft (mN, Ordinate) der linken Vorhöfe von H₂-TG (n=5) und WT (n=5) im Vergleich zu H₂-TG (n=8) und WT (n=4) in Anwesenheit von Famotidin. **(C)** Wirkung von UR-Po563 auf die Zunahme der Kontraktionskraft ausgehend von Kontrolle (Ctr) bzw. Famotidin (Fam) (Ordinate in mN) der linken Vorhöfe von H₂-TG (n=5, Ctr=1,84 ± 0,53 mN) und WT (n=5, Ctr=1,10 ± 0,26 mN) im Vergleich zu H₂-TG (n=8, Fam=2,48 ± 0,22 mN) und WT (n=4, Fam=3,00 ± 0,33 mN) in Anwesenheit von Famotidin. **(D)** Wirkung von UR-Po563 auf die Schlagfrequenz (in bpm, Ordinate) spontan schlagender rechter Vorhöfe von H₂-TG (n=3) und WT (n=4) im Vergleich zu H₂-TG (n=5) und WT (n=3) in Anwesenheit von Famotidin. **(E)** Wirkung von UR-Po563 auf die Kontraktionszeit (t₁) (in ms, vertikale Achse) der linken Vorhöfe von H₂-TG (n=5) und WT (n=5) im Vergleich zu H₂-TG (n=8) und WT (n=4) in Anwesenheit von Famotidin. **(F)** Wirkung von UR-Po563 auf die Relaxationszeit (t₂) (in ms, vertikale Achse) der linken Vorhöfe von H₂-TG (n=5) und WT (n=5) im Vergleich zu H₂-TG (n=8) und WT (n=4) in Anwesenheit von Famotidin. **(G)** Wirkung von UR-Po563 auf die Kontraktionsgeschwindigkeit (dF/dt_{max}) in mN/s (Ordinate) linker Vorhöfe von H₂-TG (n=5) und WT (n=5) im Vergleich zu H₂-TG (n=8) und WT (n=4) in Anwesenheit von Famotidin. **(H)** Wirkung von UR-Po563 auf die Relaxationsgeschwindigkeit (dF/dt_{min}) in mN/s (Ordinate) linker Vorhöfe von H₂-TG (n=5) und WT (n=5) im Vergleich zu H₂-TG (n=8) und WT (n=4) in Anwesenheit von Famotidin. *p < 0,05 vs. WT. #p < 0,05 vs. Ctr. *p < 0,05 vs. H₂-TG in Anwesenheit von Famotidin. Abszisse: negativ logarithmische Konzentration von UR-Po563 in Mol (M). Quelle: eigene Darstellung

Die Kontraktionsversuche mit menschlichen Vorhofpräparaten dienten dazu, die Wirkung von UR-Po563 aus dem Tiermodell besser auf das menschliche Herz übertragen zu können. Auch hier konnte ein positiv inotroper Effekt von UR-Po563 festgestellt werden. Ein exemplarisches Mechanogramm ist in Abbildung 8A zu sehen. Die Kontraktionskraft stieg von $6,53 \pm 1,36$ mN auf $7,67 \pm 1,23$ mN (125 %) an (Abb. 8B). Es konnte eine Verkürzung der Kontraktionszeit (Abb. 8C) gezeigt werden. Bei der Relaxationszeit war die Effektstärke zu gering, es war jedoch eine Tendenz zur Verkürzung zu sehen (Abb. 8D). Die Kontraktions- (Abb. 8E) und die Relaxationsgeschwindigkeit stiegen unter UR-Po563 (Abb. 8F).

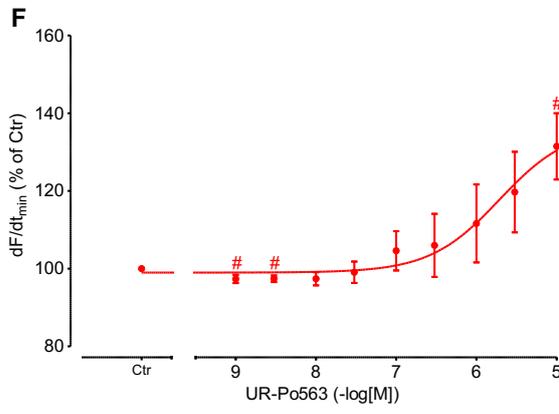
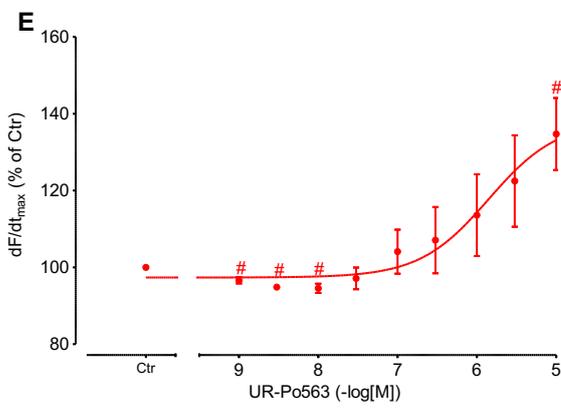
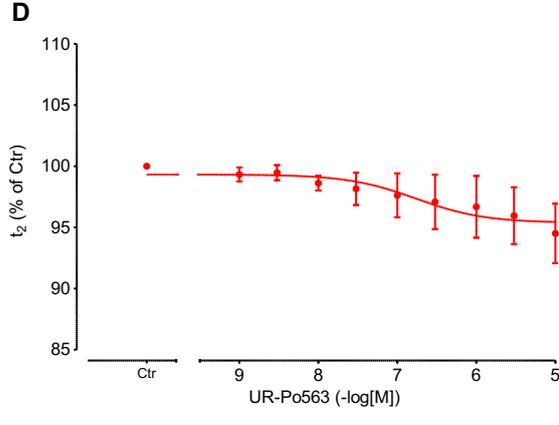
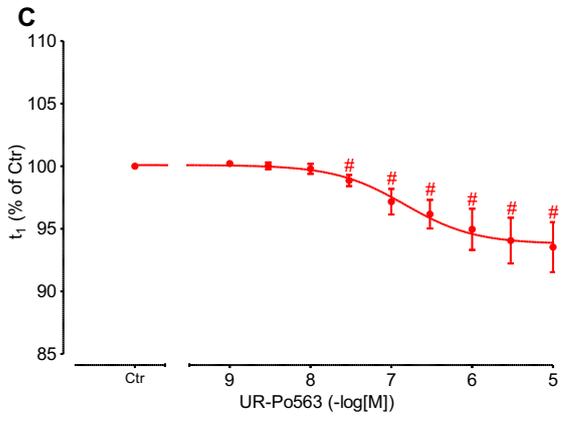
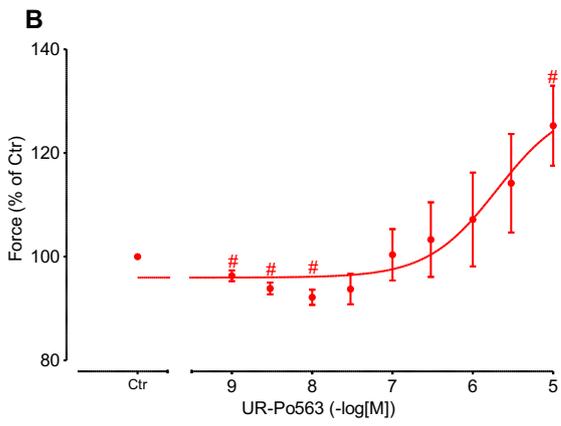
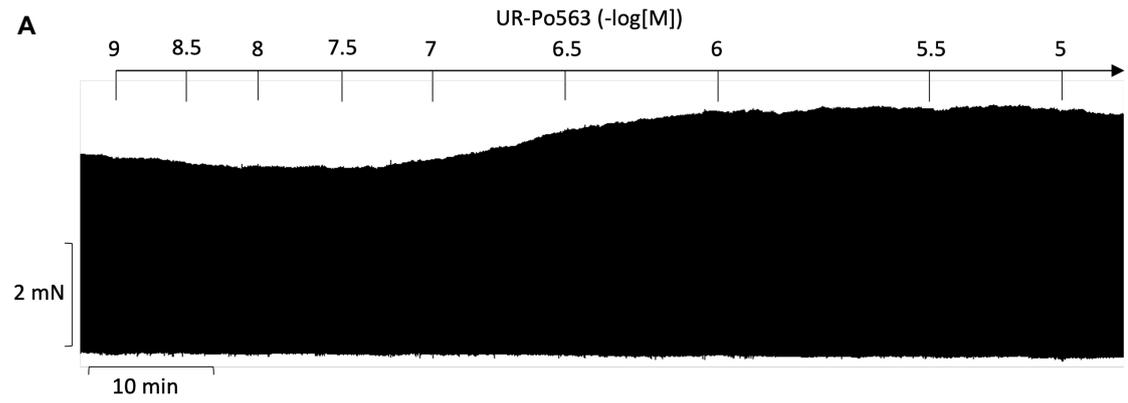
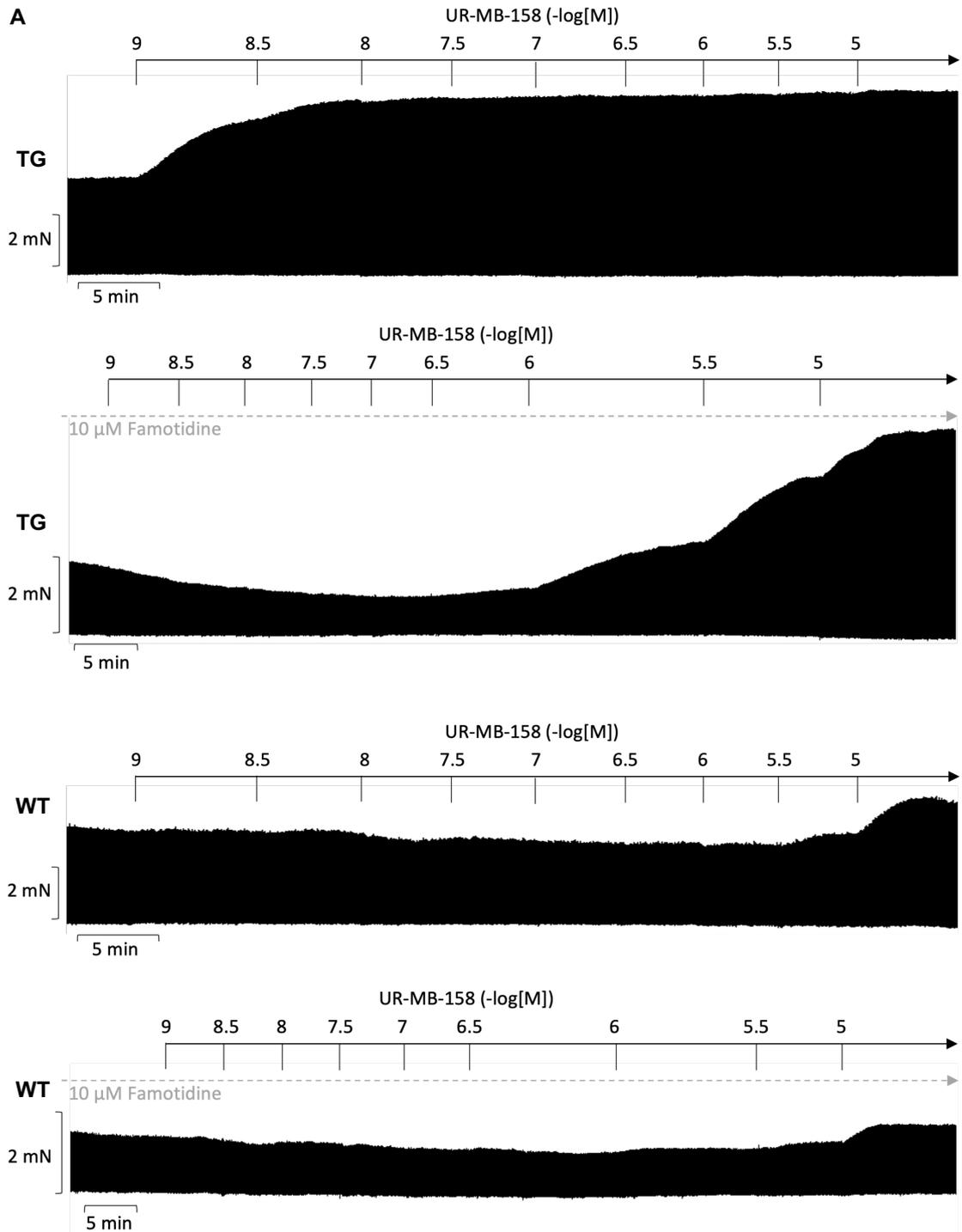


Abb. 8: Wirkung von UR-Po563 auf Präparate menschlicher Vorhöfe. **(A)** Repräsentatives Mechanogramm der Wirkung von UR-Po563 in steigender Konzentration auf die Kontraktionskraft von elektrisch stimulierten (1 Hz) menschlichen Vorhofpräparaten. Die horizontale Achse gibt die Zeit an, die vertikale Achse die Kontraktionskraft (mN). **(B)** Wirkung von UR-Po563 auf die relative Kontraktionskraft (Ordinate in % von Kontrolle (Ctr)) menschlicher Vorhofpräparate (n=7, Ctr=6,53 ± 1,36 mN). **(C)** Wirkung von UR-Po563 auf die relative Kontraktionszeit (t_1) (Ordinate in % von Ctr) menschlicher Vorhofpräparate (n=7, Ctr=49,1 ± 1,97 ms). **(D)** Wirkung von UR-Po563 auf die relative Relaxationszeit (t_2) (in % von Ctr, Ordinate) menschlicher Vorhofpräparate (n=7, Ctr=111 ± 6,66 ms). **(E)** Wirkung von UR-Po563 auf die relative Kontraktionsgeschwindigkeit (dF/dt_{max}) (in % von Ctr, vertikale Achse) menschlicher Vorhofpräparate (n=7, Ctr=129 ± 29,3 mN/s). **(F)** Wirkung von UR-Po563 auf die relative Relaxationsgeschwindigkeit (dF/dt_{min}) (Ordinate in % von Ctr) menschlicher Vorhofpräparate (n=7, Ctr=66,4 ± 8,42 mN/s). #p < 0,05 vs. Ctr. Abszisse: negativ logarithmische Konzentration von UR-Po563 in Mol (M). Quelle: eigene Darstellung

4.2.3. UR-MB-158

In Abbildung 9A ist der positiv inotrope Effekt von UR-MB-158 in den elektrisch gereizten linken Vorhöfen von H₂-TG zu sehen. Dieser ließ sich ebenso durch Famotidin antagonisieren, wie bereits bei UR-Po563 gezeigt wurde. Es zeigte sich auch ein leichter Anstieg der Kontraktionskraft von WT bei hohen Konzentrationen von UR-MB-158. Dieser war jedoch deutlich geringer als bei H₂-TG. Die Kraftentwicklung der linken Vorhöfe in Abhängigkeit von der Konzentration ist in den Abbildungen 9B und C dargestellt. Mit einem pEC₅₀-Wert von 9,86 ± 0,27 führte UR-MB-158 in kumulativer Applikation bis 10⁻⁵ M zum Anstieg der Kraft von H₂-TG von 4,17 ± 0,51 mN auf 7,63 ± 0,58 mN (184 %). Damit übereinstimmend war eine Steigerung der Kontraktions- (Abb. 9G) und der Relaxationsgeschwindigkeit (Abb. 9H) bei den linken Vorhöfen von H₂-TG festzustellen. Außerdem verkürzte sich die Kontraktionszeit (Abb. 9E). Bei all diesen Effekten fand in Anwesenheit von Famotidin eine Verschiebung zu höheren Konzentrationen UR-MB-158 statt. Es zeigte sich eine Tendenz zur Verkürzung der Relaxationszeit bei alleiniger Gabe von UR-MB-158 bei H₂-TG. In Anwesenheit von Famotidin verlängerte sich die Relaxationszeit von H₂-TG sogar (Abb. 9F). Bis auf eine Verkürzung der Kontraktionszeit- und Relaxationszeit waren diese Wirkungen bei WT nicht zu finden.

Am rechten Vorhof zeigte UR-MB-158 eine Tendenz zu einem positiv chronotropen Effekt in H₂-TG (408 ± 23,7 bpm auf 588 ± 50,7 bpm, entspricht 121 %) und WT, welcher durch Famotidin nach rechts verschoben wurde.



