

# Untersuchungen zu kardialen Effekten von Ergotamin, Ergometrin und LSD an transgenen Mäusen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Hannes Jacob

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

Gutachter\*innen: Prof. Joachim Schmitt, Düsseldorf

Prof. Renke Maas, Erlangen

Datum der Verteidigung: 13.08.2025

## Referat

Lysergsäurediethylamid (LSD), Ergotamin und Ergometrin können an eine Vielzahl von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren im menschlichen Gehirn binden. Die halluzinogenen Effekte von LSD können auf die Aktivierung von Rezeptoren des Subtyps 2a für Serotonin (h5-HT<sub>2A</sub>-R) zurückgeführt werden. Im Tierversuch wirkte LSD am Herzen auch über Histaminrezeptoren. Es wurde untersucht, ob die genannten Substanzen im Mausmodell auf die im menschlichen Herzen vorkommenden h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren oder hH<sub>2</sub>-Rezeptoren wirken können.

Dazu wurden spontan schlagende rechte Herzohren und elektrisch stimulierte linke Herzohren transgener Mäuse mit kardiomyozytenspezifischer Überexpression des h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptors bzw. des hH<sub>2</sub>-Rezeptors im Vergleich zu Wildtypen unter vergleichbaren Bedingungen verwendet. Zudem wurde die isometrische Kontraktion elektrisch stimulierter menschlicher Herzmuskelpräparate des rechten Vorhofs, die aus Bypass-Operationen stammten, untersucht.

Es wurde an hH<sub>2</sub>-Rezeptor-transgenen linken Vorhofpräparaten ein konzentrationsabhängiger positiv inotroper Effekt durch LSD, Ergotamin und Ergometrin beobachtet. An h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen linken Vorhofpräparaten sah man einen konzentrationsabhängigen positiv inotropen Effekt durch LSD und Ergotamin. Beide Effekte waren antagonisierbar durch die spezifischen Antagonisten der jeweils untersuchten Rezeptoren, also Cimetidin bzw. Tropicsetron. An WT-Präparaten zeigte sich hingegen kein positiv inotroper Effekt.

Im anschließenden Western Blot der mechanisch untersuchten Vorhofpräparate zeigten hH<sub>2</sub>-R-transgene Kardiomyozyten der Maus, die mit LSD, Ergotamin oder Ergometrin inkubiert worden waren, einen erhöhten Phosphorylierungszustand von Phospholamban an der Aminosäure Serin an Position 16, welche bei identisch behandelten Präparaten aus WT-Mäusen fehlte. Gleiches konnte für h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgene Vorhofpräparate der Maus, die zuvor LSD oder Ergotamin behandelt worden waren, nachgewiesen werden, ebenfalls im Vergleich zu WT-Präparaten.

Weiterhin bewirkten LSD, Ergotamin und Ergometrin an elektrisch stimulierten menschlichen rechten Vorhofpräparaten in Gegenwart des Phosphodiesteraseinhibitor Cilostamid einen positiv inotropen Effekt, welcher sich als durch Zugabe von Cimetidin bzw. teilweise auch Tropicsetron reversibel erwies.

Auf Grundlage dieser Untersuchungen kann gefolgert werden, daß LSD, Ergotamin und Ergometrin Agonisten am menschlichen H<sub>2</sub>-Rezeptor, sowie LSD und Ergotamin Agonisten am menschlichen 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor seien, was für Intoxikationsbehandlungen relevant sein könnte.