4. Ergebnisse

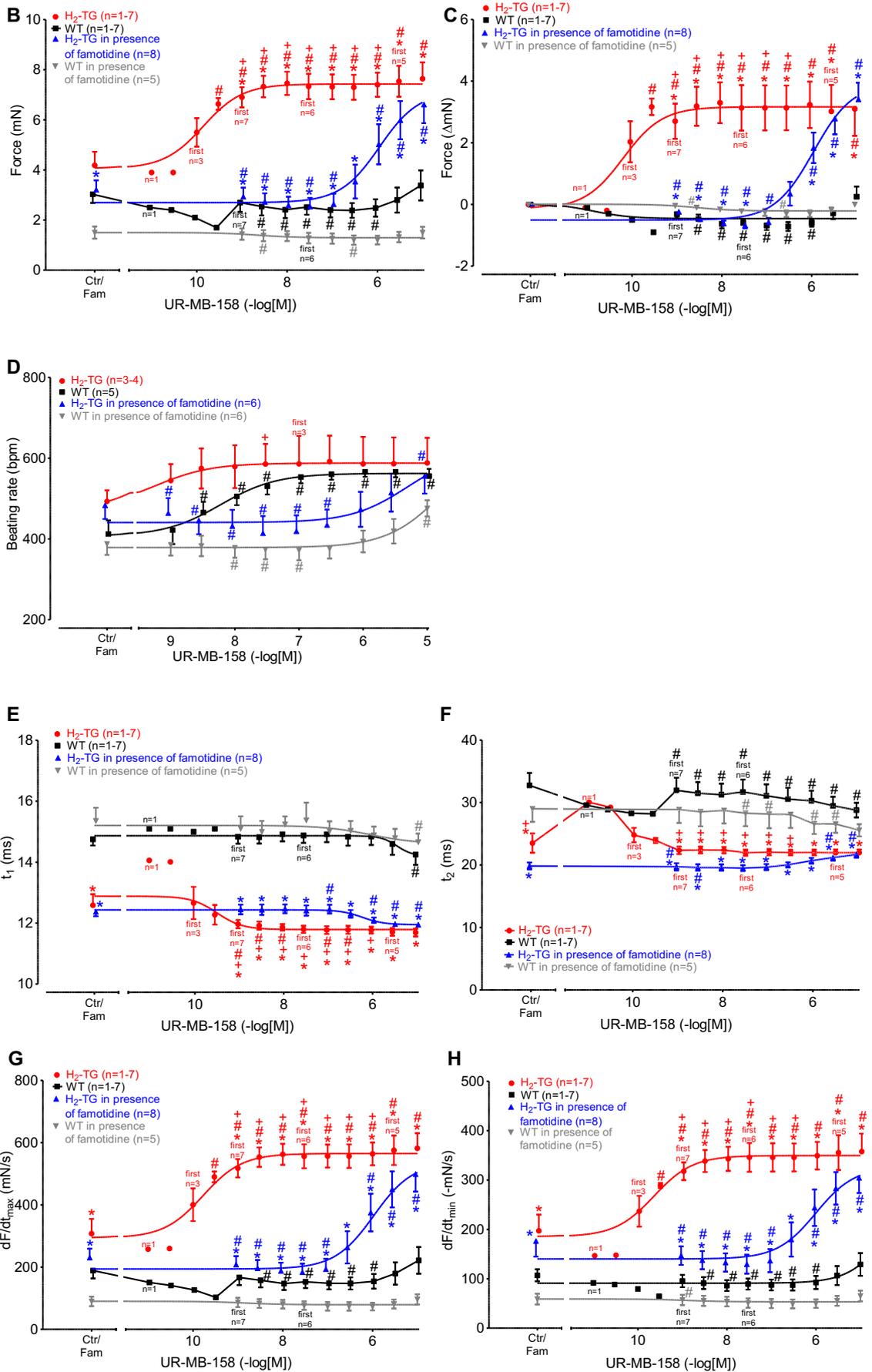


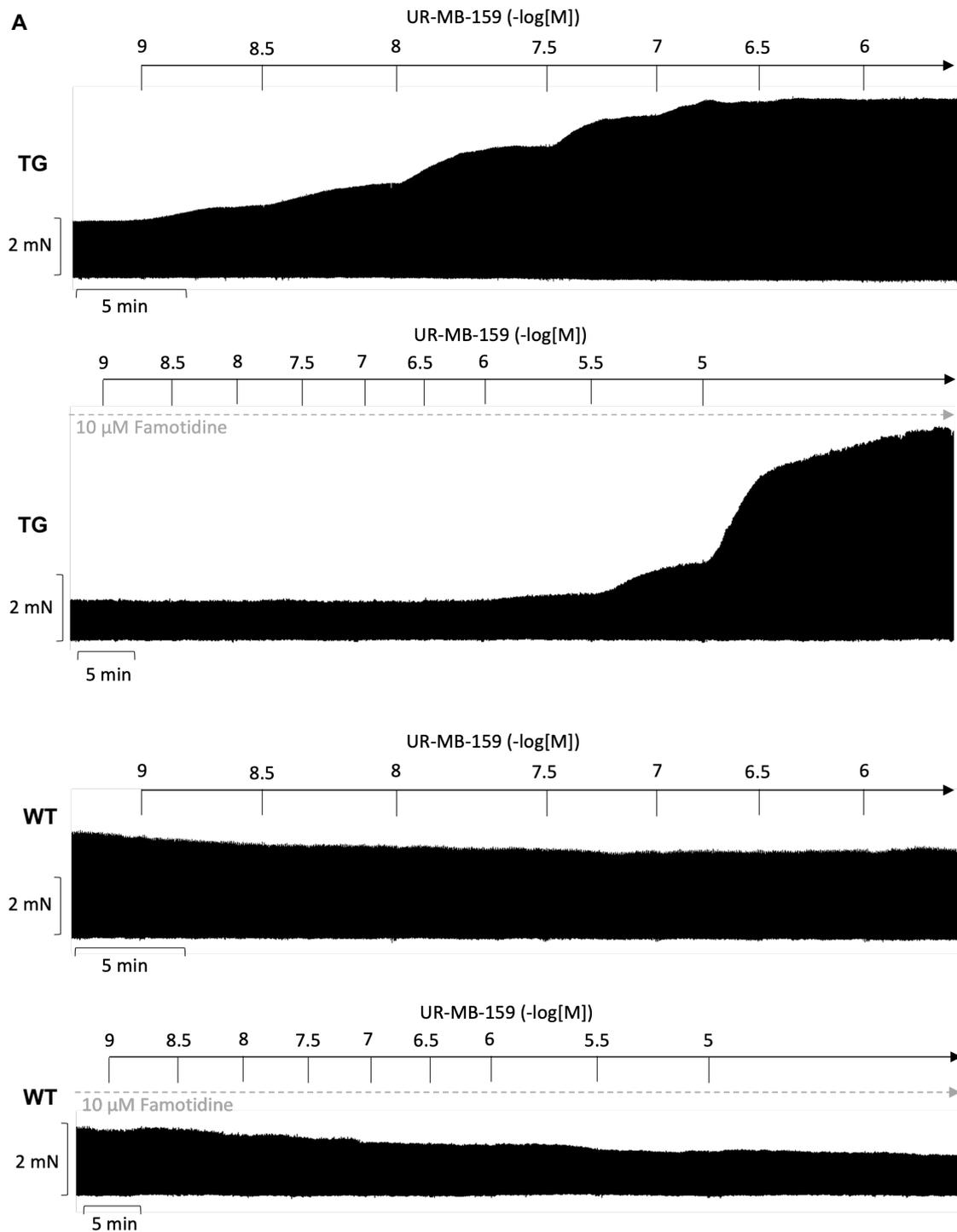
Abb. 9: Wirkung von UR-MB-158 auf isolierte rechte und linke Vorhöfe. **(A)** Repräsentatives Mechanogramm der Wirkung von UR-MB-158 in steigender Konzentration auf die Kontraktionskraft elektrisch stimulierter (1 Hz) linker Vorhöfe von H₂-TG im Vergleich zu WT allein und in Anwesenheit von Famotidin. Die horizontale Achse gibt die Zeit an (min), die vertikale Achse die Kontraktionskraft (mN). **(B)** Wirkung von UR-MB-158 auf die Kontraktionskraft (mN, Ordinate) der linken Vorhöfe von H₂-TG (n=1-7) und WT (n=1-7) im Vergleich zu H₂-TG (n=8) und WT (n=5) in Anwesenheit von Famotidin. **(C)** Wirkung von UR-MB-158 auf die Zunahme der Kontraktionskraft ausgehend von Kontrolle (Ctr) bzw. Famotidin (Fam) (Ordinate in mN) der linken Vorhöfe von H₂-TG (n=1-7, Ctr=4,17 ± 0,51 mN) und WT (n=1-7, Ctr=3,03 ± 0,32 mN) im Vergleich zu H₂-TG (n=8, Fam=3,19 ± 0,35 mN) und WT (n=5, Fam=1,50 ± 0,22 mN) in Anwesenheit von Famotidin. **(D)** Wirkung von UR-MB-158 auf die Schlagfrequenz (in bpm, Ordinate) spontan schlagender rechter Vorhöfe von H₂-TG (n=3-4) und WT (n=5) im Vergleich zu H₂-TG (n=6) und WT (n=6) in Anwesenheit von Famotidin. **(E)** Wirkung von UR-MB-158 auf die Kontraktionszeit (t₁) (in ms, vertikale Achse) der linken Vorhöfe von H₂-TG (n=1-7) und WT (n=1-7) im Vergleich zu H₂-TG (n=8) und WT (n=5) in Anwesenheit von Famotidin. **(F)** Wirkung von UR-MB-158 auf die Relaxationszeit (t₂) (in ms, vertikale Achse) der linken Vorhöfe von H₂-TG (n=1-7) und WT (n=1-7) im Vergleich zu H₂-TG (n=8) und WT (n=5) in Anwesenheit von Famotidin. **(G)** Wirkung von UR-MB-158 auf die Kontraktionsgeschwindigkeit (dF/dt_{max}) in mN/s (Ordinate) linker Vorhöfe von H₂-TG (n=1-7) und WT (n=1-7) im Vergleich zu H₂-TG (n=8) und WT (n=5) in Anwesenheit von Famotidin. **(H)** Wirkung von UR-MB-158 auf die Relaxationsgeschwindigkeit (dF/dt_{min}) in mN/s (Ordinate) linker Vorhöfe von H₂-TG (n=1-7) und WT (n=1-7) im Vergleich zu H₂-TG (n=8) und WT (n=5) in Anwesenheit von Famotidin. *p < 0,05 vs. WT. #p < 0,05 vs. Ctr. †p < 0,05 vs. H₂-TG in Anwesenheit von Famotidin. Abszisse: negativ logarithmische Konzentration von UR-MB-158 in Mol (M). Quelle: eigene Darstellung

4.2.4. UR-MB-159

Genauso wie UR-Po563 und UR-MB-158 führte auch UR-MB-159 zu einer – durch Famotidin hemmbaren – Steigerung der Kontraktionskraft im linken Vorhof von H₂-TG, nicht aber von WT (Einzelmechanogramm in Abb. 10A). Die Kontraktionskraft von H₂-TG konnte durch kumulative Gabe von 10⁻⁶ M UR-MB-159 von 3,38 ± 0,65 mN auf 6,03 ± 0,55 mN (219 %) gesteigert werden (Abb. 10B und C). Die Wirkung war mit einem pEC₅₀-Wert von 8,21 ± 0,42 konzentrationsabhängig und wurde durch Famotidin nach rechts verschoben. Außerdem konnte eine Verkürzung der Kontraktionszeit bei H₂-TG (Abb. 10E) beobachtet werden. Die Relaxationszeit verlängerte sich bei H₂-TG in Anwesenheit von Famotidin, bei alleiniger UR-MB-159-Gabe war keine Veränderung zu beobachten (Abb. 10F). Bei H₂-TG stiegen die Kontraktions- (Abb. 10G) und die Relaxationsgeschwindigkeit (Abb. 10H); durch Famotidin ließ sich die Wirkung zu höheren Konzentrationen verschieben. WT zeigte dagegen eine Abnahme der Kontraktionskraft, der Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit und – bei alleiniger UR-MB-159-Gabe – der Relaxationszeit.

An den spontan schlagenden rechten Vorhöfen zeigte sich eine Tendenz zu Erhöhung der Herzfrequenz nach kumulativer Gabe von 10⁻⁶ M UR-MB-159 bei H₂-TG

($543 \pm 37,7$ bpm auf $625 \pm 7,34$ bpm, entspricht 118 %) und bei WT. Durch Famotidin konnte dieser Effekt gehemmt werden (Abb.10D).



4. Ergebnisse

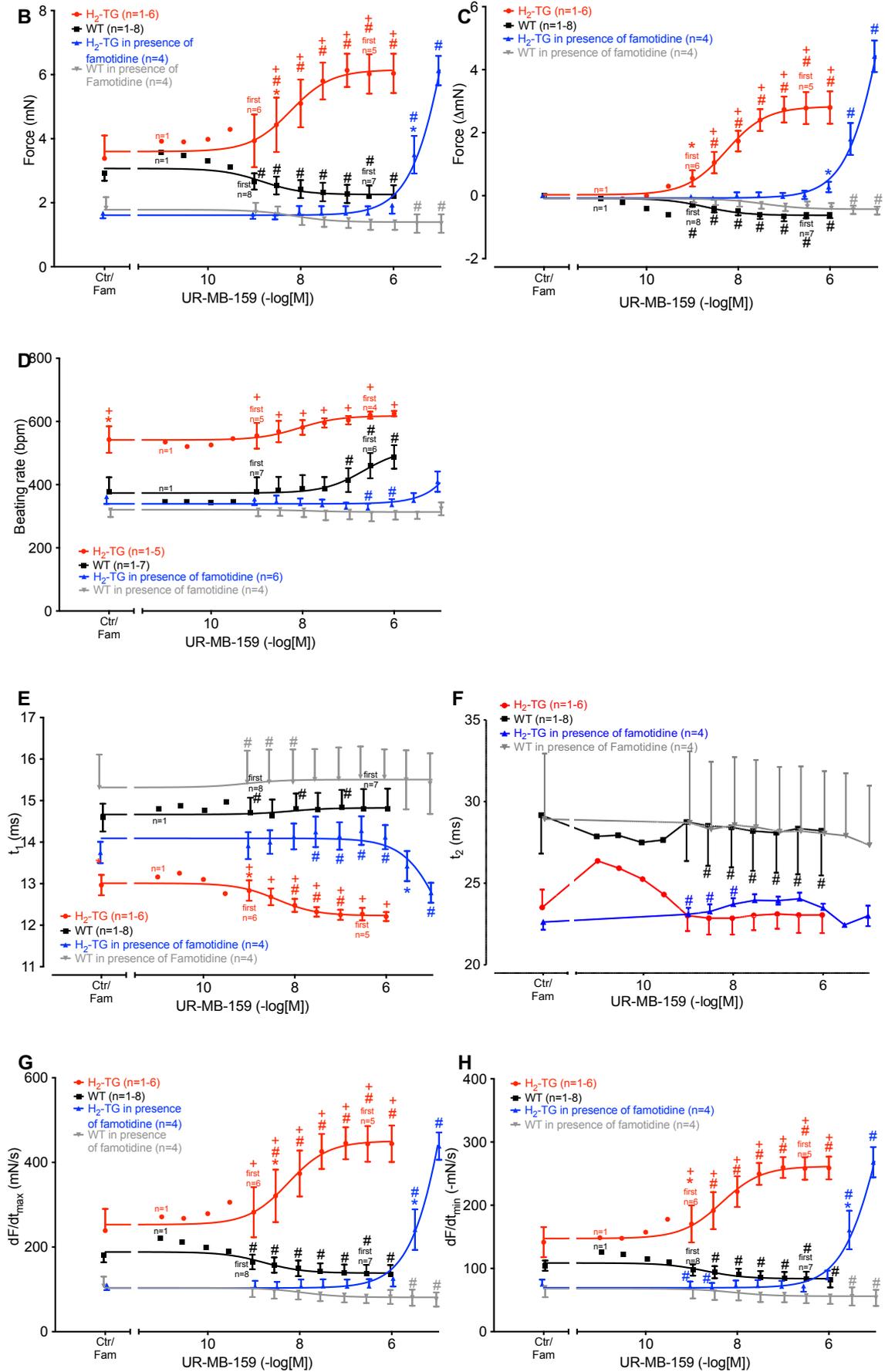


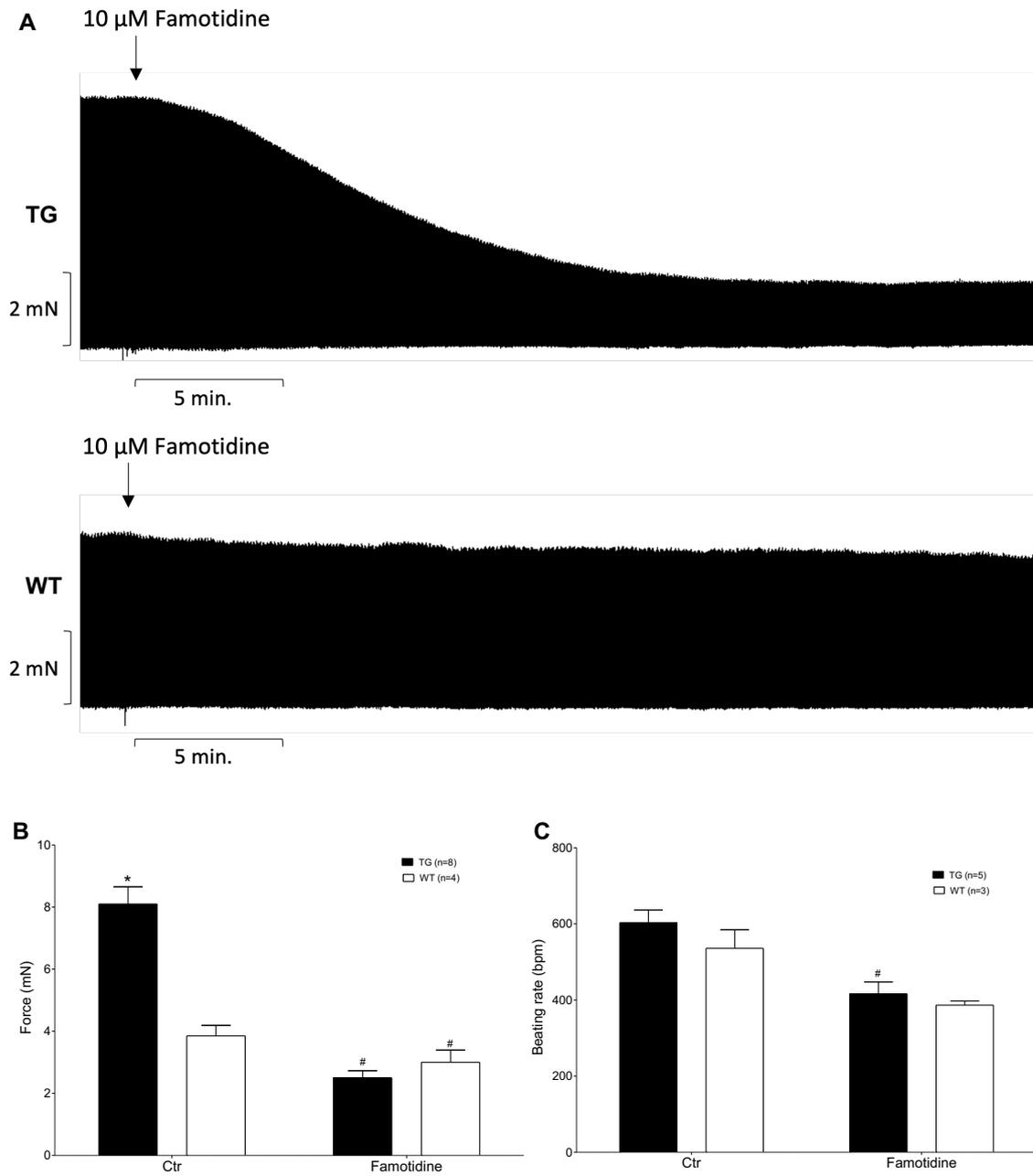
Abb. 10: Wirkung von UR-MB-159 auf isolierte rechte und linke Vorhöfe. **(A)** Repräsentatives Mechanogramm der Wirkung von UR-MB-159 in steigender Konzentration auf die Kontraktionskraft elektrisch stimulierter (1 Hz) linker Vorhöfe von H₂-TG im Vergleich zu WT allein und in Anwesenheit von Famotidin. Die horizontale Achse gibt die Zeit an (min), die vertikale Achse die Kontraktionskraft (mN). **(B)** Wirkung von UR-MB-159 auf die Kontraktionskraft (mN, Ordinate) der linken Vorhöfe von H₂-TG (n=1-6) und WT (n=1-8) im Vergleich zu H₂-TG (n=4) und WT (n=4) in Anwesenheit von Famotidin. **(C)** Wirkung von UR-MB-159 auf die Zunahme der Kontraktionskraft ausgehend von Kontrolle (Ctr) bzw. Famotidin (Fam) (Ordinate in mN) der linken Vorhöfe von H₂-TG (n=1-6, Ctr=3,38 ± 0,65 mN) und WT (n=1-8, Ctr=2,93 ± 0,24 mN) im Vergleich zu H₂-TG (n=4, Fam=1,68 ± 0,15 mN) und WT (n=4, Fam=1,80 ± 0,30 mN) in Anwesenheit von Famotidin. **(D)** Wirkung von UR-MB-159 auf die Schlagfrequenz (in bpm, Ordinate) spontan schlagender rechter Vorhöfe von H₂-TG (n=1-5) und WT (n=1-7) im Vergleich zu H₂-TG (n=6) und WT (n=4) in Anwesenheit von Famotidin. **(E)** Wirkung von UR-MB-159 auf die Kontraktionszeit (t₁) (in ms, vertikale Achse) der linken Vorhöfe von H₂-TG (n=1-6) und WT (n=1-8) im Vergleich zu H₂-TG (n=4) und WT (n=4) in Anwesenheit von Famotidin. **(F)** Wirkung von UR-MB-159 auf die Relaxationszeit (t₂) (in ms, vertikale Achse) der linken Vorhöfe von H₂-TG (n=1-6) und WT (n=1-8) im Vergleich zu H₂-TG (n=4) und WT (n=4) in Anwesenheit von Famotidin. **(G)** Wirkung von UR-MB-159 auf die Kontraktionsgeschwindigkeit (dF/dt_{max}) in mN/s (Ordinate) linker Vorhöfe von H₂-TG (n=1-6) und WT (n=1-8) im Vergleich zu H₂-TG (n=4) und WT (n=4) in Anwesenheit von Famotidin. **(H)** Wirkung von UR-MB-159 auf die Relaxationsgeschwindigkeit (dF/dt_{min}) in mN/s (Ordinate) linker Vorhöfe von H₂-TG (n=1-6) und WT (n=1-8) im Vergleich zu H₂-TG (n=4) und WT (n=4) in Anwesenheit von Famotidin. *Erstes p < 0,05 vs. WT. #p < 0,05 vs. Ctr. *p < 0,05 vs. H₂-TG in Anwesenheit von Famotidin. Abszisse: negativ logarithmische Konzentration von UR-MB-159 in Mol (M). Quelle: eigene Darstellung

4.2.5. Famotidin

Zum besseren Verständnis der Wirkung von Famotidin wurde in den Antagonistenversuchen auch dessen isolierter Effekt auf die Ausgangslage von H₂-TG und WT genauer untersucht und die Ergebnisse in Abbildung 11A bis G dargestellt. Bereits in der repräsentativen Aufnahme (Abb. 11A) ist ein starker negativ inotroper Effekt von Famotidin auf die Kontraktionskraft des linken Vorhofs von H₂-TG und etwas weniger stark bei WT zu erkennen. Die Daten in Abbildung 11B bestätigen dies: Die Kontraktionskraft von H₂-TG fiel von 8,10 ± 0,52 mN auf 2,48 ± 0,21 mN (31 %) nach 30-minütiger Inkubation mit Famotidin ab. Bei WT fiel die Kontraktionskraft von 3,85 ± 0,29 mN auf 2,99 ± 0,33 mN (77 %). Die Kontraktions- (Abb. 11F) und die Relaxationsgeschwindigkeit verringerten sich (Abb. 11G) bei H₂-TG und WT gleichermaßen. Ebenso stieg die Kontraktionszeit sowohl bei H₂-TG als auch bei WT (Abb. 11D). Die Relaxationszeit veränderte sich bei H₂-TG nicht merklich, während sie bei WT kürzer wurde (Abb. 11E).

An den rechten Vorhöfen konnte ein negativ chronotroper Effekt von Famotidin auf H₂-TG nachgewiesen werden (Abb. 11C). Die Schlagfrequenz fiel von 603 ± 30,1 bpm

auf $416 \pm 27,7$ bpm (69 %). Die Abnahme der Schlagfrequenz bei WT war nicht signifikant.



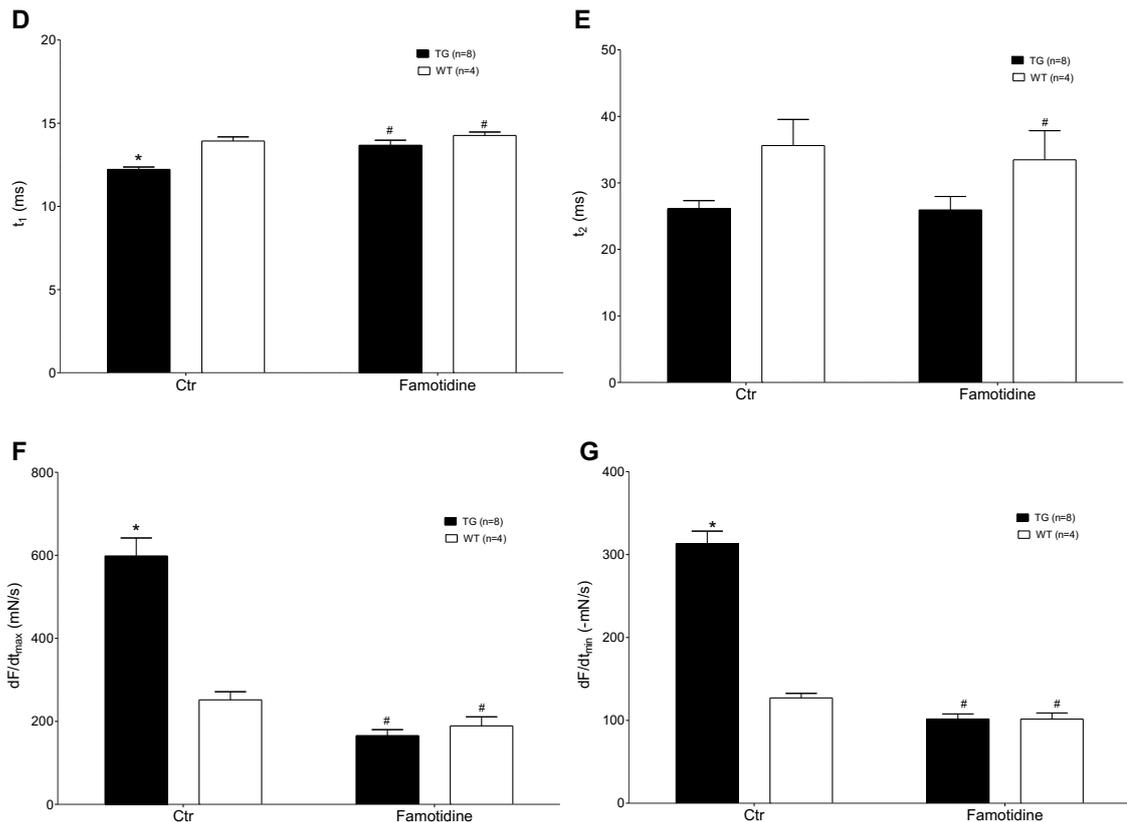


Abb. 11: Wirkung von 10 μ M Famotidin auf isolierte linke und rechte Vorhöfe. **(A)** Repräsentatives Mechanogramm der Wirkung von 10 μ M Famotidin auf die Kontraktionskraft elektrisch stimulierter (1 Hz) linker Vorhöfe von H₂-TG im Vergleich zu WT. Die horizontale Achse gibt die Zeit an (min), die vertikale Achse die Kontraktionskraft (mN). **(B)** Wirkung von 10 μ M Famotidin auf die Kontraktionskraft (in mN, Ordinate) der linken Vorhöfe von H₂-TG (n=8) und WT (n=4). **(C)** Wirkung von 10 μ M Famotidin auf die Schlagfrequenz (vertikale Achse in bpm) der rechten Vorhöfe von H₂-TG (n=5) und WT (n=3). **(D)** Wirkung von 10 μ M Famotidin auf die Kontraktionszeit (t_1) (in ms, Ordinate) der linken Vorhöfe von H₂-TG (n=8) und WT (n=4). **(E)** Wirkung von 10 μ M Famotidin auf die Relaxationszeit (t_2) (in ms, Ordinate) der linken Vorhöfe von H₂-TG (n=8) und WT (n=4). **(F)** Wirkung von 10 μ M Famotidin auf die Kontraktionsgeschwindigkeit (dF/dt_{max}) (Ordinate in mN/s) der linken Vorhöfe von H₂-TG (n=8) und WT (n=4). **(G)** Wirkung von 10 μ M Famotidin auf die Relaxationsgeschwindigkeit (dF/dt_{min}) (Ordinate in mN/s) der linken Vorhöfe von H₂-TG (n=8) und WT (n=4). * $p < 0,05$ vs. WT. # $p < 0,05$ vs. Ctr. Quelle: eigene Darstellung

4.2.6. Vergleich der Histamin H₂-Rezeptor-Agonisten

Sowohl UR-Po563 als auch UR-MB-158 und UR-MB-159 zeigten in den Kontraktionsversuchen an den linken Vorhöfen von H₂-TG die gleichen Effekte wie Histamin bezüglich Kontraktionskraft, Kontraktionszeit, Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit. Auch an menschlichen Vorhofpräparaten stimmte die Wirkung der neuen Substanzen mit der von Histamin überein.