Jacob, Hannes: Untersuchungen zu kardialen Effekten von Ergotamin, Ergometrin und LSD an transgenen Mäusen, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2025

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Arten und Eigenschaften von Histaminrezeptoren	1
1.2. Arten und Eigenschaften von Serotoninrezeptoren	3
1.3. Signaltransduktion von G <sub>s</sub> -Protein-gekoppelten Rezeptoren	4
1.4. Geschichte, Eigenschaften und Verwendung von LSD	5
1.5. Geschichte, Eigenschaften und Verwendung von Ergotamin	7
1.6. Geschichte, Eigenschaften und Verwendung von Ergometrin	8
2. Zielstellung	10
3. Material und Methoden	11
3.1. Maus	11
3.1.1 Tierzucht	11
3.1.2 Organentnahme	12
3.1.3 Vorhofpräparation	12
3.1.4 Versuchsaufbau	13
3.1.5 Messung	14
3.2 Mensch	16
3.3 Western Blot	17
3.3.1 Homogenisierung	17
3.3.2 Quantitative Proteinbestimmung nach Lowry	17
3.3.3 SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	17
3.3.4 Western Blot	18
3.3.5 Immunologischer Proteinnachweis	18
3.4 Datenanalyse	20
3.5 Materialien	20
4. Ergebnisse	21
4.1 Vergleich der Versuchstiere	21
4.2 LSD	21
4.2.1 WT linke Vorhofpräparate	22
4.2.2 hH <sub>2</sub> -transgene linke Vorhofpräparate	23
4.2.3 hH <sub>2</sub> -transgene rechte Vorhofpräparate	25
4.2.4 h5-HT <sub>4</sub> -transgene linke Vorhofpräparate	26
4.2.5 h5-HT <sub>4</sub> -transgene rechte Vorhofpräparate	28

4.2.6	Versuche mit Rezeptorantagonisten	30
4.2.7	Proteinphosphorylierung in Mauspräparaten	31
4.2.8	Kontraktionsversuche menschlicher Präparate	32
4.3	Ergotamin	37
4.3.1	WT linke Vorhofpräparate	37
4.3.2	hH <sub>2</sub> -transgene linke Vorhofpräparate	38
4.3.3	hH <sub>2</sub> -transgene rechte Vorhofpräparate	40
4.3.4	h5-HT <sub>4</sub> -transgene linke Vorhofpräparate	41
4.3.5	h5-HT <sub>4</sub> -transgene rechte Vorhofpräparate	44
4.3.6	Versuche mit Rezeptorantagonisten	45
4.3.7	Proteinphosphorylierung in Mauspräparaten	46
4.3.8	Kontraktionsversuche menschlicher Präparate	47
4.4	Ergometrin	49
4.4.1	WT linke Vorhofpräparate	50
4.4.2	hH <sub>2</sub> -transgene linke Vorhofpräparate	51
4.4.3	hH <sub>2</sub> -transgene rechte Vorhofpräparate	53
4.4.4	h5-HT <sub>4</sub> -transgene linke Vorhofpräparate	54
4.4.5	h5-HT <sub>4</sub> -transgene rechte Vorhofpräparate	56
4.4.6	Versuche mit Rezeptorantagonisten	57
4.4.7	Proteinphosphorylierung in Mauspräparaten	57
4.4.8	Kontraktionsversuche menschlicher Präparate	58
5.	Diskussion	61
5.5	Kontraktionsversuche an isolierten Vorhofpräparaten der Maus	61
5.5.1	Vorhofpräparate der WT-Maus	61
5.5.2	hH <sub>2</sub> -Rezeptor-transgene Vorhofpräparate	62
5.5.3	h5-HT <sub>4</sub> -Rezeptor-transgene Vorhofpräparate	63
5.5.4	Limitierungen	65
5.6	Kontraktionsversuche menschlicher Präparate	67
5.7	Proteinanalyse	69
5.8	Fazit	70
5.9	Klinische Bedeutung und Ausblick	70
6.	Literaturverzeichnis	73
7.	Thesen	80
	Anhang	
	Erklärungen	