UR-Po563, UR-MB-158 und UR-MB-159 waren jedoch alle deutlich potenter als Histamin. In Tabelle 1 sind die pEC_{50} -Werte der neuen Substanzen im Vergleich zu Histamin und weiteren H_2 -Rezeptor-Agonisten aus anderen Studien dargestellt. Unter den drei neuen H_2 -Rezeptor-Agonisten fällt vor allem UR-MB-158 auf, welches einen signifikant höheren pEC_{50} -Wert im Vergleich zu UR-Po563 und UR-MB-159 in H_2 -TG hat.

Bei Betrachtung der Einzelmechanogramme fällt allerdings auf, dass die Dauer bis zum Erreichen der Maximalwirkung einer Konzentrationsstufe bei UR-Po563, UR-MB-158 und UR-MB-159 länger dauert als bei Histamin und sich zudem die Form der Wirkkurven von der von Histamin unterscheidet.

Tab. 1: Vergleich der Potenz verschiedener H_2 -Rezeptor-Agonisten am Herzen. Aufgeführt sind die H_2 -Rezeptor-Agonisten (Spalte 1), das untersuchte Herzgewebe und dessen Ursprung (Spalte 2) sowie der gemessene Parameter (Spalte 3). Die angegebenen rechten Vorhofpräparate tierischen Ursprungs konnten spontan schlagen und dienen somit zur Messung der Wirkung auf die Schlagfrequenz. Die rechten Vorhofpräparate menschlichen Ursprungs sowie die linken Vorhofpräparate tierischen Ursprungs wurden elektrisch stimuliert und erlaubten die Charakterisierung der Wirkung auf die Kraft. Spalte 4 zeigt die Potenz des H_2 -Rezeptor-Agonisten in Form des negativ dekadischen Logarithmus des EC_{50} -Wertes (pEC_{50}). Der EC_{50} -Wert definiert die Konzentration eines Wirkstoffes, bei der 50 % der Maximalwirkung auf den untersuchten Parameter erreicht wird. In Spalte 5 sind die entsprechenden Referenzen angegeben. * $p < 0,05$ vs. UR-Po563 und UR-MB-159 in der Varianzanalyse (ANOVA) und anschließendem Bonferroni Test.

Drug	Tissue	Parameter	Potency (pEC_{50})	Reference
Histamine	human right atrial	increase in force	5.54 ± 0.09	(Zerkowski et al., 1993)
Histamine	human right atrial	increase in force	5.19 ± 0.30	(Poli et al., 1994)
Amthamine	human right atrial	increase in force	5.38 ± 0.36	(Poli et al., 1994)
Impromidine	human right atrial	increase in force	6.59 ± 0.35	(Poli et al., 1994)
Dimaprit	human right atrial	increase in force	4.37 ± 0.59	(Poli et al., 1994)
Histamine	guinea pig right atrium	frequency	6.01 ± 0.24	(Poli et al., 1993)
Amthamine	guinea pig right atrium	frequency	6.72 ± 0.11	(Poli et al., 1993)
Dimaprit	guinea pig right atrium	frequency	5.32 ± 0.22	(Poli et al., 1993)
Dimaprit	guinea pig right atrium	frequency	5.74 ± 0.13	(Krielaart et al., 1990)

4. Ergebnisse

Histamine	left atrium rabbit	increase in force	5.53 ± 0.06	(Hattori et al., 1988)
Impromidine	left atrium rabbit	increase in force	8.69 ± 0.16	(Hattori et al., 1988)
Histamine	left atrium H2-TG	increase in force	6.73 ± 0.16	(Gergs et al., 2019)
Dimaprit	left atrium H2-TG	increase in force	6.39 ± 0.17	(Gergs et al., 2019)
Amthamine	left atrium H2-TG	increase in force	6.59	(Gergs et al., 2019)
Histamine	left atrium H2-TG	increase in force	6.85 ± 0.23 n=11	this report
Histamine	left atrium H2-TG	time to peak tension	6.95 ± 0.36 n=11	this report
Histamine	left atrium H2-TG	time of relaxation	7.04 ± 0.86 n=11	this report
Histamine	left atrium H2-TG	maximum rate of tension development	6.84 ± 0.20 n=11	this report
Histamine	left atrium H2-TG	minimum rate of tension development	6.87 ± 0.17 n=11	this report
Histamine	right atrium H2-TG	frequency	6.89 ± 0.41 n=6	this report
UR-Po563	left atrium H2-TG	increase in force	8.27 ± 0.18 n=5	this report
UR-Po563	left atrium H2-TG	time to peak tension	8.70 ± 0.28 n=5	this report
UR-Po563	left atrium H2-TG	maximum rate of tension development	8.26 ± 0.18 n=5	this report
UR-Po563	left atrium H2-TG	minimum rate of tension development	8.35 ± 0.20 n=5	this report
UR-Po563	right atrium H2-TG	frequency	8.69 ± 0.18 n=3	this report
UR-Po563	human right atrial	increase in force	5.68 ± 2.20 n=7	this report
UR-Po563	human right atrial	time to peak tension	6.84 ± 0.86 n=7	this report
UR-Po563	human right atrial	maximum rate of tension development	5.80 ± 1.81 n=7	this report
UR-Po563	human right atrial	minimum rate of tension development	5.55 ± 1.09 n=7	this report
UR-MB-158	left atrium H2-TG	increase in force	9.86 ± 0.27* n=6	this report
UR-MB-158	left atrium H2-TG	time to peak tension	9.50 ± 0.26 n=6	this report

UR-MB-158	left atrium H ₂ -TG	maximum rate of tension development	9.78 ± 0.25* n=6	this report
UR-MB-158	left atrium H ₂ -TG	minimum rate of tension development	9.64 ± 0.29* n=6	this report
UR-MB-158	right atrium H ₂ -TG	frequency	9.24 ± 0.98 n=4	this report
UR-MB-159	left atrium H ₂ -TG	increase in force	8.21 ± 0.42 n=6	this report
UR-MB-159	left atrium H ₂ -TG	time to peak tension	8.39 ± 0.35 n=6	this report
UR-MB-159	left atrium H ₂ -TG	maximum rate of tension development	8.25 ± 0.39 n=6	this report
UR-MB-159	left atrium H ₂ -TG	minimum rate of tension development	8.34 ± 0.30 n=6	this report
UR-MB-159	right atrium H ₂ -TG	frequency	8.07 ± 0.55 n=5	this report

4.2.7. Histamin in Anwesenheit von Isoprenalin

Neben der Untersuchung der neuen Substanzen sind auch weitere Erkenntnisse über Wechselwirkungen des Histamin H₂-Rezeptors mit anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren von Interesse. Kürzlich konnte eine inhibitorische Interaktion zwischen dem Histamin H₂-Rezeptor und dem Serotonin 5-HT₄-Rezeptor in doppelt transgenen Mäusen gezeigt werden (Neumann et al., 2021b). Sowohl der Histamin H₂-Rezeptor als auch der Serotonin 5-HT₄-Rezeptor bewirken einen positiv inotropen und chronotropen Effekt über Kopplung an G_s-Proteine und Auslösung der intrazellulären AC-cAMP-PKA-Signalkaskade. Da dies auch auf den β-Adrenozeptor zutrifft (Hartzell, 1988), sollten ähnliche Interaktionen zwischen dem Histamin H₂- und dem β-Adrenozeptor überprüft werden. Dazu wurde – ähnlich der Versuche von Neumann et al. – Histamin in Anwesenheit von Isoprenalin kumulativ appliziert.

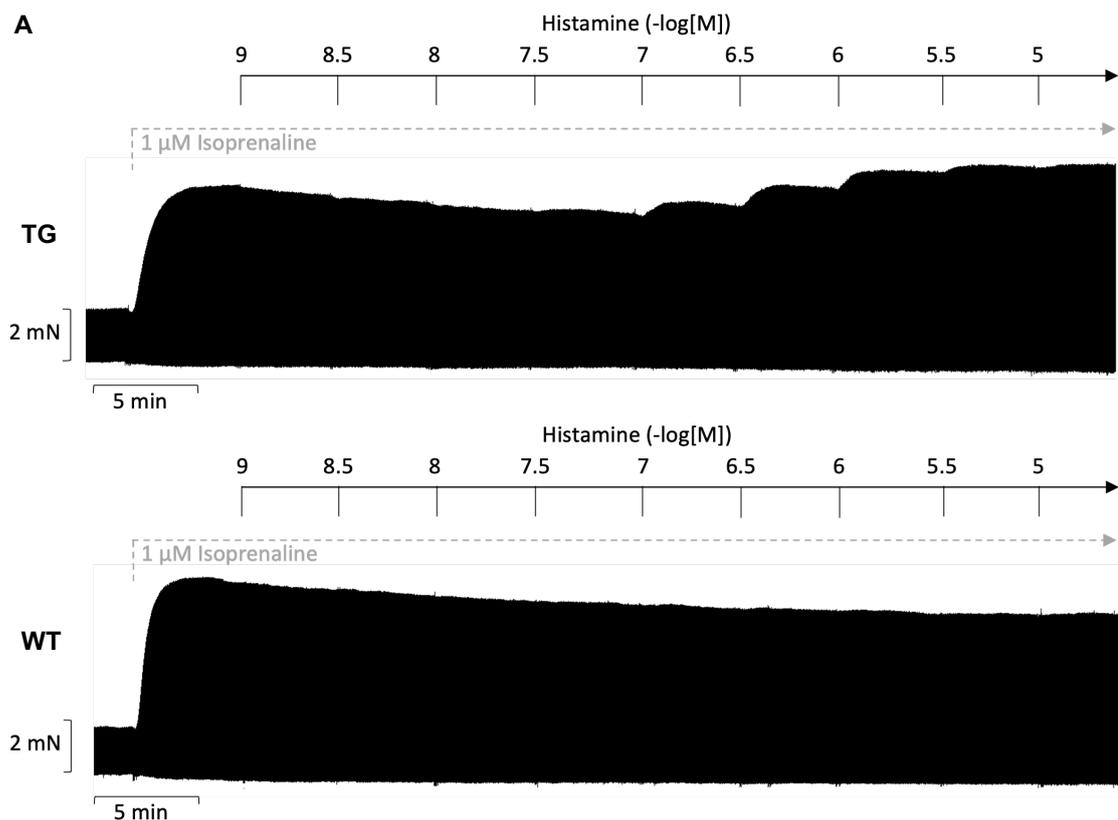
In Abbildung 12A ist ein Mechanogramm der linken Vorhöfe von H₂-TG und WT abgebildet, Abbildungen 12B bis H zeigen die Ergebnisse im Vergleich zur kumulativen Gabe von Histamin ohne vorherige Applikation von Isoprenalin.

Die Kontraktionskraft stieg nach Bolusgabe von 1 μM Isoprenalin sowohl bei H₂-TG als auch bei WT stark an. Diese Wirkung ließ zeitabhängig bei WT und H₂-TG etwas nach. Bei Erreichen höherer Histaminkonzentrationen (als in Abwesenheit von Isoprenalin für einen sichtbaren Effekt nötig war) stieg die Kontraktionskraft von H₂-TG wieder an (etwa ab 10⁻⁷ M). Sie erreichte dabei ähnlich hohe absolute Werte wie bei alleiniger Histamin-gabe (Abb. 12B). Die relative Kraftzunahme (100 % entspricht Kraft nach

Isoprenalingabe) war jedoch niedriger als bei der Vergleichsgruppe ohne Isoprenalin (100 % entspricht Ausgangskraft) (Abb. 12C). WT blieb von der steigenden Histaminkonzentration unbeeinträchtigt, die Kontraktionskraft ließ weiterhin zeitabhängig nach.

Die Kontraktions- (Abb. 12E) und Relaxationszeit (Abb. 12F) verkürzten sich, die Kontraktions- (Abb. 12G) und die Relaxationsgeschwindigkeit stiegen (Abb. 12H) bei H₂-TG und WT nach 1 μ M Isoprenalin. Bei H₂-TG veränderten sich diese Parameter anschließend infolge steigender Histaminkonzentrationen entsprechend der steigenden Kontraktionskraft, während bei WT keine Folgen eines positiv inotropen Effekts durch Histamin gezeigt werden konnte.

In den spontan schlagenden rechten Vorhöfen von H₂-TG und WT führte Isoprenalin zu einer Steigerung der Schlagfrequenz. Diese sank zeitabhängig leicht ab (Abb. 12D). Es zeigte sich kein zusätzlicher Effekt durch Histamin.



4. Ergebnisse

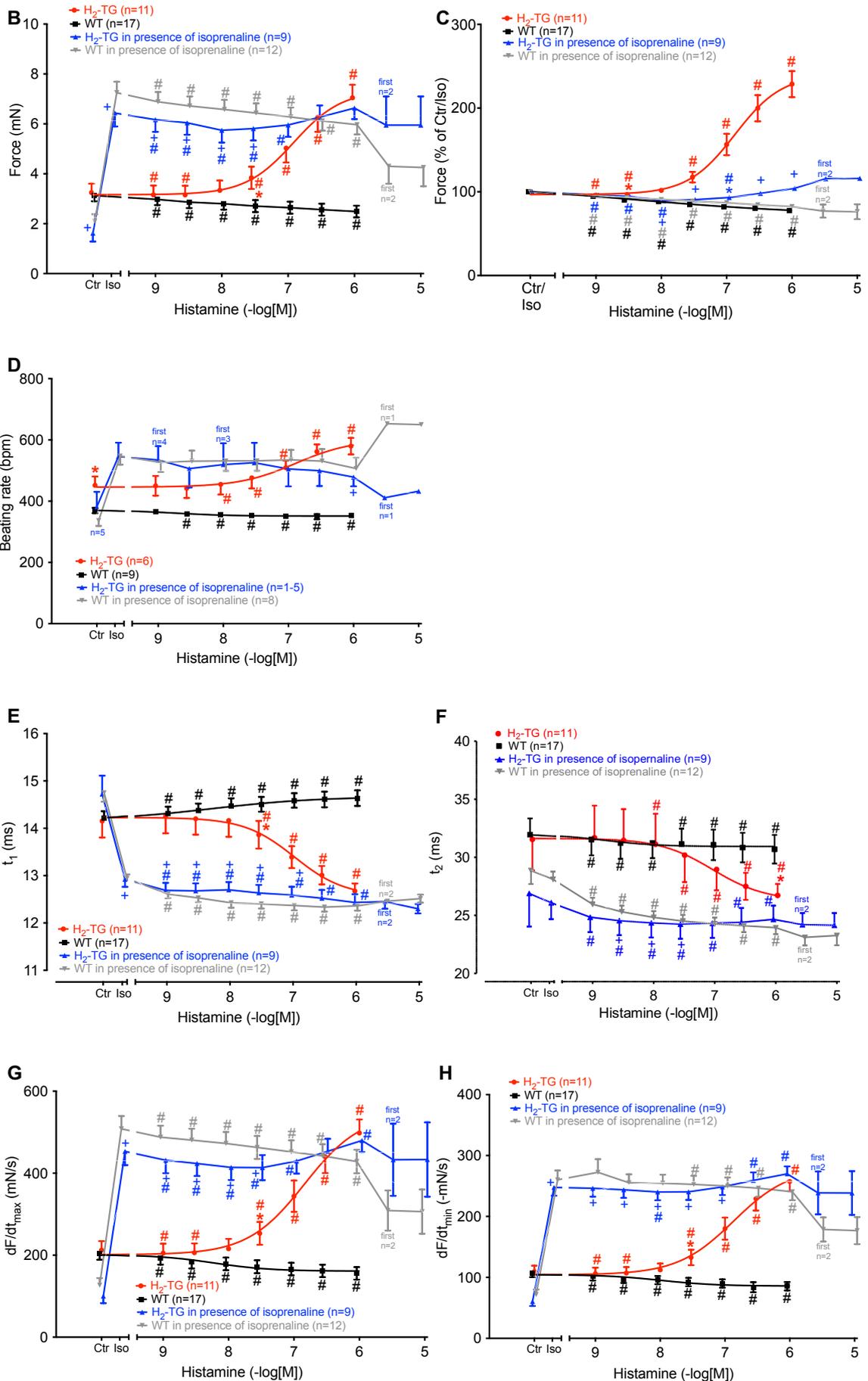


Abb. 12: Wirkung von Histamin in Anwesenheit von Isoprenalin auf isolierte linke und rechte Vorhöfe. **(A)** Repräsentatives Mechanogramm der Wirkung von einmaliger Isoprenalingabe mit nachfolgender Gabe von Histamin in steigender Konzentration auf die Kontraktionskraft elektrisch stimulierter (1 Hz) linker Vorhöfe von H₂-TG im Vergleich zu WT. Die horizontale Achse gibt die Zeit an, die vertikale Achse die Kontraktionskraft (mN). **(B)** Wirkung von Histamin auf die Kontraktionskraft (Ordinate in mN) der linken Vorhöfe von H₂-TG (n=11) und WT (n=17) im Vergleich zu H₂-TG (n=9) und WT (n=12) in Anwesenheit von Isoprenalin. **(C)** Wirkung von Histamin auf die relative Kontraktionskraft (Ordinate in % von Kontrolle (Ctr) bzw. Isoprenalin (Iso)) der linken Vorhöfe von H₂-TG (n=11, Ctr=3,26 ± 0,34 mN) und WT (n=17, Ctr=3,13 ± 0,22 mN) im Vergleich zu H₂-TG (n=9, Iso=6,43 ± 0,51 mN) und WT (n=12, Iso=7,24 ± 0,42 mN) in Anwesenheit von Isoprenalin. **(D)** Wirkung von Histamin auf die Schlagfrequenz (in bpm, Ordinate) spontan schlagender rechter Vorhöfe von H₂-TG (n=6) und WT (n=9) im Vergleich zu H₂-TG (n=15) und WT (n=8) in Anwesenheit von Isoprenalin. **(E)** Wirkung von Histamin auf die Kontraktionszeit (t₁) (in ms, vertikale Achse) der linken Vorhöfe von H₂-TG (n=11) und WT (n=17) im Vergleich zu H₂-TG (n=9) und WT (n=12) in Anwesenheit von Isoprenalin. **(F)** Wirkung von Histamin auf die Relaxationszeit (t₂) (in ms, vertikale Achse) der linken Vorhöfe von H₂-TG (n=11) und WT (n=17) im Vergleich zu H₂-TG (n=9) und WT (n=12) in Anwesenheit von Isoprenalin. **(G)** Wirkung von Histamin auf die Kontraktionsgeschwindigkeit (dF/dt_{max}) in mN/s (Ordinate) linker Vorhöfe von H₂-TG (n=11) und WT (n=17) im Vergleich zu H₂-TG (n=9) und WT (n=12) in Anwesenheit von Isoprenalin. **(H)** Wirkung von Histamin auf die Relaxationsgeschwindigkeit (dF/dt_{min}) in mN/s (Ordinate) linker Vorhöfe von H₂-TG (n=11) und WT (n=17) im Vergleich zu H₂-TG (n=9) und WT (n=12) in Anwesenheit von Isoprenalin. *Erstes p < 0,05 vs. WT. #p < 0,05 vs. Ctr/Iso. †p < 0,05 vs. H₂-TG in Abwesenheit von Isoprenalin. Abszisse: negativ logarithmische Konzentration von Histamin in Mol (M). Quelle: eigene Darstellung

4.3. Langendorff-Herzen

Mit Hilfe isolierter, retrograd perfundierter Herzen in der Langendorff-Apparatur wurde neben der Wirkung von UR-Po563 auf die Vorhöfe auch dessen Effekt auf die Ventrikel untersucht. Es zeigte sich eine Kraftzunahme von 11,5 ± 2,07 mN auf 20,5 ± 2,81 mN bei H₂-TG, nicht aber bei WT. Auch stiegen die Kontraktions- und die Relaxationsgeschwindigkeit nur bei H₂-TG und nicht bei WT. Die Schlagfrequenz stieg bei H₂-TG leicht von 351 ± 37,3 bpm auf 391 ± 16,2 bpm an (p > 0,05). Bei WT veränderte sich die Schlagfrequenz nicht.

Tab. 2: Wirkung von 1 μ M UR-Po563 auf isoliert perfundierte Langendorff-Herzen. Aufgeföhrt sind die Daten für Kontraktionskraft (in mN), Schlagfrequenz (in bpm) sowie Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit (in mN/s) von H₂-TG (n=3-4) und WT (n=3-4). *p < 0,05 vs. basal.

	WT		H ₂ -TG	
	basal	UR-Po563	basal	UR-Po563
Force (mN)	7.89 \pm 1.28	8.95 \pm 1.95	11.49 \pm 2.07	20.46 \pm 2.81*
Heart rate (bpm)	308 \pm 8.60	321 \pm 13.2	351 \pm 37.3	391 \pm 16.2
dF/dt max (mN/s)	204.6 \pm 43.8	220.6 \pm 36.1	296 \pm 42.5	718 \pm 90.9*
dF/dt min (mN/s)	-151 \pm 53.2	-172 \pm 56.5	-230 \pm 39.3	-566 \pm 52.7*

4.4. Echokardiografie

Mit Hilfe der Echokardiografie konnte die Wirkung der neuen Histamin H₂-Rezeptor-Agonisten auf das Herz in vivo getestet werden. Eine repräsentative Aufnahme im M-Mode vor und nach intraperitonealer Injektion von 100 μ l 1 mM UR-Po563-Lösung ist in Abbildung 13A zu sehen. Die Zunahme der systolischen Wandbewegung nach UR-Po563-Injektion ist im Vergleich zur Kontrollaufnahme bei H₂-TG deutlich erkennbar, dagegen nicht bei WT. Die Daten sind in Abbildung 13B und Tabelle 3 zusammengefasst. Bei H₂-TG steigerte UR-Po563 die Herzfrequenz von 499 \pm 83,3 bpm auf 627 \pm 64,5 bpm und die Ejektionsfraktion von 74,3 \pm 7,84 % auf 98,2 \pm 9,97 %. Der positiv chronotrope Effekt konnte durch Famotidin gehemmt werden. Demgegenüber war bei WT kein positiv inotroper oder chronotroper Effekt nachzuweisen.

In Einzelversuchen wurden auch UR-MB-158 und UR-MB-159 getestet. Die Einzelversuche zeigten analog zu UR-Po563 einen positiv inotropen und chronotropen Effekt bei H₂-TG. UR-MB-158 steigerte die Herzfrequenz von H₂-TG von 526 bpm auf 656 bpm und die Ejektionsfraktion von 62,3 % auf 98,2 %. UR-MB-159 führte zu einer Zunahme der Herzfrequenz von H₂-TG von 381 bpm auf 686 bpm und der Ejektionsfraktion von 54,0 % auf 94,2 %.

Tab. 3: Wirkungen von UR-Po563, UR-MB-158 und UR-MB-159 in der Echokardiografie. Es werden Schlagfrequenz (in bpm) und Ejektionsfraktion (in %) von H₂-TG und WT jeweils vor und 5 Minuten nach intraperitonealer Injektion des Wirkstoffes angegeben. Bei UR-Po563 wurde zusätzlich der Effekt nach vorheriger Famotidin-Gabe geprüft. *p < 0,05 vs. basal.

	Heart rate (bpm)		Ejection fraction (%)	
	basal	stimulated	basal	stimulated
UR-Po563				
WT (n=5)	436.8 ± 23.2	511.9 ± 113,6	60.14 ± 11.58	72.44 ± 6.40
H ₂ -TG (n=5)	499.0 ± 83.3	626.8 ± 64,5*	74.31 ± 7.84	98.21 ± 9.97*
H ₂ -TG + famotidine (n=7)	469.8 ± 99.8	517.4 ± 131.2	64.61 ± 8.19	82.47 ± 9.97*
UR-MB-158				
WT (n=1)	447.5	569.5	55.83	83.2
H ₂ -TG (n=2)	526.3	656.2	62.34	98.15
UR-MB-159				
WT (n=1)	417.8	513.0	51.62	82.42
H ₂ -TG (n=2)	380.9	686.3	54.04	94.21

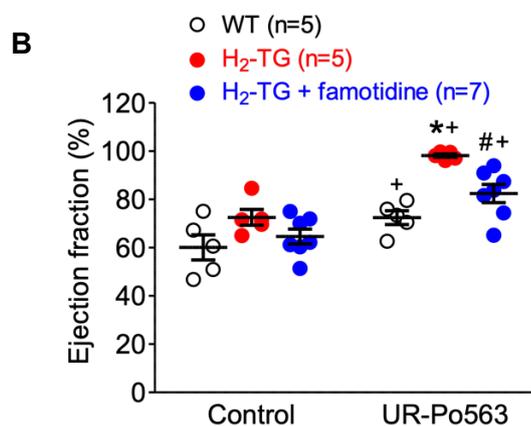
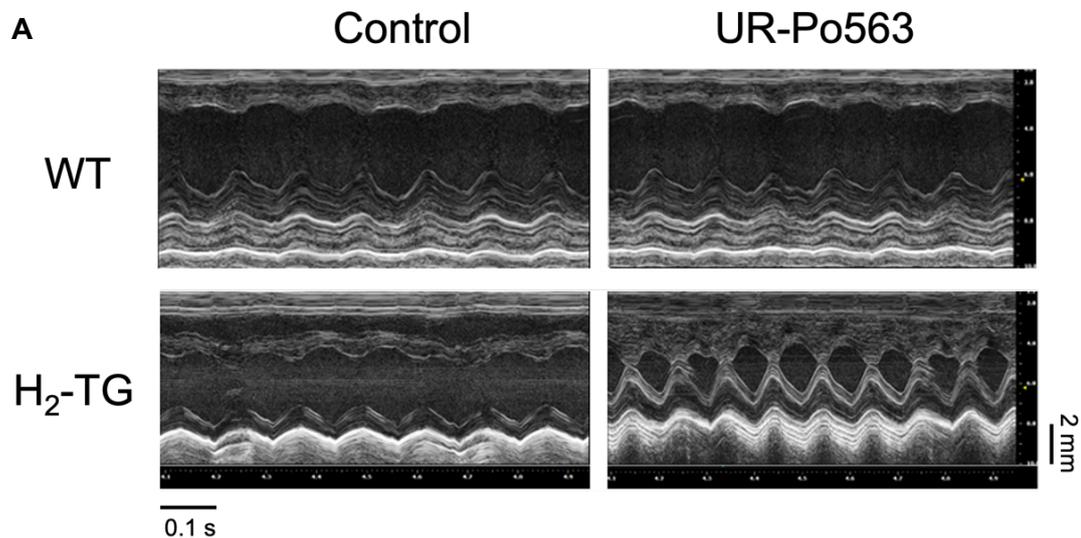


Abb. 13: Echokardiografie. **(A)** Repräsentative Aufnahme des linken Ventrikels von H₂-TG und WT im M-Mode vor (Ctr) und fünf Minuten nach (UR-Po563) Injektion von 100 µM einer 1 mM Lösung UR-Po563. Bei H₂-TG führt UR-Po563 zu einer Zunahme der systolischen Wandbewegung, nicht aber bei WT. Die horizontale Achse gibt die Zeit an (in s), die vertikale Achse die Größe (in mm). **(B)** Ejektionsfraktion in WT (n=5) sowie H₂-TG mit (n=7) und ohne (n=5) Famotidin, jeweils vor und fünf Minuten nach intraperitonealer Injektion von UR-Po563. Angegeben sind Mittelwert ± SEM und die Einzelwerte der Versuche. *p < 0,05 vs. WT #p < 0,05 vs. H₂-TG *p < 0,05 vs. Ctr.
Quelle: eigene Darstellung

4.5. Western Blot-Analysen

Im Anschluss an die Kontraktionsversuche wurde der Phosphorylierungszustand von Phospholamban (PLB) an den Aminosäuren Serin-16 und Threonin-17 untersucht. Hierfür wurden die rechten und linken Vorhöfe der Kontraktionsversuche sowie die isoliert perfundierten Herzen der Langendorff-Versuche (für ventrikuläre Proben) am Maximum des positiv inotropen Effektes von UR-Po563 in flüssigem Stickstoff eingefroren und später in Western Blots mit phosphorylierungsspezifischen Antikörpern untersucht. In Abbildung 14 sind Aufnahmen der Western Blots mit anti-Ser16P-PLB Antikörpern von linken (Abb. 14A) und rechten Vorhöfen (Abb. 14B) abgebildet. Außerdem wurden die Ergebnisse quantifiziert, zur besseren Vergleichbarkeit der einzelnen Western Blots ins Verhältnis zu Calsequestrin (CSQ, Beladungskontrolle) gesetzt und als Balkendiagramme dargestellt. Es konnte eine deutlich erhöhte Phosphorylierung von PLB an Ser-16 in den linken Vorhöfen von H₂-TG, aber nicht von WT gezeigt werden (Abb. 14A). In den rechten Vorhöfen von H₂-TG, jedoch nicht in jenen von WT, zeigte sich eine Tendenz zur Erhöhung der Phosphorylierung (Abb. 14B).

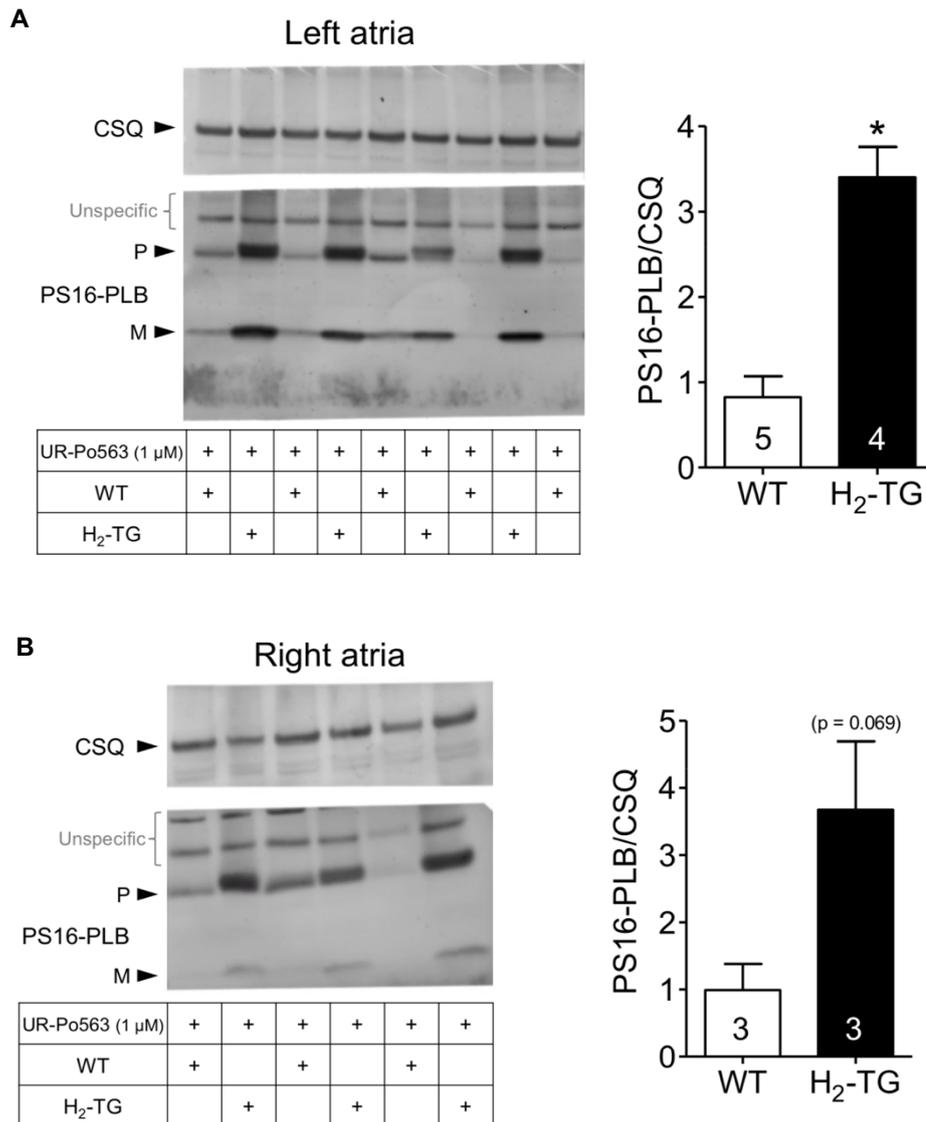


Abb. 14: Wirkung von 1 μ M UR-Po563 auf die Serin-16-Phosphorylierung von Phospholamban (PS16-PLB) im linken (**A**) und rechten (**B**) Vorhof von H₂-TG (links: n=4; rechts: n=3) und WT (links: n=5; rechts: n=3). Die Vorhöfe wurden am Ende der Kontraktionsversuche im Maximum des inotropen Effektes eingefroren und mit phosphorylierungsspezifischen Antikörpern im Western Blot untersucht. Als Beladungskontrolle diente Calsequestrin (CSQ). Zu sehen sind repräsentative Aufnahmen der Western Blots sowie die Ergebnisse in Form von Balkendiagrammen. Hierfür wurde das Signal quantifiziert und ins Verhältnis mit CSQ gesetzt (Ordinate). *p < 0,05 vs. WT. Quelle: eigene Darstellung

In der gleichen Art wurde die Thr-17-Phosphorylierung untersucht (Abb. 15). Auch hier konnte eine erhöhte Phosphorylierung von PLB an Thr-17 in den linken Vorhöfen von H₂-TG (Abb. 15A) und eine Tendenz zur Erhöhung in den rechten Vorhöfen von H₂-TG (Abb. 15B) gezeigt werden. In den Vorhöfen von WT war die Phosphorylierung an Thr-17 durch UR-Po563 nicht erhöht.

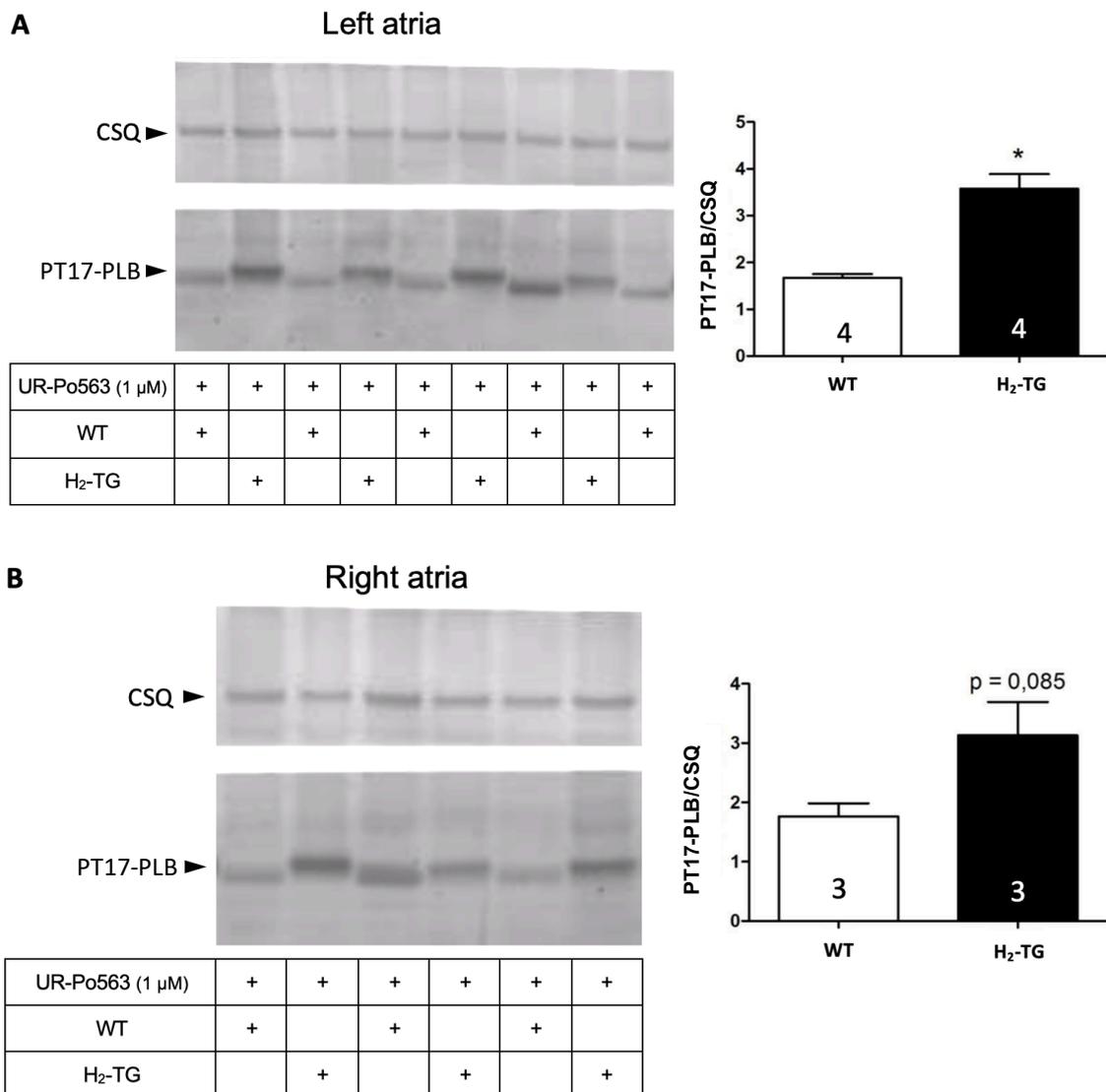


Abb. 15: Wirkung von 1 μ M UR-Po563 auf die Threonin-17-Phosphorylierung von Phospholamban (PT17-PLB) im linken (**A**) und rechten (**B**) Vorhof von H₂-TG (links: n=4; rechts: n=3) und WT (links: n=4; rechts: n=3). Abgebildet sind Aufnahmen der Western Blots mit spezifischen Antikörpern sowie das quantifizierte Signal von Thr-17 im Verhältnis zu Calsequestrin (CSQ; Beladungskontrolle) (Ordinate). * $p < 0,05$ vs. WT. Quelle: eigene Darstellung

Abschließend wurde die Phosphorylierung von PLB an Ser-16 (Abb. 16A) und Thr-17 (Abb. 16B) in den ventrikulären Proben geprüft. Es zeigte sich sowohl für Ser-16 als auch für Thr-17 eine erhöhte Phosphorylierung in H₂-TG, aber nicht in WT.

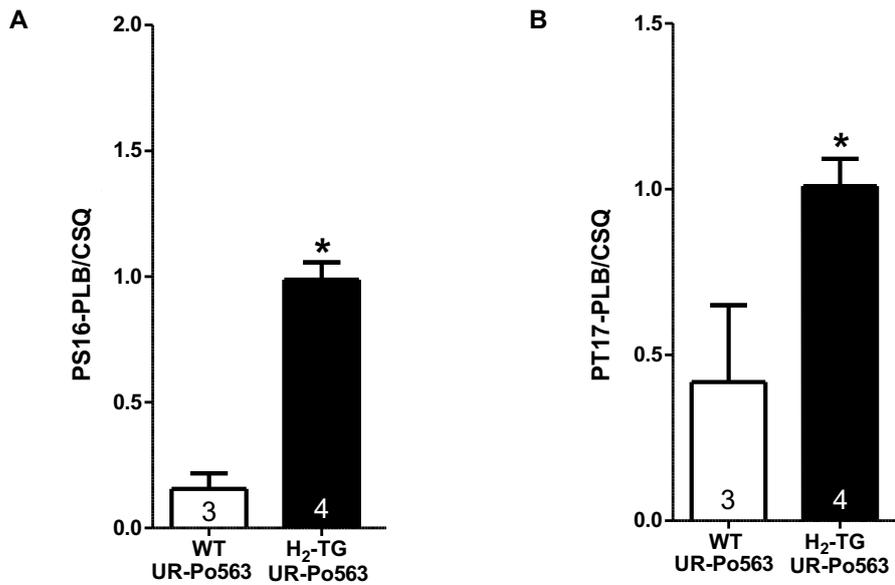


Abb. 16: Wirkung von 1 μ M UR-Po563 auf die Serin-16- (**A**) und Threonin-17- (**B**) Phosphorylierung von Phospholamban im Ventrikel von H₂-TG (n=4) und WT (n=3). Das Signal von Serin-16 (PS16-PLB) bzw. Threonin-17 (PT17-PLB) wurde ins Verhältnis zu Calsequestrin (CSQ; Beladungskontrolle) gesetzt (Ordinate) und als Balkendiagramm dargestellt. *p < 0,05 vs. WT.
Quelle: eigene Darstellung

5. Diskussion

5.1. Diskussion der Methoden

5.1.1. Tiermodell

In den meisten Versuchen wurden transgene Mäuse (H₂-TG) verwendet, die herzspezifisch den humanen Histamin H₂-Rezeptor überexprimieren, um die kardiale Wirkung der verschiedenen H₂-Agonisten zu charakterisieren. Wildtyp Mäuse besitzen keine funktionell aktiven Histamin Rezeptoren am Herzen, obwohl bei Wildtyp Tieren der endogene Histamin H₂-Rezeptor auf RNA-Ebene nachgewiesen wurde (Gergs et al., 2019). Es war bislang allerdings weder mit Antikörpern, noch mit radioaktiven Liganden möglich, das H₂-Rezeptor-Protein nachzuweisen (Gergs et al., 2019). Wegen der fehlenden Reaktion auf Histamin und H₂-Rezeptor-Agonisten wird jedoch von keiner funktionellen Rolle ausgegangen (Gergs et al., 2019). Deshalb eignet sich dieses Modell gut zur Untersuchung des menschlichen Histamin H₂-Rezeptors.

Bei den transgenen Mäusen gelang es mit radioaktiven Liganden jedoch auch nicht die Dichte des H₂-Rezeptors quantitativ zu bestimmen (Gergs et al., 2019). Zudem ist eine größere Variabilität der H₂-Rezeptor-Expression bei menschlichen Individuen im Vergleich zu den homogen H₂-Rezeptor-überexprimierenden Mäusen möglich, was eine direkte Übertragbarkeit der Ergebnisse einschränkt.

5.1.2. Kontraktionsversuche

Für die Kontraktionsversuche wurden rechte und linke Vorhöfe von H₂-TG und WT sowie Proben des menschlichen Vorhofs aus herzchirurgischen Eingriffen eingesetzt. Der Versuchsaufbau bot die Möglichkeit, die Reaktionen der Kraft und der Frequenz getrennt voneinander zu beurteilen, wodurch die Wirkung einer Substanz genauer charakterisierbar wurde. Allerdings erlaubt diese Methode auch nur Rückschlüsse auf die Reaktion der Vorhöfe, also eines isolierten Teiles des Herzens. Folglich kann die Reaktion des vollständigen Herzens mit dieser Methode nicht erfasst werden – erst recht nicht die in einem intakten Organismus.