Danksagung

## Abkürzungsverzeichnis (in alphabetischer Reihenfolge)

5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
AC	Adenylylcyclase
ATP	Adenosintriphosphat
Bpm	Herzschläge pro Minute (beats per minute)
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
Ca <sup>2+</sup>	Calcium <sup>2+</sup> -Ionen
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CSQ	Calsequestrin
dF/dT <sub>max</sub>	Maximum der Kontraktionsgeschwindigkeit
dF/dT <sub>min</sub>	Minimum der Kontraktionsgeschwindigkeit
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	verstärkte Chemilumineszenz (enhanced chemiluminescence)
EC <sub>50</sub>	halbmaximale effektive Konzentration
g	Gramm
°C	Grad Celsius
G-Protein	Guanosin-5'-triphosphat-bindendes Protein
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
(h)H <sub>1</sub> -Rezeptor	(menschlicher) Histamin-Rezeptor, Subtyp 1
(h)H <sub>2</sub> -Rezeptor	(menschlicher) Histamin-Rezeptor, Subtyp 2
hH <sub>2</sub> -TG	Maus mit für Kardiomyozyten spezifischer Überexpression des menschlichen H <sub>2</sub> -Rezeptors

(h)5-HT <sub>1</sub> -Rezeptor	(menschlicher) Serotonin-Rezeptor, Subtyp 1
(h)5-HT <sub>2A</sub> -Rezeptor	(menschlicher) Serotonin-Rezeptor, Subtyp 2A
(h)5-HT <sub>2B</sub> -Rezeptor	(menschlicher) Serotonin-Rezeptor, Subtyp 2B
(h)5-HT <sub>3</sub> -Rezeptor	(menschlicher) Serotonin-Rezeptor, Subtyp 3
(h)5-HT <sub>4</sub> -Rezeptor	(menschlicher) Serotonin-Rezeptor, Subtyp 4
h5-HT <sub>4</sub> -TG	Maus mit für Kardiomyozyten spezifischer Überexpression des menschlichen 5-HT <sub>4</sub> -Rezeptors
Hz	Hertz (1/s)
IE	Internationale Einheiten
IgG	Immunglobulin G
KCl	Kaliumchlorid
Ktr	Kontrollwert (gemessener Wert vor Substanzzugabe)
kDa	Kilodalton
Log	Logarithmus zur Basis 10
LSD	Lysergsäurediethylamid
LTCC	spannungsabhängiger L-Typ-Ca <sup>2+</sup> -Kanal
M	Molar (Mol pro Liter)
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mN	Millinewton
mM	Millimolar (Millimol pro Liter)
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
ms	Millisekunden
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

$\mu\text{M}$	Mikromolar (Mikromol pro Liter)
n	Stichprobenumfang
NaCl	Natriumchlorid
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	Natrium-Ethylendiaminotetraacetat
$\text{NaHCO}_3$	Natriumhydrogencarbonat
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	Natriumdihydrogenphosphat
nM	Nanomolar (Nanomol pro Liter)
nm	Nanometer
NYHA	Klassifikation der chronischen Herzinsuffizienz nach der New York Heart Association
$\text{O}_2$	molekularer Sauerstoff
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase (Proteinkinase A)
PLB	Phospholamban
PLB16	an Serin der Position 16 der Aminosäuresequenz phosphoryliertes Phospholamban
p (-Wert)	Signifikanzwert/Überschreitungswahrscheinlichkeit
rel.	relativ
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RyR	Ryanodin-Rezeptor ( $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanal)
SDS	Natrium-Laurylsulfat
SEM	Standardabweichung des arithmetischen Mittels



SERCA	Ca <sup>2+</sup> -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
t <sub>1</sub>	Anspannungszeit
t <sub>2</sub>	Relaxationszeit
TBST	Tris-buffered saline with Tween 20
WT	Wildtyp

## 1. Einleitung

Die Lysergsäurederivate LSD, Ergotamin und Ergometrin sind neben ihrer teilweise historischen, aber auch aktuellen und möglicherweise zukünftigen medizinischen Verwendung auch für ihre halluzinogenen Effekte bekannt, die zu teils missbräuchlichem Konsum führen. Alle drei genannten Substanzen können bekanntermaßen an ein vielfältiges Spektrum von Rezeptoren bzw. deren Subtypen im menschlichen Organismus binden (Silberstein and McCrory 2003b), wobei die halluzinogenen Effekte auf einen Agonismus an Rezeptoren des Subtyps 2a für Serotonin (h5-HT<sub>2A</sub>-R) zurückgeführt werden (Duan et al. 2024). Zur Beurteilung möglicher Effekte am menschlichen Herzen wurde die Frage gestellt, ob und inwieweit die drei Substanzen ebenfalls agonistische Eigenschaften am dort vorwiegend vorkommenden Subtyp 4 des menschlichen Serotoninrezeptors (h5-HT<sub>4</sub>-R) und/oder des ebenfalls dort vorkommenden Subtyps 2 des menschlichen Histaminrezeptors (hH<sub>2</sub>-R) zeigen würden und inwiefern dies die Herzmechanik beeinflussen könnte.

Deshalb wurden als Modell die spontan schlagenden rechten Vorhofpräparate und die elektrisch stimulierten linken Vorhofpräparate transgener Mäuse mit kardiomyozytenspezifischer Überexpression des menschlichen 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptors bzw. des menschlichen H<sub>2</sub>-Rezeptors (durch Verwendung des Alpha MHC-Promoters) im Vergleich zu vergleichbaren Wildtypen (WT) unter den gleichen Bedingungen verwendet. Weiterhin wurde die isometrische Kontraktion elektrisch stimulierter menschlicher Herzmuskelpräparate aus dem rechten Vorhof, welche im Rahmen von Bypass-Operationen verfügbar wurden, untersucht

Weiterhin wurde eine molekularbiologische Analyse der zuvor untersuchten Präparate mittels Western Blot durchgeführt, um die Hypothese zu testen, daß LSD, Ergotamin und Ergometrin als Agonisten an den untersuchten Rezeptoren über die angenommene intrazelluläre Signalkaskade zu einer Erhöhung des Phosphorylierungszustandes von Phospholambans führen würden.

### 1.1 Arten und Eigenschaften von Histaminrezeptoren

Für das biogene Amin Histamin, bekannt unter anderem als Botenstoff in der Pathophysiologie allergischer Reaktionen, sind die G-Protein-gekoppelten Rezeptorsubtypen H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> und H<sub>4</sub> bekannt (Panula et al. 2015); (Neumann et al. 2021a; Neumann et al. 2021c; Neumann et al. 2021e). Im Säugetierherzen sind alle vier Subtypen auf RNA und/oder Proteinebene beschrieben worden, wobei insbesondere Rezeptoren der Typen eins und zwei als Ansatzpunkte klinisch relevanter Medikamentengruppen relevant sind. Neben Wirkungen am Gefäßsystem sowie den