Eine Möglichkeit, die Wirkung der Substanzen beim Menschen abzuschätzen und mit den Mausdaten zu vergleichen, boten die herzchirurgischen Präparate. Weil solche Präparate nicht spontan schlagen, konnte hier allerdings nur die Inotropie untersucht werden. Zudem stammten alle Proben von Patienten mit kardiovaskulären Vorerkrankungen – es handelte sich also um erkrankte Herzen, die zuvor unter Medikamenten-

einfluss standen. Bei der Bewertung der Ergebnisse muss also bedacht werden, dass dies Einfluss auf die Reaktion der Präparate haben könnte. Ebenfalls bedacht werden sollte, dass alle Patienten männlich waren und die Ergebnisse somit nur unter Vorbehalt auf die Gesamtheit der Menschen übertragen werden können.

5.1.3. Langendorff-Methode und Echokardiografie

Durch die Langendorff-Methode ergibt sich die Möglichkeit, die Wirkung der Substanzen isoliert auf das Herz im Ganzen zu untersuchen. Hierdurch konnten die Ergebnisse aus den Vorhofexperimenten um die ventrikuläre Funktion ergänzt werden. Eine Beurteilung unter den komplexeren Bedingungen im lebenden Organismus ist hier jedoch immer noch nicht möglich – wohl aber in den echokardiografischen Versuchen.

5.1.4. Western Blot-Analysen

Die Western Blot-Analysen dienen zur Bestätigung des Signaltransduktionsweges der Substanzen. Phospholamban ist in Kardiomyozyten der durch cAMP-Erhöhung beeinflusste Hauptregulator der SERCA (Simmerman und Jones, 1998) und die entscheidende Phosphorylierung an Serin-16 und Threonin-17 wird durch Aktivierung des Histamin H₂-Rezeptors bei H₂-TG und beim Menschen ausgelöst (Gergs et al., 2019; Neumann et al., 2021c). Deshalb weist eine gesteigerte Phosphorylierung von PLB auf eine cAMP-erhöhende Wirkung der eingesetzten Substanz am kardialen Histamin H₂-Rezeptor hin. Allerdings kann die Phosphorylierungsrate auch durch andere cAMP-erhöhende Rezeptoren gesteigert werden (Simmerman und Jones, 1998) und ist nicht spezifisch für den Histamin H₂-Rezeptor. Somit lässt diese Methode nur Rückschlüsse auf den Signaltransduktionsweg, nicht aber auf die Rezeptorspezifität zu. Um das Bild des Signaltransduktionsweges zu vervollständigen hätten noch weitere Untersuchungen bezüglich Enzymaktivitäten der AC und PKA, Ionenströme oder weitere PKA-typische Phosphorylierungen gemacht werden können. Dies war jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

5.2. Diskussion der Ergebnisse

5.2.1. Wirkung von Histamin

Die Vorhöfe von H₂-TG reagierten auf Histamin positiv inotrop und chronotrop. Bei Vorhöfen von WT war hingegen keine Reaktion erkennbar. Dies wurde bereits mehrfach in früheren Studien des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Martin-Luther-

Universität Halle-Wittenberg beobachtet (Gergs et al., 2019; Gergs et al., 2021b; Neumann et al., 2021a), wobei auch deren Hemmung bei H₂-TG durch Histamin H₂-Antagonisten wie Cimetidin und Famotidin gezeigt werden konnte (Gergs et al., 2019; Neumann et al., 2021a). Obwohl die Kurve der Kontraktionskraft bei WT leicht abfällt und man interpretieren könnte, dass Histamin einen negativ inotropen Effekt ausübe (ebenso bei UR-Po563, UR-MB-158 und UR-MB-159), ist die Abnahme der Kraft eher ein zeitabhängiger Effekt der Methode. Es wurden bereits Zeitkontrollexperimente am Institut durchgeführt, welche beim gleichen Tiermodell einen negativ inotropen Effekt durch Histamin ausschließen (Gergs et al., 2019). Außerdem nimmt die Kontraktionskraft kontinuierlich und unabhängig von den Steigerungen der Substanzkonzentrationen ab und ist auch in den Versuchsreihen mit Famotidin zu sehen, was gegen einen H₂-Rezeptor-vermittelten Effekt der Substanzen spricht. Der positiv inotrope Effekt der Substanzen bei H₂-TG könnte durch die zeitliche Erschlaffung der Vorhöfe womöglich insgesamt noch unterschätzt werden.

Bei dem Vergleich der Ausgangslagen von H₂-TG und WT fiel auf, dass die rechten Vorhöfe von H₂-TG eine höhere Ausgangsfrequenz hatten als die von WT. Dies entspricht früheren Beobachtungen in diesem Tiermodell (Gergs et al., 2021b). Die unterschiedlichen Basalfrequenzen könnten zum einen darauf beruhen, dass endogenes Histamin aus den Vorhöfen an den Histamin H₂-Rezeptoren der H₂-TG wirkt, während die Rezeptoren bei WT fehlen. Zum anderen verfügen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren über eine konstitutive Aktivität (Smit et al., 2007), auch die vier Histamin-Rezeptoren (Levick, 2022). Das heißt, dass sie eine aktive und eine inaktive Konformation haben, zwischen denen sie spontan wechseln können (Smit et al., 2007). Normalerweise liegen beide Zustände im Gleichgewicht vor (Smit et al., 2007). Durch Agonisten wird das Gleichgewicht in Richtung aktiv verschoben und durch Antagonisten (inverse Agonisten) in Richtung inaktiv (Smit et al., 2007). Aus der Konformationsdynamik resultiert aber auch ohne Liganden eine intrinsische Aktivität der Rezeptoren, deren Ausmaß von der Expressionsstärke abhängig ist (Smit et al., 2007). Da H₂-TG den Histamin H₂-Rezeptor überexprimieren, sollte die konstitutive Aktivität erwartungsgemäß höher sein als bei WT, was den Unterschied in der Basalfrequenz erklären könnte.

5.2.2. Wirkung von UR-Po563

UR-Po563 löste einen positiv inotropen Effekt in den linken Vorhöfen und in kompletten, isoliert perfundierten Herzen von H₂-TG sowie in menschlichen Vorhofpräparaten aus. Auch die Ejektionsfraktion von H₂-TG stieg an. In den rechten Vorhöfen und der

Echokardiografie von H₂-TG führte es außerdem zu einem positiv chronotropen Effekt. Der pEC₅₀-Wert lag dabei mit $8,69 \pm 0,18$ etwas höher als in den Vorversuchen am rechten Vorhof des Meerschweinchens ($8,12 \pm 0,07$) (Biselli et al., 2021), was zum Beispiel durch den Speziesunterschied (humaner vs. Meerschweinchen-Rezeptor) erklärt werden könnte.

Durch den spezifischen Histamin H₂-Rezeptor-Antagonisten Famotidin (Panula et al., 2015) fand eine Rechtsverschiebung der Effekte statt. Durch Western Blots konnte zudem die Phosphorylierung von Phospholamban an den Aminosäuren Serin-16 und Threonin-17 nachgewiesen werden. In Zusammenschau sprechen diese Ergebnisse für eine Aktivierung des Histamin H₂-Rezeptors durch UR-Po563 und in Folge dessen eine Aktivierung der PKA durch Steigerung des cAMP-Spiegels. Bereits bei der Entwicklung von UR-Po563 konnten Biselli et al. eine hohe Affinität des Stoffes zum humanen Histamin H₂-Rezeptor zeigen. In Radioliganden-Bindungsassays mit rekombinanten Rezeptoren in Sf9-Insektenzellen lag diese bei einem pK_i-Wert von 7,75 und damit deutlich höher als für den Histamin H₁-, H₃- und H₄-Rezeptor (Biselli et al., 2021). In dieser Arbeit konnte nun zusätzlich die Bindung von UR-Po563 an den Histamin H₂-Rezeptor in differenzierten Säuger Zellen (Kardiomyozyten) der Maus und in vivo gezeigt werden.

Vergleicht man die Wirkung von UR-Po563 an den Vorhöfen der Maus mit der an den Vorhofpräparaten des Menschen, fällt bei der Maus eine stärkere Reaktion auf die Substanz auf. Die pEC₅₀-Werte von UR-Po563 in den verschiedenen Geweben (siehe Tab. 1) bestätigen diese Annahme. Dies lässt darauf schließen, dass bei den H₂-Rezeptor-überexprimierenden Mäusen die Rezeptordichte höher ist als beim Menschen, auch wenn das genaue Ausmaß der Expression nicht quantifizierbar war (Gergs et al., 2019). Es zeigt auch die Grenzen der Übertragbarkeit des Mausmodells auf den Menschen. In der klinischen Anwendung wären die gleichen Effekte vermutlich erst bei höheren Konzentrationen als im Mausmodell zu erwarten.

Bei den Western Blot-Analysen der Phosphorylierung von Phospholamban fiel auf, dass die Phosphorylierung von Serin-16 und Threonin-17 an den linken Vorhöfen von H₂-TG signifikant erhöht war, an den rechten Vorhöfen jedoch nicht. Der pEC₅₀-Wert von UR-Po563 auf den positiv chronotropen Effekt war trotzdem höher als auf den positiv inotropen Effekt. Das mag daran liegen, dass die Steigerung der Schlagfrequenz zum großen Teil phosphorylierungsunabhängig über direkte Aktivierung des HCN durch cAMP verläuft (DiFrancesco und Tortora, 1991; DiFrancesco und Mangoni, 1994; siehe 1.3.). Funktionell scheint die geringere Phosphorylierungsrate im rechten Vorhof den

Effekt also kaum einzuschränken, zumal eine – zwar nicht signifikante, gleichwohl deutliche – Steigerung der Phosphorylierung im Vergleich zu WT Mäusen zu sehen war.

5.2.3. Wirkung von UR-MB-158

Die linken Vorhöfe von H₂-TG reagierten mit einem positiv inotropen Effekt auf UR-MB-158. Zwei echokardiografisch untersuchte H₂-TG Mäuse zeigten zudem eine Steigerung der Ejektionsfraktion und der Herzfrequenz in vivo. Durch Famotidin konnte der Effekt an den Vorhöfen gehemmt werden, was auf eine Histamin H₂-Rezeptor-vermittelte Wirkung schließen lässt. Auch bei UR-MB-158 konnte in der Entwicklung des Wirkstoffes bereits eine hohe Affinität für den Histamin H₂-Rezeptor ($pK_i=7,89$) in Radioliganden-Bindungsassays an Sf9-Insektenzellen gezeigt werden (Tropmann et al., 2021). Auffallend war dabei auch eine sehr hohe Selektivität von UR-MB-158 für den Histamin H₂-Rezeptor, da es kaum Affinitäten für die drei anderen Histamin Rezeptoren aufwies.

An den rechten Vorhöfen führte UR-MB-158 zu einer Steigerung der Schlagfrequenz. Diese war zwar nicht signifikant, vermutlich lag das aber eher an der niedrigen Versuchsanzahl ($n=3$) als an einer fehlenden Wirkung. So war der Effekt in Anwesenheit von Famotidin ($n=6$) bei höheren Konzentrationen signifikant und auch in den Einzelversuchen der Echokardiografie konnte eine deutliche Steigerung der Herzfrequenz nachgewiesen werden. Gleichermäßen führte UR-MB-158 in Vorversuchen an rechten Vorhöfen des Meerschweinchens zu einem positiv chronotropen Effekt mit einem pEC_{50} -Wert von $8,54 \pm 0,09$ (Tropmann et al., 2021). In dieser Arbeit erreichte UR-MB-158 einen deutlich höheren pEC_{50} -Wert von $9,24 \pm 0,98$ an den rechten Vorhöfen von H₂-TG.

Bei genauer Betrachtung der Einzelmechanogramme von WT scheint bei hohen Konzentrationen von UR-MB-158 ein leichter positiv inotroper Effekt aufzutreten. Dieser ist nicht signifikant, zog sich aber durch alle Versuche mit UR-MB-158. Der Effekt ist in Anwesenheit von Famotidin ebenso ausgeprägt wie in seiner Abwesenheit, weshalb von einer Histamin H₂-Rezeptor-unabhängigen Wirkung auszugehen ist. Es lässt sich vermuten, dass UR-MB-158 in sehr hohen Konzentrationen (ab 10 μ M) einen off-target Effekt hervorrufen könnte, wobei noch unklar ist, wie dieser vermittelt wird.

UR-MB-158 wäre nicht der erste Histamin H₂-Rezeptor-Agonist, der auch über andere Rezeptoren eine Wirkung entfaltet. Studien mit dem Histamin H₂-Rezeptor-Agonisten Amthamin an narkotisierten Ratten haben gezeigt, dass es in hohen Konzentrationen über zwei Mechanismen mit dem adrenergen System interagiert (Coruzzi et al., 1996). Zum einen wirkt es direkt an den postsynaptischen α_2 -Adrenozeptoren des

Gefäßendothels vasopressorisch (Coruzzi et al., 1996). Zum anderen induziert es die Freisetzung von Noradrenalin an den sympathischen Nervenendigungen des Herzens und steigert so die Schlagfrequenz (Coruzzi et al., 1996).

Zur genaueren Differenzierung des Effektes von UR-MB-158 bei WT würden sich Versuche mit Antagonisten anderer am Mausvorhof vorhandener Rezeptoren anbieten (zum Beispiel dem β -Adrenozeptor) und Wirkstoffen die an sympathischen Nervenendigungen agieren (zum Beispiel der Wiederaufnahmehemmer Reserpin (Mandela et al., 2010)). Für die klinische Anwendung von UR-MB-158 könnte dieser off-target Effekt allerdings eine eher untergeordnete Rolle spielen, denn UR-MB-158 zeigt für den positiv inotropen Effekt am Histamin H_2 -Rezeptor einen sehr hohen pEC_{50} -Wert von $9,86 \pm 0,27$. Die maximale Wirkung am Histamin H_2 -Rezeptor erreicht es daher schon in deutlich niedrigeren Konzentrationen als für den off-target Effekt nötig sind. Zwar müsste das therapeutische Fenster kleiner gewählt werden, um unerwünschte Wirkungen zu reduzieren, die Wirkung am Histamin H_2 -Rezeptor könnte aber wahrscheinlich trotzdem uneingeschränkt erreicht werden.

5.2.4. Wirkung von UR-MB-159

UR-MB-159 hatte einen positiv inotropen Effekt bei den linken Vorhöfen von H_2 -TG und führte bei zwei narkotisierten H_2 -TG Mäusen in der Echokardiografie zu einer Steigerung der Ejektionsfraktion und der Herzfrequenz. Wie auch schon bei UR-Po563 und UR-MB-158 löste Famotidin an den Vorhöfen eine Rechtsverschiebung dieses Effektes aus. Deshalb ist auch bei UR-MB-159 von einer Wirkung am Histamin H_2 -Rezeptor auszugehen. Dies stimmt überein mit der zuvor von Tropmann et al. beschriebenen Affinität ($pK_i=7,27$) von UR-MB-159 zum Histamin H_2 -Rezeptor (Tropmann et al., 2021). Damit ist die Affinität etwas niedriger als die von UR-Po563 und UR-MB-158, es ist aber trotzdem sehr selektiv im Vergleich zu den Affinitäten zum Histamin H_1 -, H_3 - und H_4 -Rezeptor (Tropmann et al., 2021).

An den rechten Vorhöfen verhielt es sich bei UR-MB-159 ähnlich wie bei UR-MB-158: es war eine Steigerung der Herzfrequenz zu sehen, jedoch nicht in signifikantem Maße; in den echokardiografischen Versuchen hingegen war ein eindrucklicher positiv chronotroper Effekt vorhanden. Schon zuvor wurde ein positiv chronotroper Effekt am rechten Vorhof vom Meerschweinchen beschrieben (Tropmann et al., 2021). Hier lag der pEC_{50} -Wert mit $7,42 \pm 0,10$ (Tropmann et al., 2021) allerdings niedriger als bei H_2 -TG in dieser Arbeit mit Werten von $8,07 \pm 0,55$.

Interessanterweise sind an den rechten WT-Vorhöfen positiv chronotrope Wirkungen durch UR-Po563, UR-MB-158 und UR-MB-159 aufgetreten, die durch Famotidin gehemmt werden konnten. Tatsächlich gibt es sehr unterschiedliche Berichte über die Histaminwirkung am Herzen von WT Mäusen. So wirkte Histamin zum Teil H₂-Rezeptor-vermittelt negativ inotrop und positiv chronotrop, mit einhergehender cAMP Erhöhung (Goren et al., 1994), zum Teil aber auch positiv inotrop (Liu et al., 2002). Auch über histamininduzierte Arrhythmien und Beeinflussung der Histaminwirkung durch Famotidin bei WT wurde berichtet (He et al., 2012).

All dies weist auf die Existenz und eine funktionelle Rolle des Histamin H₂-Rezeptors bei Mäusen hin. Bei dem hier verwendeten Mausmodell war bisher allerdings keine H₂-Rezeptor-vermittelten Effekte bei WT nachweisbar (Gergs et al., 2019). Es konnte zwar ein leichter positiv inotroper Effekt bei WT durch hohe Konzentrationen Histamin (100 µM) gezeigt werden, dieser schien aber nicht H₂-Rezeptor-vermittelt zu sein, sondern wurde auf die Freisetzung von Noradrenalin zurückgeführt (Neumann et al., 2021d). Es gab bereits zuvor Berichte über einen indirekten Mechanismus der Histaminwirkung durch Freisetzung von endogenen Katecholaminen an den Vorhöfen der Ratte (Laher und McNeill, 1980). In dieser Arbeit konnte der Effekt jedoch durch Famotidin gehemmt werden und ist deshalb wohl auf den Histamin H₂-Rezeptor zurückzuführen.

Die rechten Vorhöfe von WT reagierten zwar nicht auf Histamin (siehe 4.2.1. und 5.2.1.), allerdings besitzen die drei neuen Substanzen deutlich höhere pEC₅₀-Werte als Histamin (siehe Tab. 1). Außerdem gelang – wie bereits erwähnt – die Quantifizierung des endogenen Histamin H₂-Rezeptor-Proteins bei WT nicht, obwohl der Rezeptor auf RNA-Ebene nachgewiesen werden konnte (siehe 5.1.1). Deshalb muss in Betracht gezogen werden, dass der Histamin H₂-Rezeptor am Sinusknoten von WT vorhanden sein könnte, wenn auch sicherlich in deutlich geringerer Dichte als bei H₂-TG.

Auffällig waren bei den drei Substanzen auch die Relaxationszeiten: Normalerweise wäre bei dem positiv inotropen Effekt bei H₂-TG eine Verkürzung der Relaxationszeit zu erwarten gewesen, wie sie auch bei Histamin zu sehen war (siehe 4.2.1. und 5.2.1.). Bei WT war hingegen mit keiner Veränderung der Relaxationszeit zu rechnen. Dies war jedoch nur zum Teil der Fall, teilweise gab es keine Verkürzung der Relaxationszeit bei H₂-TG oder aber sie trat bei WT auf. Die Ergebnisse stimmen also nicht mit der zu erwartenden Histamin H₂-Rezeptor vermittelten Wirkung überein.

Es könnte nun spekuliert werden, ob die neuen Substanzen oder Famotidin neben der rezeptorvermittelten Wirkung auch direkt mit Ionenkanälen interagieren. Schließlich ist auch von anderen Wirkstoffen wie beispielsweise den Dopamin-Rezeptor-Antagonisten

Metoclopramid und Domperidon bekannt, dass sie kardiale Natrium- und Kalium-Kanäle direkt hemmen können, was deren kardiotoxische Nebenwirkungen erklären könnte (Claassen und Zünkler, 2005; Stoetzer et al., 2017). Ebenso scheint der H₁-Rezeptor-Antagonist Mepyramin kardiale Kalium-Kanäle zu hemmen (Liu et al., 2007). Da der auswärtsgerichtete Kalium-Strom in den Kardiomyozyten die Repolarisation bedingt (Pape et al., 2014), wäre eine Beeinflussung der Relaxationszeit durch Modulation des Kalium-Stroms durchaus denkbar. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen jedoch keine Schlussfolgerung auf eine solche Wirkung zu, da hierfür weitere Versuche an isolierten Kardiomyozyten notwendig wären.

Auf Grund der großen Streuung und niedrigen Versuchszahl ist eine klare Aussage über die Beeinflussung der Relaxationszeit nicht möglich.

5.2.5. Vergleich der Histamin H₂-Rezeptor-Agonisten

Ein Vergleich der Mechanogramme von UR-Po563, UR-MB-158 und UR-MB-159 mit dem von Histamin zeigte, dass die Kontraktionskraft bei den drei neuen H₂-Rezeptor-Agonisten weniger steil ansteigt als bei Histamin und es insgesamt länger dauert bis das Wirkmaximum einer Konzentration erreicht ist. Dieser Unterschied könnte durch unterschiedliche Signaltransduktionswege erklärt werden, jedoch konnte bei UR-Po563 die Phosphorylierung von Phospholamban an Serin-16 und Threonin-17 nachgewiesen werden. Dies lässt auf den bekannten Signaltransduktionsweg des Histamin H₂-Rezeptors schließen. Womöglich liegt der Grund für diesen Effekt aber schon einen Schritt vor der Signaltransduktion, nämlich bei der Liganden-Rezeptor-Bindungskinetik: Verschiedene Liganden desselben G-Protein-gekoppelten Rezeptors können sich auch in ihrer Assoziationsgeschwindigkeits-Konstanten unterscheiden (van der Velden et al., 2020). Dies kann beispielsweise an ligandeninduzierten Konformationsänderungen oder Wasserumlagerungen liegen (Schuetz et al., 2017). Die Geschwindigkeit, mit der sich Ligand und Rezeptor zu einem Komplex verbinden, kann demnach den Wirkungseintritt verzögern oder beschleunigen. Bereits beschrieben wurden solche unterschiedlichen Assoziationsgeschwindigkeits-Konstanten beispielsweise bei β -Adrenozeptor-Agonisten (Ramos et al., 2018) und bei Histamin H₁-Rezeptor-Antagonisten (Bosma et al., 2019).