Atemwegen kommen Histamin-Rezeptoren auch auf Herzmuskelzellen vor, sodass Histamin dort wirksam ist. Es gibt jedoch Spezies-Unterschiede der kardialen Effekten des Histamins (Neumann et al. 2021a; Neumann et al. 2021c; Neumann et al. 2021e). In den Herzen einiger Arten, so zum Beispiel von Mäusen, Hunden, Ratten und Katzen fehlt ein direkt durch Histaminrezeptoren vermittelter positiv inotroper Effekt, lediglich wirkt Histamin indirekt durch Freisetzung endogener Katecholamine positiv inotrop. Dementsprechend konnte die Wirkung von Histamin in diesen Versuchen durch Gabe des  $\beta$ -Adrenozeptorantagonisten Propranolol verhindert bzw. aufgehoben werden (Bartlet 1963; Dai 1976; Gergs et al. 2019; Laher and McNeill 1980a, 1980b; Wellner-Kienitz et al. 2003; Werner Flacke et al. 1967). Andere Spezies, beispielsweise Kaninchen oder auch der Mensch exprimieren hingegen funktionell relevante Histaminrezeptoren im Herzen. Sogar Unterschiede in der Rezeptor-Expression unterschiedlicher Herzregionen sind bei einigen Spezies bekannt: So sind beim Kaninchen im Herzvorhof überwiegend  $H_1$ -Rezeptoren vorhanden, welche ihre Wirkung über Aktivierung der Phospholipase C vermitteln (wobei das in seiner funktionellen Bedeutung für die Inotropie unwichtig sein soll) , wohingegen im Ventrikel der Effekt des Histamins über  $H_2$ -Rezeptoren und durch sie bedingte Aktivierung der Adenylatcyclase getragen wird (Hattori et al. 1988). Im menschlichen Herzen sind vor allem  $H_2$ -Rezeptoren von Bedeutung, welche sowohl im Vorhof als auch im Ventrikel durch Radioligandenbindung (Baumann et al. 1982; Baumann et al. 1983; Baumann et al. 1984), sowie mittels Antikörpern und RNA-Nachweis (Naoyuki Matsuda et al. 2004) nachgewiesen werden konnten. In Präparaten des menschlichen Herzvorhofs bewirkte Histamin über diese  $H_2$ -Rezeptoren einen positiv inotropen Effekt (Genovese et al. 1988; Sanders et al. 1996; Thoren et al. 2011; Zerkowski et al. 1993). Die Infusion von Histamin in Probanden führte zu einer Steigerung der Herzfrequenz sowie des Anstiegs der Kraft des linken Ventrikels (Vigorito et al. 1983). Im Gegensatz zu Mäusen, Hunden, Ratten oder Katzen scheint diese Wirkung nicht auf der Freisetzung endogener Katecholamine zu beruhen: In vitro Versuche, in denen ein Effekt von Katecholaminen aus neuronalen Strukturen durch Gabe von Propranolol oder Reserpin, bzw. Verwendung isolierter denervierter Kardiomyozyten ausgeschlossen wurde, zeigten eine über  $H_2$ -Rezeptoren vermittelte Wirkung von Histamin auf menschliche Kardiomyozyten (Sanders et al. 1996). Außerdem konnte der positiv inotrope Effekt eines relativ selektiven  $H_2$ -Rezeptoragonisten namens Impromidin auf menschliche Herzmuskelpräparate gezeigt werden (Baumann et al. 1981; Baumann et al. 1982; Baumann et al. 1983).

In einem transgenen Mausmodell mit für Kardiomyozyten spezifischer Überexpression des menschlichen Gs-Protein-gekoppelten  $H_2$ -Rezeptors ( $H_2$ -TG) im Vergleich zu Wildtypen (WT) führte Histamin zu einem positiv inotropen Effekt nur an Herzvorhofpräparaten von transgenen

Mäusen (Gergs et al. 2019; Gergs et al. 2020; Gergs et al. 2021; Neumann et al. 2021a; Neumann et al. 2021b; Neumann et al. 2021c; Neumann et al. 2021d). Dabei können WT-Präparate als Kontrolle genutzt werden, da H<sub>2</sub>-Rezeptoren dort funktionell keine Rolle spielen (Bartlet 1963; Dai 1976; Gergs et al. 2019; Laher and McNeill 1980a, 1980b; Wellner-Kienitz et al. 2003; Werner Flacke et al. 1967). Eine mögliche Ausnahme sind Sinusknotenzellen des rechten Vorhofs, welche möglicherweise über Maus-WT H<sub>2</sub>-Rezeptoren verfügen, welche menschlichen H<sub>2</sub>-Rezeptoren funktionell ähneln (Jacob et al. 2023a). Somit ist ein positiv chronotroper Effekt von Histamin, vermittelt über Maus-WT H<sub>2</sub>-Rezeptoren, anzunehmen.