5.2.6. Wirkung von Famotidin

In der Literatur gibt es kontroverse Diskussionen über den Einfluss von Famotidin auf die basale Herzfunktion. Kirch et al. berichteten 1987 und weiter ausgeführt 1988 als

Erste über einen möglichen negativ inotropen Effekt von Famotidin (Kirch et al., 1987; Kirch et al., 1988). Bei gesunden Probanden führte eine einwöchige Behandlung mit 40 mg Famotidin pro Tag zum Abfall des Schlagvolumens und des Herzzeitvolumens in der Impedanzkardiographie, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Herzfrequenz und den Blutdruck (Kirch et al., 1987; Kirch et al., 1988). Die Ergebnisse wurden später bestätigt und mit anderen Histamin H₂-Rezeptor-Antagonisten (Cimetidin und Rantidin) verglichen, bei denen keine negativ inotropen Effekte nachweisbar waren (Hinrichsen et al., 1990).

Viele Berichte anderer Forschungsgruppen widersprachen dem und konnten bei gesunden Probanden echokardiografisch keinen Einfluss von Famotidin auf die linksventrikuläre Kontraktilität feststellen (Salmon et al., 1991; Borow et al., 1992; Hilleman et al., 1992), teilweise aber eine Reduktion der Herzfrequenz (Borow et al., 1992). Bei Versuchen mit rechten Vorhöfen vom Meerschweinchen wurden keine Einflüsse von Famotidin auf die basale Schlagfrequenz beobachtet (Black et al., 1985; Krielaart et al., 1990).

In dieser Arbeit war ein negativ inotroper und chronotroper Effekt von Famotidin auf die Basalwerte bei H₂-TG zu sehen. Dabei fällt auf, dass die Ausgangskraft deutlich höher war als in den anderen Versuchsreihen. Insgesamt glichen sich die unter Basalbedingungen höheren Werte von H₂-TG nach Behandlung mit Famotidin denen von WT an. Gründe dafür könnten die Antagonisierung von endogenem Histamin und die Wirkung von Famotidin als inverser Agonist an dem konstitutiv aktivem G-Protein-gekoppeltem Histamin H₂-Rezeptor sein (siehe 5.2.1.).

Ein negativ inotroper und chronotroper Effekt wurde auch schon bei anderen Histamin H₂-Rezeptor-Antagonisten beschrieben. Coruzzi et al. zeigten für Oxmetidin und SKF 9347, dass sie in hohen Konzentrationen beim Menschen negativ inotrop und beim Kaninchen zusätzlich negativ chronotrop auf die Basalwerte wirkten (Coruzzi et al., 1983). Die kardiodepressiv wirkenden Konzentrationen von Oxmetidin beim Kaninchen entsprachen dabei den hier verwendeten Konzentrationen von Famotidin. Als Ursache sahen die Autoren keine H₂-vermittelte Wirkung an, sondern eine Hemmung von Calciumtransport und -verwertung (Coruzzi et al., 1983). Weil der Effekt erst bei hohen Konzentrationen eintrat, stellten sie jedoch dessen klinische Relevanz in Frage (Coruzzi et al., 1983). Um die Relevanz des hier festgestellten negativ inotropen und chronotropen Effektes von Famotidin einzuordnen, wären weitere Versuche notwendig. Sollte sich die Wirkung bestätigen, könnte das bedeuten, dass Famotidin bei Patienten mit Herzinsuffizienz eher vorsichtig eingesetzt werden sollte.

In den weiteren Versuchen hemmte Famotidin erfolgreich die Wirkung der drei neuen Substanzen am Histamin H₂-Rezeptor und führte zu einer Rechtsverschiebung der positiv inotropen und chronotropen Effekte. Dabei betrug die Einwirkzeit von Famotidin im Organbad 30 Minuten. Nach dieser Zeit konnte allerdings teilweise noch ein weiterer Abfall der Werte beobachtet werden und es gibt Berichte, dass Famotidin erst nach 60 Minuten seinen vollen inhibitorischen Effekt erreicht (Krielaart et al., 1990). Womöglich wird also der negativ inotrope und chronotrope Effekt von Famotidin wie auch der positiv inotrope und chronotrope Effekt der neuen Substanzen hier noch unterschätzt.

5.2.7. Wirkung von Histamin in Anwesenheit von Isoprenalin

Neumann et al. machten die überraschende Beobachtung, dass bei H₂- und 5-HT₄-doppelt transgenen Mäusen sowie an menschlichen Vorhofpräparaten die beiden Rezeptoren inhibitorisch interagierten (Neumann et al., 2021b). Genauso wie der Histamin H₂-Rezeptor (siehe 1.3.) ist auch der Serotonin 5-HT₄-Rezeptor G_S-gekoppelt und ruft bei seiner Aktivierung normalerweise einen positiv inotropen Effekt hervor (Kaumann und Levy, 2006). Allerdings führte die kumulative Gabe von Histamin in Anwesenheit von 5-HT bei niedrigen Konzentrationen zunächst zu einem negativ inotropen Effekt, der erst in höheren Konzentrationen in einen positiv inotropen Effekt umschlug (Neumann et al., 2021b). Dabei kam es auch auf die Reihenfolge der applizierten Substanzen an: Bei Gabe von 5-HT in Anwesenheit von Histamin war dieses Phänomen nicht zu beobachten (Neumann et al., 2021b).

Die Autoren vermuteten eine Art Schutzmechanismus vor zu hohen Konzentrationen von 5-HT am Herzen, wie sie zum Beispiel bei Thrombosen auftreten können (Neumann et al., 2021b). Als Ursache für dieses Phänomen wird die doppelte Kopplung des Histamin H₂-Rezeptors an G_i-Proteine vermutet, wodurch die zuvor von 5-HT aktivierte Adenylatzyklase gehemmt wird (Neumann et al., 2021b). Auch eine Wirkung über Histamin H₁-Rezeptoren wurde in Betracht gezogen (Neumann et al., 2021b). Es konnte schon früher an menschlichen Vorhofpräparaten gezeigt werden, dass Histamin über den Histamin H₁-Rezeptor einen negativ inotropen Effekt hervorrufen kann, während über Histamin H₂-Rezeptoren der positiv inotrope Effekt vermittelt wird (Guo et al., 1984).

Da auch der β -Adrenozeptor G_S-gekoppelt ist (Hartzell, 1988) wurde in dieser Arbeit geprüft, ob die inhibitorische Interaktion des Histamin H₂-Rezeptors auch auf diesen Rezeptor übertragbar ist. Die Gabe von 1 μ M des β -Adrenozeptoren-Agonisten Isoprenalin führte – wie erwartet – zu einem positiv inotropen und chronotropen Effekt sowohl bei WT als auch bei H₂-TG. Während der anschließenden kumulativen Gabe von

Histamin sank die Kontraktionskraft zwar leicht und die Wirkung von Histamin war leicht nach rechts verschoben, jedoch nicht in dem Ausmaß wie bei den Versuchen von Neumann et al. Außerdem war die leichte Abnahme der Kontraktionskraft auch bei WT-Mäusen zu beobachten. Beides spricht eher für eine zeitabhängige Erschlaffung als für einen rezeptorvermittelten negativ inotropen Effekt.

Somit stellt sich die Frage, warum der Histamin H₂-Rezeptor inhibitorisch mit dem Serotonin 5-HT₄-Rezeptor interagiert, nicht aber mit dem β-Adrenozeptor. Unter der Annahme, dass der hemmende Effekt von Histamin auf G_i-Protein-Kopplung zurückzuführen ist, würden die Ergebnisse für unterschiedliche Signaltransduktionswege des Serotonin 5-HT₄-Rezeptors und des β-Adrenozeptors sprechen. Um dies zu überprüfen, müsste zunächst die Vermittlung des negativ inotropen Effektes über G_i-Protein-Kopplung bestätigt werden. Hierzu könnten Versuche mit Pertussis Toxin hilfreich sein, das die Wirkung des G_i-Proteins auf die Adenylatcyclase hemmt (Ui, 1984). Zugleich könnte damit eine mögliche inhibitorische Interaktion zwischen dem Histamin H₂- und dem β-Adrenozeptor demaskiert werden.

Im Gegensatz zu den hier vorgestellten Ergebnissen mit Histamin konnten Hattori et al. an Papillarmuskeln des Kaninchen zeigen, dass 5-HT einen negativ inotropen Effekt auf die Wirkung von Isoprenalin ausübt (Hattori et al., 1992). Dabei konnte ein G_i-Protein-abhängiger Effekt ausgeschlossen werden und die Autoren vermuteten eine direkte Blockierung des β-Adrenozeptors durch 5-HT. Die in der Studie verwendeten Konzentrationen von Isoprenalin (10 nM) und 5-HT (100 μM) liegen allerdings deutlich weiter auseinander als die von Isoprenalin (1 μM) und Histamin (10 μM) in dieser Arbeit. Ein Vergleich in Bezug auf einen kompetitiven Antagonismus am β-Adrenozeptor ist somit schwer möglich und die Ergebnisse dieser Arbeit liefern keinen Hinweis auf solch eine Interaktion. Für die inhibitorische Interaktion von Histamin und 5-HT hingegen könnte dies einen weiteren Erklärungsansatz bieten, falls keine Beteiligung des G_i-Proteins vorläge.

5.3. Klinischer Ausblick

Entwickelt – und für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt – wurden die neuen H₂-Rezeptor-Agonisten UR-Po563, UR-MB-158 und UR-MB-159 von der Arbeitsgruppe um Dr. rer. nat. Steffen Pockes (Institut für Pharmazie, Universität Regensburg) als eine mögliche Therapieoption zur Behandlungen von Morbus Alzheimer, denn es gibt Hinweise auf eine fördernde Wirkung von Histamin H₂-Rezeptoren im ZNS auf Gedächtnisprozesse (Khan et al., 2016; Sadek et al., 2016). In diesem Fall wären die in

dieser Arbeit beschriebenen kardialen Effekte als Nebenwirkungen zu verstehen und müssten möglicherweise blockiert werden. Mit dem H₂-Rezeptor-Antagonist Famotidin wäre wohl eine Hemmung des peripheren Effektes bei gleichzeitig erhaltener Wirkung im ZNS möglich, da Famotidin nicht die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann (Panula et al., 2015). In diesem Zusammenhang könnte sogar von Vorteil sein, dass UR-Po563 an menschlichen Vorhofpräparaten deutlich geringere pEC₅₀-Werte zeigte als im Mausmodell. Je nachdem wie hoch dessen Potenz im Gehirn und dementsprechend die nötige Konzentration zur Behandlung von Morbus Alzheimer wäre, könnten hier die kardialen Nebenwirkungen in klinischer Anwendung weniger stark ausgeprägt sein.

Neben der Wirkung im ZNS wird auch über eine mögliche Rolle von Histamin H₂-Rezeptoren zur Behandlung der Herzinsuffizienz berichtet – umstritten ist jedoch, in welcher Art sie therapeutisch eingesetzt werden können. Einerseits konnte gezeigt werden, dass kardiale Histamin H₂-Rezeptoren nach Infarkt und bei Herzinsuffizienz erhalten bleiben und unverändert positiv inotrop wirken, während die Dichte und der positiv inotrope Effekt von β -Adrenozeptoren vermutlich auf Grund von erhöhten Katecholaminspiegeln abnimmt (Baumann et al., 1982; Baumann et al., 1983). Diese Abnahme konnte durch Behandlung mit β -Blockern in der postischämischen Phase verhindert werden (Baumann et al., 1982). Die Forschungsgruppe konnte sogar in vivo bei Patienten mit Herzinsuffizienz durch den H₂-Rezeptor-Agonisten Impromidin positiv inotrope Effekte nachweisen, zum Beispiel über eine Steigerung des Herzzeitvolumens und einen Abfall des Lungenkapillarverschlussdruckes (Baumann et al., 1984). Daneben wurde von weiteren Effekten berichtet wie beispielsweise der Senkung der Vor- und Nachlast und einer insgesamt massiven klinischen Verbesserung bei den Patienten – jedoch auch von Nebenwirkungen wie Hautrötungen (Baumann et al., 1984).

Andererseits gibt es auch Berichte die Baumann et al. widersprechen. So ließ sich zwar durchaus die Korrelation einer Abnahme der β -Adrenozeptoren mit der Schwere der Herzinsuffizienz bestätigen (Böhm et al., 1988), allerdings auch eine Abnahme der positiv inotropen Wirkung von Histamin H₂-Rezeptoren bei schwerer Herzinsuffizienz (Brown et al., 1986; Böhm et al., 1988).

Darüber hinaus gibt es zahlreiche Hinweise, dass der Histamin H₂-Rezeptor an der Entstehung von Herzinsuffizienz, der Induktion von Hypertrophie und Apoptose in Kardiomyozyten und von dem fibrotischen Umbau des Herzens beteiligt ist (Patella et al., 1998; Luo et al., 2013; Leary et al., 2016b; Leary et al., 2018; Levick, 2022). Folgerichtig wird eine kardioprotektive Rolle von H₂-Rezeptor-Antagonisten erwogen. Dabei wurde gezeigt, dass eine 10-jährige Einnahme von H₂-Rezeptor-Antagonisten mit einem

niedrigeren Risiko für Herzinsuffizienz verbunden ist (Leary et al., 2014; Leary et al., 2016a).

In weiteren Studien führte Famotidin zu einer Verbesserung der Symptome von Herzinsuffizienz und einer Verminderung des kardialen Remodelings bei Patienten (Kim et al., 2006). Im Mausmodell konnte eine verminderte Infarktgröße beobachtet werden, während H₂-Rezeptor-Agonisten die Infarktgröße steigerten (Luo et al., 2013). Die kardioprotektive Wirkung von H₂-Rezeptor-Antagonisten ist jedoch umstritten, da der negativ inotrope Effekt, der auch in dieser Arbeit sehr ausgeprägt war (siehe 4.2.5. und 5.2.5.), bei Herzinsuffizienz nachteilig sein könnte (Zhang et al., 2018).

Im Mausmodell war die kardioprotektive oder -schädliche Wirkung von Histamin H₂-Rezeptoren regions- und kontextabhängig: Bei Hypoxie der isolierten Vorhöfe sowie genetisch induzierter Herzhypertrophie wirkte der Histamin H₂-Rezeptor kardioprotektiv, während bei globaler Ischämie und toxininduzierter Herzinsuffizienz eher ein schädlicher Einfluss des H₂-Rezeptors zu sehen war (Gergs et al., 2020).

Die Wirkung des Histamin H₂-Rezeptors bei kardialen Erkrankungen ist also kompliziert und noch nicht vollständig geklärt. Eine Therapie mit UR-Po563, UR-MB-158 und UR-MB-159, um die Herzfunktion bei Herzinsuffizienz oder postischämisch aufrecht zu erhalten, kombiniert mit β -Blockern zur Vermeidung der Desensibilisierung der β -Adrenozeptoren wäre auf Grund der hier festgestellten positiven Inotropie unter Umständen denkbar, müsste jedoch sicher noch weiter untersucht werden. Auch die höheren pEC₅₀-Werte der Substanzen im Vergleich zu Histamin und anderen H₂-Rezeptor-Agonisten (siehe Tabelle 1) könnten von Vorteil sein, da vermutlich niedrigere Konzentrationen nötig wären, was unerwünschte Wirkungen reduzieren könnte. Hierbei sticht vor allem UR-MB-158 hervor. Wie bereits erwähnt, ist jedoch bei der Übertragung der pEC₅₀-Werte auf den Menschen Vorsicht geboten, was schon bei den Versuchen mit menschlichen Präparaten sichtbar wurde. In diesem Sinne wären weitere Versuche mit UR-MB-158 und UR-MB-159 an menschlichen Vorhofpräparaten eine sinnvolle Ergänzung der hier vorgestellten Ergebnisse.

Entscheidend für die klinische Anwendung scheint das Risiko für unerwünschte Folgen bei langfristiger Einnahme wie der Förderung des fibrotischen Umbaus und der Entstehung einer Herzinsuffizienz. Diese sind mit den hier verwendeten Methoden nicht beurteilbar, könnten den Einsatz der H₂-Rezeptor-Agonisten jedoch stark einschränken. Weiterhin muss bedacht werden, dass die Substanzen nicht spezifisch auf die Inotropie wirken. So kann zugleich ein positiv chronotroper Effekt ausgelöst werden und damit einhergehend ein erhöhter Sauerstoffbedarf des Myokards, was bei Herzinsuffizienz

nachteilig wäre. Auch die Magensäuresekretion ist H₂-Rezeptor-vermittelt und könnte stimuliert werden. Baumann et al. berichteten allerdings in den in vivo Versuchen von einem selbsthemmenden Mechanismus der Magensäuresekretion, sodass dies kein großes Problem zu sein schien (Baumann et al., 1984). Ferner sollten weitere H₂-Rezeptor-vermittelte unerwünschte Wirkungen wie Koronarspasmen (Ginsburg et al., 1981) und Arrhythmien (Wolff und Levi, 1986) bei klinischer Anwendung im Blick behalten werden.

Zuletzt sei darauf hingewiesen, dass Patienten im klinischen Alltag häufig mehrere Medikamente parallel nehmen. Durch Medikamenteninteraktionen kann daher die Wirkung der Substanzen in der klinischen Anwendung von der unter Versuchsbedingungen abweichen. Bekannt ist beispielsweise, dass das Antidepressivum Amitriptylin durch Antagonismus am Histamin H₂-Rezeptor die kardialen Wirkungen von Histamin abschwächt (Neumann et al., 2021a).

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die kardialen Effekte von drei neuen ZNS-gängigen Histamin H₂-Rezeptor-Agonisten – UR-Po563, UR-MB-158 und UR-MB-159 – charakterisiert, welche von der kooperierenden Arbeitsgruppe um Dr. rer. nat. Steffen Pockes (Institut für Pharmazie, Universität Regensburg) entwickelt wurden.

Der humane Histamin H₂-Rezeptor ist dafür bekannt, am Herz einen positiv inotropen und positiv chronotropen Effekt zu vermitteln. Der G_s-Protein-gekoppelte Rezeptor erzielt diese Wirkung über Aktivierung der AC, die den intrazellulären cAMP-Spiegel steigert. Hierdurch wird die PKA aktiviert, was die Phosphorylierung einer Reihe von Zielproteinen auslöst und deren Aktivität entsprechend moduliert.

Um die Wirkung der Substanzen am Herzen zu charakterisieren, wurden Versuche mit H₂-Rezeptor-überexprimierenden Mäusen (H₂-TG) im Vergleich zu Wildtyp Mäusen (WT) durchgeführt. Auch die Wirkung an elektrisch stimulierten menschlichen Vorhofpräparaten wurde untersucht. In Western Blot-Analysen der Mauspräparate wurde zudem der Phosphorylierungszustand von Phospholamban überprüft, welches bekanntermaßen infolge der Aktivierung des Histamin H₂-Rezeptors phosphoryliert wird.

An den elektrisch stimulierten (1 Hz) linken Vorhöfen von H₂-TG führten UR-Po563, UR-MB-158 und UR-MB-159 analog zu Histamin zu einer Steigerung der Kontraktionskraft, Verkürzung der Kontraktionszeit, Steigerung der Kontraktions- und der Relaxationsgeschwindigkeit. Diese Effekte waren bei WT nicht vorhanden. An den spontan schlagenden rechten Vorhöfen führten die drei Substanzen zu einem positiv chronotropen Effekt. Die Wirkungen an den linken und rechten Vorhöfen konnte durch den Histamin H₂-Rezeptor-Antagonisten Famotidin blockiert werden. Die drei Substanzen waren äußerst potent, insbesondere UR-MB-158 zeigte sehr hohe pEC₅₀-Werte im Vergleich zu anderen H₂-Rezeptor-Agonisten.

UR-Po563 wurde zusätzlich an elektrisch stimulierten (1 Hz) menschlichen Vorhofpräparaten untersucht und bewirkte die gleichen Effekte wie am linken Vorhof von H₂-TG. Auch in Versuchen am kompletten isolierten Herz führte UR-Po563 zu positiv inotropen und chronotropen Effekt bei H₂-TG, nicht aber bei WT. In vivo zeigten die drei Substanzen echokardiografisch eine Steigerung der Ejektionsfraktion, der systolischen Wandbewegung und der Schlagfrequenz bei H₂-TG, nicht aber bei WT.

Mit Western Blots wurde zudem gezeigt, dass UR-Po563 zu einer Steigerung der Phosphorylierung von Phospholamban an den Aminosäuren Serin-16 und Threonin-17

in Proben von linken und rechten Vorhöfen sowie Ventrikeln von H₂-TG führt. Bei WT stieg die Phosphorylierung nicht.

Außerdem wurde ein negativ inotroper Effekt und negativ chronotroper Effekt von Famotidin an den Vorhöfen von H₂-TG nachgewiesen.

In weiteren Versuchen konnte keine inhibitorische Interaktion zwischen dem Histamin H₂-Rezeptor und dem β -Adrenozeptor gezeigt werden.

Zusammenfassend zeigten UR-Po563, UR-MB-158 und UR-MB-159 eine kardiostimulierende Wirkung, welche durch den Histamin H₂-Rezeptor vermittelt wurde. Bei einer Anwendung zur Behandlung von ZNS-Erkrankungen wie beispielsweise Morbus Alzheimer sollte eine Blockierung der kardialen Wirkung durch einen nicht-ZNS-gängigen H₂-Rezeptor-Antagonisten wie Famotidin in Betracht gezogen werden.