H<sub>1</sub>-Rezeptoren spielen im menschlichen Herzen gegenüber H<sub>2</sub>-Rezeptoren eine untergeordnete Rolle (Guo et al. 1984; Naoyuki Matsuda et al. 2004; Rayo Abella et al. 2024), sodass der Fokus dieser Arbeit im Folgenden auf H<sub>2</sub>-Rezeptoren liegen soll, welche durch Radioligandenbindung im menschlichen Herzen in hoher Dichte nachgewiesen werden konnten (Brattelid et al. 2004).

## 1.2 Arten und Eigenschaften von Serotoninrezeptoren

Für das biogene Amin Serotonin (5-Hydroxyindolamin oder 5-HT) sind sieben verschiedene Rezeptorsubtypen mit einer Vielzahl von Spleißvarianten bekannt (McCorvy and Roth 2015; Neumann et al. 2023; Neumann et al. 2024). Die Wirkungen einer Aktivierung durch 5-HT unterscheiden sich je nach Rezeptor und zellulärer Lokalisation (Neumann et al. 2023; Neumann et al. 2024). Einige dieser Rezeptoren können möglicherweise neben dem körpereigenen Liganden Serotonin auch weitere Substanzen binden, was für eine Vielzahl pharmakologisch genutzter Effekte relevant ist. Rezeptoren des Subtyps 2A (5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren) im ZNS sind beispielsweise vermutlich verantwortlich für die halluzinogene Wirkung vieler psychotroper Substanzen, darunter auch LSD (Schlag et al. 2022). Auch im Herzen kommen Serotoninrezeptoren vor: Jedoch werden im menschlichen Herzen alle inotropen und chronotropen Effekte des Serotonins über Gs-Protein-gekoppelte 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren vermittelt (Neumann et al. 2023). Um das Verhalten dieses Subtyps zu untersuchen, wurde ein transgenes Mausmodell mit für Kardiomyozyten spezifischer Überexpression des menschlichen 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptors (5-HT<sub>4</sub>-TG) generiert (Gergs et al. 2010). Analog zur fehlenden Wirkung des Histamins auf WT-Maus Kardiomyozyten, übt Serotonin auf die Herzen von WT-Mäusen keine rezeptorvermittelten inotropen Effekte aus, da der Rezeptor dort funktionell fehlt (Gergs et al. 2010; Gergs et al. 2013; Gergs et al. 2019; Neumann et al. 2019; Neumann et al. 2021b), sodass WT-Mäuse als Kontrolle genutzt werden können. Entsprechend zeigte sich nur an Herzen von 5-

HT<sub>4</sub>-TG-Mäusen sowohl in vitro als auch in vivo ein positiv inotroper Effekt von Serotonin (Gergs et al. 2010; Gergs et al. 2013).