7. Literaturverzeichnis

- Ackermann, D (1910) Über den bakteriellen Abbau des Histidins. Hoppe- Seyler's Z. für physiologische Chem. 65, 504–510. doi:10.1515/bchm2.1910. 65.5-6.504
- Aldi S, Takano K, Tomita K, Koda K, Chan NY-K, Marino A, Salazar-Rodriguez M, Thurmond RL, Levi R (2014) Histamine H4-receptors inhibit mast cell renin release in ischemia/reperfusion via protein kinase C ϵ -dependent aldehyde dehydrogenase type-2 activation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 349:508–517. doi:10.1124/jpet.114.214122
- Baumann G, Felix SB, Riess G, Loher U, Ludwig L, Blömer H (1982) Effective stimulation of cardiac contractility and myocardial metabolism by impromidine and dimaprit--two new H₂-agonistic compounds--in the surviving, catecholamine-insensitive myocardium after coronary occlusion. *Journal of cardiovascular pharmacology* 4:542–553. doi:10.1097/00005344-198207000-00004
- Baumann G, Mercader D, Busch U, Felix SB, Loher U, Ludwig L, Sebening H, Heidecke CD, Hagl S, Sebening F, Blömer H (1983) Effects of the H₂-receptor agonist impromidine in human myocardium from patients with heart failure due to mitral and aortic valve disease. *Journal of cardiovascular pharmacology* 5:618–625. doi:10.1097/00005344-198307000-00017
- Baumann G, Permanetter B, Wirtzfeld A (1984) Possible value of H₂-receptor agonists for treatment of catecholamine-insensitive congestive heart failure. *Pharmacology & Therapeutics* 24:165–177. doi:10.1016/0163-7258(84)90033-0
- Belevych AE, Juranek I, Harvey RD (2004) Protein kinase C regulates functional coupling of beta1-adrenergic receptors to Gi/o-mediated responses in cardiac myocytes. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18:367–369. doi:10.1096/fj.03-0647fj
- Best C, Dale H, Dudley H, Thorpe W (1927) The nature of the vaso-dilator constituents of certain tissue extracts. *The Journal of physiology* 62:397-417. doi:10.1113/jphysiol.1927.sp002369
- Biegański T, Kusche J, Lorenz W, Hesterberg R, Stahlknecht CD, Feussner KD (1983) Distribution and properties of human intestinal diamine oxidase and its relevance for the histamine catabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 756:196–203. doi:10.1016/0304-4165(83)90092-2
- Biselli S, Bresinsky M, Tropmann K, Forster L, Honisch C, Buschauer A, Bernhardt G, Pockes S (2021) Pharmacological characterization of a new series of carbamoylguanidines reveals potent agonism at the H₂R and D₃R. *European journal of medicinal chemistry* 214:113190. doi:10.1016/j.ejmech.2021.113190
- Black JW, Duncan WA, Durant CJ, Ganellin CR, Parsons EM (1972) Definition and antagonism of histamine H₂-receptors. *Nature* 236:385–390. doi:10.1038/236385a0
- Black JW, Leff P, Shankley NP (1985) Further analysis of anomalous pK_B values for histamine H₂-receptor antagonists on the mouse isolated stomach assay. *British journal of pharmacology* 86:581–587. doi:10.1111/j.1476-5381.1985.tb08934.x
- Böhm M, Beuckelmann D, Brown L, Feiler G, Lorenz B, Näbauer M, Kemkes B, Erdmann E (1988) Reduction of beta-adrenoceptor density and evaluation of positive inotropic responses in isolated, diseased human myocardium. *European heart journal* 9:844–852. doi:10.1093/oxfordjournals.eurheartj.a062577

- Borow KM, Ehler D, Berlin R, Neumann A (1992) Influence of histamine receptors on basal left ventricular contractile tone in humans: Assessment using the H₂receptor antagonist famotidine and the beta-adrenoceptor antagonist esmolol as pharmacologic probes. *Journal of the American College of Cardiology* 19:1229–1236. doi:10.1016/0735-1097(92)90329-L
- Bosma R, Stoddart LA, Georgi V, Bouzo-Lorenzo M, Bushby N, Inkoom L, Waring MJ, Briddon SJ, Vischer HF, Sheppard RJ, Fernández-Montalván A, Hill SJ, Leurs R (2019) Probe dependency in the determination of ligand binding kinetics at a prototypical G protein-coupled receptor. *Scientific reports* 9:7906. doi:10.1038/s41598-019-44025-5
- Brandes LJ, Queen GM, LaBella FS (2002) Displacement of histamine from liver cells and cell components by ligands for cytochromes P450. *Journal of cellular biochemistry* 85:820–824. doi:10.1002/jcb.10177
- Bristow MR, Ginsburg R, Harrison DC (1982a) Histamine and the human heart: The other receptor system. *The American journal of cardiology* 49:249–251. doi:10.1016/0002-9149(82)90298-3
- Bristow MR, Cubicciotti R, Ginsburg R, Stinson EB, Johnson C (1982b) Histamine-mediated adenylate cyclase stimulation in human myocardium. *Molecular pharmacology* 21:671–679
- Brown L, Lorenz B, Erdmann E (1986) Reduced positive inotropic effects in diseased human ventricular myocardium. *Cardiovascular research* 20:516–520. doi:10.1093/cvr/20.7.516
- Chan NY-K, Robador PA, Levi R (2012) Natriuretic peptide-induced catecholamine release from cardiac sympathetic neurons: inhibition by histamine H₃ and H₄ receptor activation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 343:568–577. doi:10.1124/jpet.112.198747
- Claassen S, Zünkler BJ (2005) Comparison of the effects of metoclopramide and domperidone on HERG channels. *Pharmacology* 74:31–36. doi:10.1159/000083234
- Coruzzi G, Poli E, Bertaccini G (1983) Cardiac effects of the new H₂-receptor antagonists. *Agents and actions* 13:173–178. doi:10.1007/BF01967325
- Coruzzi G, Gambarelli E, Bertaccini G, Timmerman H (1996) Cardiovascular effects of the novel histamine H₂ receptor agonist amthamine: interaction with the adrenergic system. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 353:417–422. doi:10.1007/BF00261438
- Dai S, Ogle CW (1990) Ventricular histamine concentrations and mast cell counts in the rat heart during acute ischaemia. *Agents and actions* 29:138–143. doi:10.1007/BF01966438
- Dale HH, Laidlaw PP (1910) The physiological action of beta-iminazolyethylamine. *The Journal of physiology* 41:318–344. doi:10.1113/jphysiol.1910.sp001406
- Dale HH, Laidlaw PP (1919) Histamine shock. *The Journal of physiology* 52:355-390. doi:10.1113/jphysiol.1919.sp001837
- Dart AM, Du XJ (1993) Unexpected drug effects on autonomic function during myocardial ischaemia. *Cardiovascular research* 27:906–914. doi:10.1093/cvr/27.6.906
- DiFrancesco D, Mangoni M (1994) Modulation of single hyperpolarization-activated channels (i(f)) by cAMP in the rabbit sino-atrial node. *The Journal of physiology* 474:473–482. doi:10.1113/jphysiol.1994.sp020038

- DiFrancesco D, Tortora P (1991) Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 351:145–147. doi:10.1038/351145a0
- Dy M, Lebel B, Kamoun P, Hamburger J (1981) Histamine production during the anti-allograft response. Demonstration of a new lymphokine enhancing histamine synthesis. *The Journal of experimental medicine* 153:293–309. doi:10.1084/jem.153.2.293
- Eckel L, Gristwood RW, Nawrath H, Owen DA, Satter P (1982) Inotropic and electrophysiological effects of histamine on human ventricular heart muscle. *The Journal of physiology* 330:111–123. doi:10.1113/jphysiol.1982.sp014332
- Gantz I, Schäffer M, DelValle J, Logsdon C, Campbell V, Uhler M, Yamada T (1991) Molecular cloning of a gene encoding the histamine H2 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:429–433. doi:10.1073/pnas.88.2.429
- Gergs U, Bernhardt G, Buchwalow IB, Edler H, Fröba J, Keller M, Kirchhefer U, Köhler F, Mißlinger N, Wache H, Neumann J (2019) Initial Characterization of Transgenic Mice Overexpressing Human Histamine H2 Receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 369:129–141. doi:10.1124/jpet.118.255711
- Gergs U, Kirchhefer U, Bergmann F, Künstler B, Mißlinger N, Au B, Mahnkopf M, Wache H, Neumann J (2020) Characterization of Stressed Transgenic Mice Overexpressing H2-Histamine Receptors in the Heart. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 374:479–488. doi:10.1124/jpet.120.000063
- Gergs U, Büxel ML, Bresinsky M, Kirchhefer U, Fehse C, Höring C, Hofmann B, Marušáková M, Čináková A, Schwarz R, Pockes S, Neumann J (2021a) Cardiac Effects of Novel Histamine H2 Receptor Agonists. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 379:223–234. doi:10.1124/jpet.121.000822
- Gergs U, Weisgut J, Griethe K, Mißlinger N, Kirchhefer U, Neumann J (2021b) Human histamine H2 receptors can initiate cardiac arrhythmias in a transgenic mouse. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 394:1963–1973. doi:10.1007/s00210-021-02098-y
- Ginsburg R, Bristow MR, Stinson EB, Harrison DC (1980) Histamine receptors in the human heart. *Life Sciences* 26:2245–2249. doi:10.1016/0024-3205(80)90209-X
- Ginsburg R, Bristow MR, Kantrowitz N, Baim D, Harrison DC (1981) Histamine provocation of clinical coronary artery spasm: Implications concerning pathogenesis of variant angina pectoris. *American Heart Journal* 102:819–822. doi:10.1016/0002-8703(81)90030-2
- Goren N, Leiros CP, Sterin-Borda L, Borda E (1994) Effect of histamine in autoimmune myocarditis mice. *International Journal of Immunopharmacology* 16:737–745. doi:10.1016/0192-0561(94)90093-0
- Gristwood RW, Lincoln JC, Owen DA, Smith IR (1981) Histamine release from human right atrium. *British journal of pharmacology* 74:7–9. doi:10.1111/j.1476-5381.1981.tb09947.x
- Gross SS, Guo ZG, Levi R, Bailey WH, Chenouda AA (1984) Release of histamine by sympathetic nerve stimulation in the guinea pig heart and modulation of adrenergic responses. A physiological role for cardiac histamine? *Circulation research* 54:516–526. doi:10.1161/01.res.54.5.516
- Guo ZG, Levi R, Graver LM, Robertson DA, Gay WA (1984) Inotropic effects of histamine in human myocardium: differentiation between positive and negative components. *Journal of cardiovascular pharmacology* 6:1210–1215

- Haas HL, Sergeeva OA, Selbach O (2008) Histamine in the nervous system. *Physiological reviews* 88:1183–1241. doi:10.1152/physrev.00043.2007
- Hartzell H (1988) Regulation of cardiac ion channels by catecholamines, acetylcholine and second messenger systems. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 52:165–247. doi:10.1016/0079-6107(88)90014-4
- Hattori Y, Sakuma I, Kanno M (1988) Differential effects of histamine mediated by histamine H₁- and H₂-receptors on contractility, spontaneous rate and cyclic nucleotides in the rabbit heart. *European journal of pharmacology* 153:221–229. doi:10.1016/0014-2999(88)90609-7
- Hattori Y, Endou M, Kanno M (1992) Inhibition by 5-hydroxytryptamine of the beta adrenoceptor-mediated positive inotropic responses to catecholamines in rabbit papillary muscles: direct interaction with beta adrenoceptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 261:1160–1166
- Hattori Y, Gando S, Nagashima M, Kanno M (1994) Histamine receptors mediating a positive inotropic effect in guinea pig and rabbit ventricular myocardium: distribution of the receptors and their possible intracellular coupling processes. *Japanese journal of pharmacology* 65:327–336. doi:10.1254/jjp.65.327
- Hattori Y, Hattori K, Matsuda N (2017) Regulation of the Cardiovascular System by Histamine. *Handbook of experimental pharmacology* 241:239–258. doi:10.1007/164_2016_15
- He G, Hu J, Ma X, Li M, Wang H, Meng J, Jia M, Luo X (2008) Sympathetic histamine exerts different pre- and post-synaptic functions according to the frequencies of nerve stimulation in guinea pig vas deferens. *Journal of neurochemistry* 106:1710–1719. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05532.x
- He G, Hu J, Li T, Ma X, Meng J, Jia M, Lu J, Ohtsu H, Chen Z, Luo X (2012) Arrhythmogenic Effect of Sympathetic Histamine in Mouse Hearts Subjected to Acute Ischemia. *Molecular Medicine* 18:1–9. doi:10.2119/molmed.2011.00225
- Herzig S, Neumann J (2000) Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. *Physiological reviews* 80:173–210. doi:10.1152/physrev.2000.80.1.173
- Hill SJ, Ganellin CR, Timmerman H, Schwartz JC, Shankley NP, Young JM, Schunack W, Levi R, Haas HL (1997) International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmacological reviews* 49:253–278
- Hilleman DE, Mohiuddin SM, Williams MA, Gannon JM, Mathias RJ, Thalken LJ (1992) Impact of chronic oral H₂-antagonist therapy on left ventricular systolic function and exercise capacity. *Journal of clinical pharmacology* 32:1033–1037. doi:10.1002/j.1552-4604.1992.tb03807.x
- Hinrichsen H, Halabi A, Kirch W (1990) Hemodynamic effects of different H₂-receptor antagonists. *Clinical pharmacology and therapeutics* 48:302–308. doi:10.1038/clpt.1990.153
- Hoffmann RJR, Gergs U, Hofmann B, Kirchhefer U, Neumann J (2023) Temperature alters the inotropic, chronotropic and proarrhythmic effects of histamine in atrial muscle preparations from humans and H₂-receptor overexpressing mice. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 396:2137–2150. doi:10.1007/s00210-023-02457-x
- Imamura M, Lander HM, Levi R (1996) Activation of histamine H₃-receptors inhibits carrier-mediated norepinephrine release during protracted myocardial ischemia.

- Comparison with adenosine A1-receptors and alpha2-adrenoceptors. *Circulation research* 78:475–481. doi:10.1161/01.res.78.3.475
- Jutel M, Akids M., Akids C.A. (2009) Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 39:1786-1800. doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03374.x
- Kaumann AJ, Levy FO (2006) 5-hydroxytryptamine receptors in the human cardiovascular system. *Pharmacology & Therapeutics* 111:674–706. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.12.004
- Khan N, Saad A, Nurulain SM, Darras FH, Decker M, Sadek B (2016) The dual-acting H3 receptor antagonist and AChE inhibitor UW-MD-71 dose-dependently enhances memory retrieval and reverses dizocilpine-induced memory impairment in rats. *Behavioural brain research* 297:155–164. doi:10.1016/j.bbr.2015.10.022
- Kilts JD, Gerhardt MA, Richardson MD, Sreeram G, Mackensen GB, Grocott HP, White WD, Davis RD, Newman MF, Reves JG, Schwinn DA, Kwatra MM (2000) Beta(2)-adrenergic and several other G protein-coupled receptors in human atrial membranes activate both G(s) and G(i). *Circulation research* 87:705–709. doi:10.1161/01.res.87.8.705
- Kim J, Ogai A, Nakatani S, Hashimura K, Kanzaki H, Komamura K, Asakura M, Asanuma H, Kitamura S, Tomoike H, Kitakaze M (2006) Impact of blockade of histamine H2 receptors on chronic heart failure revealed by retrospective and prospective randomized studies. *Journal of the American College of Cardiology* 48:1378–1384. doi:10.1016/j.jacc.2006.05.069
- Kirch W, Halabi H, Ohnhaus EE (1987) Negative inotropic effects of famotidine. *The Lancet* 330:684–685. doi:10.1016/S0140-6736(87)92466-4
- Kirch W, Halabi A, Linde M, Ohnhaus EE (1988) Negativ-inotrope Wirkung von Famotidin. *Schweizerische medizinische Wochenschrift* 118:1912–1914
- Krielaart MJ, Veenstra DM, van Buuren KJ (1990) Mechanism of action of H2-antagonists on histamine- or dimaprit-stimulated H2-receptors of spontaneously beating guinea-pig atrium. *Agents and actions* 31:23–35. doi:10.1007/BF02003217
- Laher I, McNeill JH (1980) Effects of histamine on rat isolated atria. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 58:1114–1116. doi:10.1139/y80-166
- Langendorff O (1895) Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Pflügers Arch.* 61:291–332. <https://doi.org/10.1007/BF01812150>
- Leary PJ, Barr RG, Bluemke DA, Bristow MR, Kronmal RA, Lima JA, Ralph DD, Ventetuolo CE, Kawut SM (2014) H2 receptor antagonists and right ventricular morphology: the MESA right ventricle study. *Annals of the American Thoracic Society* 11:1379–1386. doi:10.1513/AnnalsATS.201407-344OC
- Leary PJ, Tedford RJ, Bluemke DA, Bristow MR, Heckbert SR, Kawut SM, Krieger EV, Lima JA, Masri CS, Ralph DD, Shea S, Weiss NS, Kronmal RA (2016a) Histamine H2 Receptor Antagonists, Left Ventricular Morphology, and Heart Failure Risk: The MESA Study. *Journal of the American College of Cardiology* 67:1544–1552. doi:10.1016/j.jacc.2016.01.045
- Leary PJ, Ralph DD, Tedford RJ, Kronmal RA (2016b) Reply: Histamine H2 Receptors and Heart Failure: A Complex Cross-Talk. *Journal of the American College of Cardiology* 68:775–776. doi:10.1016/j.jacc.2016.05.064
- Leary PJ, Kronmal RA, Bluemke DA, Buttrick PM, Jones KL, Kao DP, Kawut SM, Krieger EV, Lima JA, Minobe W, Ralph DD, Tedford RJ, Weiss NS, Bristow MR (2018)

- Histamine H2 Receptor Polymorphisms, Myocardial Transcripts, and Heart Failure (from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis and Beta-Blocker Effect on Remodeling and Gene Expression Trial). *The American journal of cardiology* 121:256–261. doi:10.1016/j.amjcard.2017.10.016
- Levi R, Capurro N, Lee C-H (1975) Pharmacological characterization of cardiac histamine receptors: Sensitivity to H1- and H2-receptor agonists and antagonists. *European journal of pharmacology* 30:328–335. doi:10.1016/0014-2999(75)90117-X
- Levi R, Malm JR, Bowman FO, Rosen MR (1981) The arrhythmogenic actions of histamine on human atrial fibers. *Circulation research* 49:545–550. doi:10.1161/01.res.49.2.545
- Levick SP (2022) Histamine receptors in heart failure. *Heart failure reviews* 27:1355–1372. doi:10.1007/s10741-021-10166-x
- Li M, Hu J, Chen Z, Meng J, Wang H, Ma X, Luo X (2006) Evidence for histamine as a neurotransmitter in the cardiac sympathetic nervous system. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 291:H45-51. doi:10.1152/ajpheart.00939.2005
- Liu X, Callaerts-Vegh Z, Evans KLJ, Bond RA (2002) Chronic infusion of beta-adrenoceptor antagonist and inverse agonists decreases elevated protein kinase A activity in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of human beta 2-adrenoceptor. *Journal of cardiovascular pharmacology* 40:448–455. doi:10.1097/00005344-200209000-00014
- Liu B, Jia Z, Geng X, Bei J, Zhao Z, Jia Q, Zhang H (2007) Selective inhibition of Kir currents by antihistamines. *European journal of pharmacology* 558:21–26. doi:10.1016/j.ejphar.2006.11.044
- Lowry O, Rosebrough N, Farr AL, Randall R (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193:265–275. doi:10.1016/S0021-9258(19)52451-6
- Luo T, Chen B, Zhao Z, He N, Zeng Z, Wu B, Fukushima Y, Dai M, Huang Q, Xu D, Bin J, Kitakaze M, Liao Y (2013) Histamine H2 receptor activation exacerbates myocardial ischemia/reperfusion injury by disturbing mitochondrial and endothelial function. *Basic research in cardiology* 108:342. doi:10.1007/s00395-013-0342-4
- Maintz L, Bieber T, Novak N (2006) Die verschiedenen Gesichter der Histaminintoleranz. *Deutsches Ärzteblatt* 103(51-52):A3477-83.
- Mandela P, Chandley M, Xu Y-Y, Zhu M-Y, Ordway GA (2010) Reserpine-induced Reduction in Norepinephrine Transporter Function Requires Catecholamine Storage Vesicles. *Neurochemistry international* 56:760–767. doi:10.1016/j.neuint.2010.02.011
- Matsuda N, Hattori Y, Sakuraya F, Kobayashi M, Zhang X-H, Kemmotsu O, Gando S (2002) Hemodynamic significance of histamine synthesis and histamine H1- and H2-receptor gene expression during endotoxemia. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 366:513–521. doi:10.1007/s00210-002-0651-x
- Matsuda N, Jesmin S, Takahashi Y, Hatta E, Kobayashi M, Matsuyama K, Kawakami N, Sakuma I, Gando S, Fukui H, Hattori Y, Levi R (2004) Histamine H1 and H2 receptor gene and protein levels are differentially expressed in the hearts of rodents and humans. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 309:786–795. doi:10.1124/jpet.103.063065
- Neumann J, Binter MB, Fehse C, Marušáková M, Büxel ML, Kirchhefer U, Hofmann B, Gergs U (2021a) Amitriptyline functionally antagonizes cardiac H2 histamine receptors in transgenic mice and human atria. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 394:1251–1262. doi:10.1007/s00210-021-02065-7

- Neumann J, Schwarzer D, Fehse C, Schwarz R, Marusakova M, Kirchhefer U, Hofmann B, Gergs U (2021b) Functional interaction of H₂-receptors and 5HT₄-receptors in atrial tissues isolated from double transgenic mice and from human patients. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 394:2401–2418. doi:10.1007/s00210-021-02145-8
- Neumann J, Grobe JM, Weisgut J, Schwelberger HG, Fogel WA, Marušáková M, Wache H, Bähre H, Buchwalow IB, Dhein S, Hofmann B, Kirchhefer U, Gergs U (2021c) Histamine can be Formed and Degraded in the Human and Mouse Heart. *Frontiers in pharmacology* 12:582916. doi:10.3389/fphar.2021.582916
- Neumann J, Kirchhefer U, Dhein S, Hofmann B, Gergs U (2021d) The Roles of Cardiovascular H₂-Histamine Receptors Under Normal and Pathophysiological Conditions. *Frontiers in pharmacology* 12:732842. doi:10.3389/fphar.2021.732842
- Neumann J, Hofmann B, Kirchhefer U, Dhein S, Gergs U (2023) Function and Role of Histamine H₁ Receptor in the Mammalian Heart. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* 16. doi:10.3390/ph16050734
- Nielsen HJ, Hammer JH (1992) Possible role of histamine in pathogenesis of autoimmune diseases: Implications for immunotherapy with histamine-2 receptor antagonists. *Medical Hypotheses* 39:349–355. doi:10.1016/0306-9877(92)90060-P
- Ohtsu H, Tanaka S, Terui T, Hori Y, Makabe-Kobayashi Y, Pejler G, Tchougounova E, Hellman L, Gertsenstein M, Hirasawa N, Sakurai E, Buzás E, Kovács P, Csaba G, Kittel Á, Okada M, Hara M, Mar L, Numayama-Tsuruta K, Ishigaki-Suzuki S, Ohuchi K, Ichikawa A, Falus A, Watanabe T, Nagy A (2001) Mice lacking histidine decarboxylase exhibit abnormal mast cells. *FEBS Letters* 502:53–56. doi:10.1016/S0014-5793(01)02663-1
- Panula P, Chazot PL, Cowart M, Gutzmer R, Leurs R, Liu WLS, Stark H, Thurmond RL, Haas HL (2015) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVIII. Histamine Receptors. *Pharmacological reviews* 67:601–655. doi:10.1124/pr.114.010249
- Pape H, Kurtz A, Silbernagl S, Klinke R: *Physiologie*. 7. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2014, S. 191-192.
- Parsons ME, Ganellin CR (2006) Histamine and its receptors. *British journal of pharmacology* 147 Suppl 1:S127-35. doi:10.1038/sj.bjp.0706440
- Patella V, Marinò I, Lampärter B, Arbustini E, Adt M, Marone G (1995) Human heart mast cells. Isolation, purification, ultrastructure, and immunologic characterization. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 154:2855–2865
- Patella V, Marinò I, Arbustini E, Lamparter-Schummert B, Verga L, Adt M, Marone G (1998) Stem cell factor in mast cells and increased mast cell density in idiopathic and ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 97:971–978. doi:10.1161/01.cir.97.10.971
- Poli E, Pozzoli C, Coruzzi G, Bertaccini G, Timmerman H (1993) In vitro cardiac pharmacology of the new histamine H₂-receptor agonist amthamine: comparisons with histamine and dimaprit. *Agents and actions* 40:44–49. doi:10.1007/BF01976750
- Poli E, Pozzoli C, Spaggiari I, Bertaccini G (1994) Positive inotropic activity of the novel histamine H₂-receptor agonist, amthamine, on the human heart in vitro. *General Pharmacology: The Vascular System* 25:1649–1654. doi:10.1016/0306-3623(94)90367-0
- Ramos I, Aparici M, Letosa M, Puig C, Gavaldà A, Huerta JM, Espinosa S, Vilella D, Miralpeix M (2018) Abediterol (LAS100977), an inhaled long-acting β ₂-adrenoceptor

- agonist, has a fast association rate and long residence time at receptor. *European journal of pharmacology* 819:89–97. doi:10.1016/j.ejphar.2017.11.043
- Rayo Abella LM, Jacob H, Keller M, Schindler L, Pockes S, Pitzl S, Klimas J, Hadova K, Schneider S, Buchwalow IB, Jin C, Panula P, Kirchhefer U, Neumann J, Gergs U (2024) Initial Characterization of a Transgenic Mouse with Overexpression of the Human H1-Histamine Receptor on the Heart. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 389:174–185. doi:10.1124/jpet.123.002060
- Sadek B, Khan N, Darras FH, Pockes S, Decker M (2016) The dual-acting AChE inhibitor and H3 receptor antagonist UW-MD-72 reverses amnesia induced by scopolamine or dizocilpine in passive avoidance paradigm in rats. *Physiology & behavior* 165:383–391. doi:10.1016/j.physbeh.2016.08.022
- Salmon P, Fitzgerald D, Kenny M (1991) No effect of famotidine on cardiac performance by noninvasive hemodynamic measurements. *Clinical pharmacology and therapeutics* 49:589–595. doi:10.1038/clpt.1991.69
- Sanders L, Lynham JA, Kaumann AJ (1996) Chronic beta 1-adrenoceptor blockade sensitises the H1 and H2 receptor systems in human atrium: rôle of cyclic nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 353:661–670. doi:10.1007/BF00167185
- Satoh H (1993) Modulation of the automaticity by histamine and cimetidine in rabbit sinoatrial node cells. *General Pharmacology: The Vascular System* 24:1213–1222. doi:10.1016/0306-3623(93)90371-4
- Schuetz DA, Witte WEA de, Wong YC, Knasmueller B, Richter L, Kokh DB, Sadiq SK, Bosma R, Nederpelt I, Heitman LH, Segala E, Amaral M, Guo D, Andres D, Georgi V, Stoddart LA, Hill S, Cooke RM, Graaf C de, Leurs R, Frech M, Wade RC, Lange ECM de, IJzerman AP, Müller-Fahrnow A, Ecker GF (2017) Kinetics for Drug Discovery: an industry-driven effort to target drug residence time. *Drug discovery today* 22:896–911. doi:10.1016/j.drudis.2017.02.002
- Seifert R, Strasser A, Schneider EH, Neumann D, Dove S, Buschauer A (2013) Molecular and cellular analysis of human histamine receptor subtypes. *Trends in pharmacological sciences* 34:33–58. doi:10.1016/j.tips.2012.11.001
- Simmerman HK, Jones LR (1998) Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiological reviews* 78:921–947. doi:10.1152/physrev.1998.78.4.921
- Skeletal formula of dimaprit — an H₄ histamine receptor agonist. Created with ChemDoodle 7.0.2 and Adobe Illustrator CC 2015. URL: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dimaprit.svg> (07.09.2024)
- Smit MJ, Vischer HF, Bakker RA, Jongejan A, Timmerman H, Pardo L, Leurs R (2007) Pharmacogenomic and structural analysis of constitutive g protein-coupled receptor activity. *Annual review of pharmacology and toxicology* 47:53–87. doi:10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105126
- Steinberg MI, Holland DR (1975) Separate receptors mediating the positive inotropic and chronotropic effect of histamine in guinea-pig atria. *European journal of pharmacology* 34:95–104. doi:10.1016/0014-2999(75)90229-0
- Stoetzer C, Voelker M, Doll T, Heineke J, Wegner F, Leffler A (2017) Cardiotoxic Antiemetics Metoclopramide and Domperidone Block Cardiac Voltage-Gated Na⁺ Channels. *Anesthesia and analgesia* 124:52–60. doi:10.1213/ANE.0000000000001673

- Structure of (±)-isoproterenol (isoprenaline). URL: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Isoproterenol.svg> (07.09.2024)
- Tropmann K, Bresinsky M, Forster L, Mönnich D, Buschauer A, Wittmann H-J, Hübner H, Gmeiner P, Pockes S, Strasser A (2021) Abolishing Dopamine D2long/D3 Receptor Affinity of Subtype-Selective Carbamoylguanidine-Type Histamine H2 Receptor Agonists. *Journal of medicinal chemistry* 64:8684–8709. doi:10.1021/acs.jmedchem.1c00692
- Ui M (1984) Islet-activating protein, pertussis toxin: a probe for functions of the inhibitory guanine nucleotide regulatory component of adenylate cyclase. *Trends in pharmacological sciences* 5:277–279. doi:10.1016/0165-6147(84)90444-9
- van der Velden WJC, Heitman LH, Rosenkilde MM (2020) Perspective: Implications of Ligand-Receptor Binding Kinetics for Therapeutic Targeting of G Protein-Coupled Receptors. *ACS pharmacology & translational science* 3:179–189. doi:10.1021/acsptsci.0c00012
- Wellner-Kienitz M-C, Bender K, Meyer T, Pott L (2003) Coupling to Gs and Gq/11 of histamine H2 receptors heterologously expressed in adult rat atrial myocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1642:67–77. doi:10.1016/S0167-4889(03)00101-0
- Windaus A, Vogt W (1907) Synthese des Imidazolyl-äthylamins. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 40:3691–3695. doi:10.1002/cber.190704003164
- Wolff AA, Levi R (1986) Histamine and cardiac arrhythmias. *Circulation research* 58:1–16. doi:10.1161/01.res.58.1.1
- Zerkowski HR, Broede A, Kunde K, Hillemann S, Schäfer E, Vogelsang M, Michel MC, Brodde OE (1993) Comparison of the positive inotropic effects of serotonin, histamine, angiotensin II, endothelin and isoprenaline in the isolated human right atrium. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 347:347–352. doi:10.1007/BF00165383
- Zhang J, Cai W-K, Zhang Z, Wang P, Lin X-Q, Feng J, Fu S-C, He G-H (2018) Cardioprotective effect of histamine H2 antagonists in congestive heart failure: A systematic review and meta-analysis. *Medicine* 97:e0409. doi:10.1097/MD.00000000000010409

8. Thesen

1. UR-Po563, UR-MB-158 und UR-MB-159 wirken kardiostimulierend am Histamin H₂-Rezeptor.
2. Histamin wirkt an den Vorhöfen von H₂-TG positiv inotrop und chronotrop.
3. UR-Po563, UR-MB-158 und UR-MB-159 führen zu einem positiv inotropen Effekt an den elektrisch stimulierten linken Vorhöfen von H₂-TG mit pEC₅₀-Werten von 8,27; 9,86 und 8,21.
4. UR-Po563 wirkt positiv inotrop an Präparaten des menschlichen Vorhofes.
5. UR-Po563, UR-MB-158 und UR-MB-159 bewirken einen positiv chronotropen Effekt an den spontan schlagenden rechten Vorhöfen von H₂-TG mit pEC₅₀-Werten von 8,69; 9,24 und 8,07.
6. UR-Po563 wirkt am isolierten, retrograd perfundierten Herzen von H₂-TG positiv inotrop und chronotrop.
7. Die drei neuen Substanzen führen in vivo zu einer Steigerung der systolischen Wandbewegung, der Ejektionsfraktion und der Schlagfrequenz in der Echo-kardiografie von H₂-TG.
8. UR-Po563 steigert die Phosphorylierung von Phospholamban an den Aminosäuren Serin-16 und Threonin-17 in H₂-TG.
9. Famotidin wirkt an den Vorhöfen von H₂-TG negativ inotrop und chronotrop.
10. Der Histamin H₂-Rezeptor hat keinen inhibitorischen Einfluss auf den β-Adrenozeptor an den Vorhöfen von H₂-TG.

Anhang

Genotypisierung

DNA-Isolation

Lysispuffer	1,25 ml 1 M NaOH 0,5 ml 10 mM EDTA mit aqua bidest auf 50 ml aufgefüllt pH 8
Neutralisationspuffer	Tris-HCl 0,23 g/50 ml aqua bidest

PCR Mastermix (pro 1 µl DNA-Probe)

8 µl aqua bidest	
10 µl 2-fach Mastermix	Vazyme #P211 (Taq plus DNA Polymerase, dNTP, Puffersystem)
0,5 µl Primer forward	MHC-Seq-P1 (5'-ACCCTTACCCCACATAGACC-3')
0,5 µl Primer reverse	hH2R-Seq-P1R (5'-AGCAGGTCAGTGATAGCCAA-3')

PCR Programm

Denaturierung	94 °C	5 Minuten	1 Zyklus
Denaturierung	94 °C	20 Sekunden	30 Zyklen
Annealing	60 °C	30 Sekunden	
Elongation	72 °C	1 Minute	
Elongation	72 °C	5 Minuten	1 Zyklus
Hold	16 °C		

1 % Agarosegel

1 g Agarose	
100 ml TAE	Tris-Base 40 mM, EDTA 1 mM, Essigsäure pH 8,2

→ aufkochen

10 µl red-safe-Farbstoff

Kontraktionsversuche und Langendorff-Herzen

Tyrode-Lösung

Stammlösung I (40 ml)	NaCl 17,5 % (g/V), KCl 1,005 % (g/V), MgCl ₂ x 6H ₂ O 0,56 % (g/V)
Stammlösung II (38 ml)	NaHCO ₃ 5 % (g/V)
Stammlösung III (20 ml)	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 0,29 % (g/V)
Endkonzentrationen	119,9 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,1 mM MgCl ₂ x 6H ₂ O, 22,6 mM NaHCO ₃ , 0,42 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O, 1,8 mM CaCl ₂ x 2H ₂ O, 5,05 mM Glucose, 0,28 mM Ascorbinsäure, 0,05 mM Na ₂ EDTA
pH 7,4	

Western Blot-Analysen

Homogenisationspuffer

100 ml 10 mM NaHCO₃
21,3 ml 20 % SDS-Lösung

Lowry-Protokoll

Proteinstandard	1 mg Albumin/ml Aqua bidest → vor Gebrauch auf 1:100 verdünnt
Stammlösung A	2 % Na ₂ CO ₃ in 0,1 M NaOH
Stammlösung B	1 % K-Na-Tartrat 4H ₂ O
Stammlösung C	0,5 % CuSO ₄
Lösung D	49 ml Stammlösung A 0,5 ml Stammlösung B 0,5 ml Stammlösung C
Lösung E	Folin-Ciocalteu (1 Teil Folin, 2 Teile Aqua bidest)

Trenngel 10 %

18,75 ml Porziopuffer
0,2 M Tris-Base, 0,6 M Glycine,
0,12 mM EDTA (Titriplex III), 0,2 % SDS,
10 % Glycerol, 0,4 % Polyacrylamid
pH 8,8
12,5 ml Acrylamid 30 %

3,125 ml Glycerin
5 ml H₂O
32,5 µl TEMED
150 µl APS 10 % 1g Ammonuimpersulfat/10 ml H₂O

Sammelgel 4 %

2,35 ml Sammelgelpuffer 0,5 M Tris-Base, 0,4 % SDS
pH 6,8

1,25 ml Acrylamid 30 %
5,8 ml H₂O
6 µl TEMED
95 µl APS 10 % 1g Ammonuimpersulfat/10 ml H₂O

Elektrophoresepuffer

0,4 M Tris-Base
1,2 M Glycine
0,4 % SDS
pH 8,8
→ vor Gebrauch auf 1:10 verdünnt

2-fach-Probenpuffer

0,25 M Tris-Base
8 % SDS
40 % Glycerol
0,004 % Bromphenolblau
pH 6,8

Transferpuffer

40 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O
7,9 mM NaH₂HPO₄ x H₂O
pH > 8

Ponceau-Rot

0,2 % Ponceau S
2 % Trichloressigsäure

TBST

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

Blockierungspuffer BSA

2 % (w/v) BSA in TBST

Blockierungspuffer Milchpulver

5 % (w/v) Magermilchpulver in TBST

AP-Puffer

100 mM Triethanolamin
 100 mM NaCl
 5 mM MgCl₂ x 6H₂O
 pH 9,4

Antikörper

1. Antikörper (Anti-)	Größe kDa (1. AK)	Verdünnung (1. AK)	Medium (1. AK)	2. Antikörper
CSQ-1	54/55	1:1000	Milchpulver 5 % in TBST	Anti-rabbit-IgG (1:1000, 5 % Milchpulver in TBST)
Ser-16P-PLB	<12 (gekocht)	1:5000	2 % BSA in TBST	
Thr-17P-PLB	<12 (gekocht)	1:5000	2% BSA in TBST	

ECF-Substrat-Lösung

60 ml ECF-Lösungspuffer
 36 mg ECF-Substrat
 → bei -20 °C dunkel gelagert

Substanzen

Agarose NEEO Ultra-Qualität
 Ammonuimpersulfat
 Anti-CSQ-1 Antikörper (ab3516)

Carl Roth GmbH, Karlsruhe
 Carl Roth GmbH, Karlsruhe
 Abcam, Waltham, USA

Anti-rabbit-IgG Antikörper (A3687)	Sigma Aldrich, Steinheim
Anti-Ser16P-PLB Antikörper (A01012)	Badrilla, Leeds, UK
Anti-Thr17P-PLB Antikörper (A013)	Badrilla, Leeds, UK
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
BSA	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
CaCl ₂	Merck KgaA, Darmstadt
Carbogen	Linde Healthcare, Oberschleißheim
CuSO ₄	Merck KgaA, Darmstadt
D-(+)-Glucose	Sigma Aldrich, Steinheim
ECF-Lösungspuffer	GE Healthcare, Berlin
ECF-Substrat	GE Healthcare, Berlin
EDTA (Titriplex III)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Essigsäure 100 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Famotidin	Sigma Aldrich, Steinheim
Forene® (Isofluran)	Abbvie Dtl. GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Folin-Ciocalteu Phenolreagenz	Merck KgaA, Darmstadt
Gene Ruler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Glycerol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycine	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Heparin-Natrium (25000 I.E./5 ml)	ratiopharm GmbH, Ulm
Histamin	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Isoprenalinhydrochlorid	Sigma Aldrich, Steinheim
KCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
K-Na-Tartrat 4H ₂ O	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-(+)-Ascorbinsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
MgCl ₂ x 6H ₂ O	Merck KgaA, Darmstadt
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
NaCl	AppliChem GmbH, Karlsruhe
Na ₂ -EDTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
NaHCO ₃	Merck KgaA, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
NaOH	Merck KgaA, Darmstadt
PentobarbitalMerial	Spofa, Prag, Tschechien
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
PCR 2-fach Mastermix	Biotool GmbH, Oberasbach
Primer forward (MHC-Seq-P1)	Biomers.net, Ulm

Primer reversed (hH2R-Seq-P1R)	Biomers.net, Ulm
Ponceau S	Sigma Aldrich, Steinheim
Polyacrylamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
red-safe-Farbstoff	iNTRON, Seongnam, South Korea
SDS	Merck KgaA, Darmstadt
Trichloressigsäure	Merck KgaA, Darmstadt
Triethanolamin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris-HCl	Sigma Aldrich, Steinheim
Tween® 20	Merck KgaA, Darmstadt
UR-MB-158	Institut für Pharmazie, Universität Regensburg
UR-MB-159	Institut für Pharmazie, Universität Regensburg
UR-Po563	Institut für Pharmazie, Universität Regensburg

Geräte, Zubehör und Software

AlphaDigiDoc RT 312nm/254 nm	Sigma-Aldrich, Steinheim
Biophotometer	Eppendorf SE, Hamburg
BD Plastipak™ 1 ml Spritzen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
CV-Tronic Elektrodengel	C+V Pharma-Depot GmbH, Versmold
Datenerfassung PowerLab	ADInstruments, Oxford, UK
Elektrophorese-Einheit SE 600	Hoefler, San Francisco, USA
Elektrophoresekammer Typ Horizon 58	Life Technologies, Gaithersburg, USA
Enthaarungscreme Veet for Men	Reckitt Benckiser Dtl. GmbH, Heidelberg
Eppendorf Research® Pipetten	Eppendorf SE, Hamburg
Eppendorf Safe-Lock Tubes	Eppendorf SE, Hamburg
epT.I.P.S.® Standard	Eppendorf SE, Hamburg
Filtersystem	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Flussmessgerät	Transonic Systems Inc., Ithaca, USA
Glasware	Schott AG, Mainz
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, San Diego, USA
Heizgerät	Lauda Alpha Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen
Hoefler TE62 Tank-Transfer-Einheit	Hoefler, San Francisco, USA
ImageQuant 5.0	Molecular Dynamics (GE)
Kanüle BD Microfine™ 3	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
LabChart 8	ADInstruments, Oxford, UK

Mastercycler gradient	Eppendorf SE, Hamburg
Microsoft Excel	Microsoft Cooperation, Redmont, USA
Microsoft Power Point	Microsoft Cooperation, Redmont, USA
Mikro-Dismembrator S	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Mikroskop	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Nitrocellulose Blotting Membran	Amersham™ Protran™, GE Healthcare
Peristaltikpumpe	Ismatec, Cole-Parmer GmbH, Wertheim
pH-Meter STH 600	WTW GmbH, Weilheim
Präparationsbesteck Aesculap	B.Braun AG, Melsungen
Kreisrüttler 3015	GFL GmbH, Hannover
Sorvall Zentrifugen Tubes	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Spritzanlage Injekt®	B.Braun AG, Melsungen
Stromstärkegeber Standard Power-pack p25	Biometra GmbH, Göttingen
Stromquelle Biorad Modell 200/2.0	Biorad, München
ThermoMixer 5436	Eppendorf SE, Hamburg
Transfer-Einheit TE 62	Hoefer, San Francisco, USA
Typhoon 9410 Variable Mode Imager	Molecular Dynamics (GE)
Ultraschallkontaktgel	Caesar & Loretz GmbH, Hilden
Ultraschallwandler UW 2070	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
UV-Betrachter	PEQLAB GmbH, Erlangen
Waage Typ AT261	DeltaRange Mettler Instruments GmbH, Gießen
Waage Typ XS205	Teldeo Dualrange Mettler Instruments GmbH, Gießen
Wollenberger Zange	Geuder AG, Heidelberg
Vevo 2100 mit Hochfrequenz-Ultraschallkopf (MS 550D)	VisualSoncis Inc., Canada
Vevo 2100 4.1.0	VisualSoncis Inc., Canada
Zentrifuge Modell 5415 C	Eppendorf SE, Hamburg
<i>Messanlage Kontraktionsversuche</i>	Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim
Brückenverstärker und Schreiber (Graphtec, Linearcorder mark, VII, WR 3101)	
Reizgerät mit vier Kanälen (ELV Takt- und Impulsgenerator TIG 7000)	
Wärmebad (C20 Lauda)	
Transducer (Kent, Scientific corporation, Isometric Transducer)	
Doppelwandgefäße, Stative, Elektroden, Halterungsstäbe, Haken	

Erklärungen

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

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

(3) 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.

Datum, Unterschrift

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Gergs U, Büxel ML, Bresinsky M, Kirchhefer U, Fehse C, Höring C, Hofmann B, Marušáková M, Čináková A, Schwarz R, Pockes S, Neumann J (2021) Cardiac Effects of Novel Histamine H2 Receptor Agonists. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 379:223–234. doi:10.1124/jpet.121.000822

Danksagung

Als Erstes möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Dr. h. c. Joachim Neumann danken. Er hat mir durch die Überlassung des Themas diese Doktorarbeit erst ermöglicht. Die gute Betreuung, stete Ansprechbarkeit und wissenschaftlichen Anregungen im gesamten Verlauf dieser Arbeit habe ich sehr geschätzt.

Ebenfalls gilt mein Dank Dr. rer. nat. Ulrich Gergs für alle nützlichen Hinweise, die geduldige Beantwortung von Fragen und die Unterstützung bei der Auswertung und dem Schreiben dieser Arbeit.

Ein großer Dank geht an Sonja Reber für meine Einarbeitung, die verlässliche Begleitung bei den Versuchen und die Hilfe bei der Durchführung der Versuche an menschlichen Präparaten. Außerdem danke ich Pia Willmy und Stephanie Simmrodt für die tolle Organisation, Versorgung mit Tieren und ihre stete Hilfsbereitschaft.

Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. rer. nat. Steffen Pockes für die Bereitstellung der Substanzen sowie bei Charlotte Fehse, Margaréta Marušáková und Rebecca Schwarz für die Hilfe bei der Durchführung der Langendorff-Versuche, Western Blots und echokardiografischen Versuche.

Zu guter Letzt danke ich ganz herzlich meinen Eltern, die immer ein offenes Ohr haben, mich stets in allem unterstützen und mir zur Seite stehen. Ohne sie wäre mein bisheriger Werdegang nicht möglich gewesen.