### 1.3 Signaltransduktion von Gs-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Sowohl der H<sub>2</sub>-Rezeptor als auch der 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor sind membranständige heptahelicale Proteine, die ihre Wirkung nach Ligandenbindung über ein assoziiertes GTP-bindendes Protein (G-Protein) vermitteln, welches über Stimulierung einer Adenylatcyclase (AC) zur gesteigerten Umwandlung von ATP in cAMP führt (Abbildung 1). cAMP steigert die Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) (Sanders et al. 1996), welche ihrerseits verschiedene intrazelluläre Zielproteine phosphoryliert, beispielsweise den L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanal (LTCC). Dies bedingt eine höhere Offenwahrscheinlichkeit des Kanals für Ca<sup>2+</sup> und durch Interaktion des Ca<sup>2+</sup> mit dem sarkoplasmatischen Ryanodinrezeptor (RyR) eine ebenfalls gesteigerte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum, was zur Kontraktion der Myofilamente führt (positive Inotropie). Die Entfernung des Ca<sup>2+</sup> aus dem Zytosol und somit die Beendigung der Kontraktion erfolgt durch die sarkoplasmatische Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA), welche es aktiv zurück in das sarkoplasmatische Retikulum transportiert, wo es an Calsequestrin (CSQ) bindet. Phospholamban (PLB) reguliert diesen Ca<sup>2+</sup>-Rücktransport, indem es in seiner nicht phosphorylierten Form die Pumpfunktion von SERCA inhibiert. Durch die aktivierte PKA auf Serin 16 phosphoryliertes PLB verliert diese Funktion, sodass Ca<sup>2+</sup> schneller aus dem Zytosol entfernt wird und so die Relaxation der Herzmuskelzelle durch Stimulation z.B. des H<sub>2</sub>- und des 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptors beschleunigt wird (positive Lusitropie). Phosphoryliertes Phospholamban als Produkt der PKA ist also ein Indikator für eine große Menge von cAMP im Zytosol, beispielsweise durch Stimulation eines der beiden betrachteten Rezeptoren. Weitere Effekte der PKA bedingen positiv inotrope und chronotrope Effekte, beispielsweise auch nach Aktivierung von β<sub>1</sub>-adrenergen Rezeptoren bei Sympathikusaktivierung. Der menschliche β-Adrenozeptor ist ebenfalls ein Gs-Protein-gekoppelter Rezeptor, welcher nach Bindung seiner Liganden (endogen Adrenalin oder Noradrenalin, exogen bspw. Isoprenalin), ebenfalls die Adenylatcyclase stimuliert (Eckel et al. 1982).

In der Abbildung 1 weiterhin dargestellt sind die Rezeptor-Antagonisten Cimetidin (für den H<sub>2</sub>-Rezeptor) sowie Tropicsetron (für den 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor), welche entsprechend gegenteilige Wirkungen aufweisen. Bei beiden handelt es sich um Medikamente mit klinischer Relevanz: Cimetidin und verwandte Substanzen erlangten früh eine Bedeutung zur Senkung der Magensäureproduktion (was jedoch heute klinisch keine häufige Indikation für H<sub>2</sub>-Antagonisten

mehr ist). Tropisetron und verwandte Substanzen wirken antagonistisch am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor und sind daher zur Prophylaxe und Behandlung starker Übelkeit bei Chemotherapien von Belang, haben aber eben auch einen antagonistischen Effekt am für diese Arbeit relevanten 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor (Kaumann et al. 1990). Auch ein synthetischer selektiver Antagonist des 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptors, GR124587, zeigte in einzelnen Experimenten zu Tropisetron vergleichbare Effekte. Diese Substanz spielt jedoch im klinischen Alltag keine Rolle. Daher soll in dieser Arbeit die Wirkung von Tropisetron betrachtet werden, da es als Medikament zugelassen ist und in Versuchen bereits an menschlichen kardialen 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren verwendet wurde (Kaumann and Levy 2006).

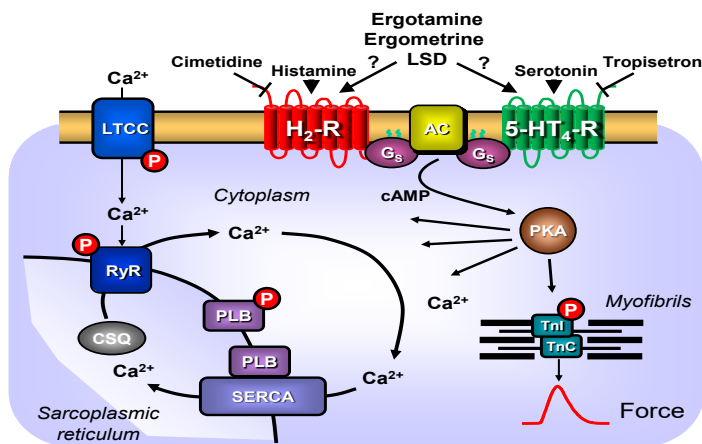


Abbildung 1: Schematische Darstellung der dem H<sub>2</sub>-Rezeptor und dem 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor nachgeschalteten intrazellulären Signalkaskaden in einer Herzmuskelzelle, sowie Agonisten und Antagonisten an den beiden Rezeptoren; H<sub>2</sub>-R= H<sub>2</sub>-Rezeptor, 5-HT<sub>4</sub>-R= 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor, AC= Adenylatcyclase, LTCC= spannungabhängiger L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanal, G<sub>s</sub>= stimulatorisches G-Protein, Ca<sup>2+</sup>=Calciumionen, RyR= Ryanodinrezeptor, P= organisches Phosphat, CSQ= Calsequestrin, PLB= Phospholamban, cAMP= zyklisches Adenosinmonophosphat, PKA= Proteinkinase A, TnI= Troponin I, TnC= Troponin C (Quelle: verändert nach Gergs et al., 2024)

#### 1.4 Geschichte, Eigenschaften und Verwendung von LSD

Ursprünglich 1938 von Albert Hofmann in Basel entdeckt, ist Lysergsäurediethylamid (LSD) aufgrund seiner sehr starken halluzinogenen Eigenschaften seither als psychedelische Droge missbräuchlich verwendet worden (Gregorio et al. 2016), wobei auch Fälle von Intoxikationen beschrieben worden sind (Schlag et al. 2022). Der Konsum ist seit 1971 in Deutschland laut dem Betäubungsmittelgesetz verboten, in jüngerer Zeit wird jedoch wieder vermehrt über einen möglichen medizinischen Nutzen der Substanz debattiert (Gasser et al. 2015). LSD kann an eine Vielzahl von Rezeptoren im menschliche Organismus binden, unter anderem an verschiedene Dopaminrezeptoren und Serotoninrezeptoren (Roth et al. 2002). Die halluzinogene Wirkung ist vielleicht auf 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren zurückzuführen (Preller et al. 2017), es erschien jedoch naheliegend, daß die Substanz auch an andere Serotoninrezeptoren binden könnte, unter anderem auch an menschliche 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren, welche nicht zuletzt im menschlichen Herzen vorkommen. Um dies zu untersuchen, wurde ein in unserer Arbeitsgruppe hergestelltes

transgenes Mausmodell mit für Kardiomyozyten spezifischer Überexpression des menschlichen 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptors im Vergleich zu WT verwendet (Gergs et al. 2010).

Vergleichbar mit anderen Derivaten der Lysergsäure, beispielsweise den in der Parkinson-Therapie eingesetzten Ergot-Derivaten Lisurid oder Cabergolin, ist die Wirkung von LSD jedoch nicht auf einen Rezeptortyp beschränkt: LSD bindet z.B. auch an kardiale H<sub>2</sub>-Rezeptoren des Kaninchens und des Meerschweinchens. Niedrige Konzentrationen steigern die Herzfrequenz in isolierten Präparaten des rechten Herzvorhofes des Kaninchens, während höhere sie senken. Diese Wirkung lässt sich durch Zugabe des H<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten Cimetidin antagonisieren (Angus and Black 1980). Am Meerschweinchenherzen ließ sich durch LSD die positiv inotrope Wirkung von Histamin antagonisieren (Angus and Black 1980). Die Wirkung von LSD auf menschliche H<sub>2</sub>-Rezeptoren war hingegen nach unserem Wissen bisher nicht untersucht worden. Um diese Lücke zu schließen, wurde das transgene Mausmodell mit für Kardiomyozyten spezifischer Überexpression des menschlichen H<sub>2</sub>-Rezeptors im Vergleich zu WT verwendet. Die chemisch strukturellen Ähnlichkeiten von LSD sowie des nachfolgend behandelten Ergotamins mit Serotonin und Histamin sind im Folgenden dargestellt (Abbildung 2).

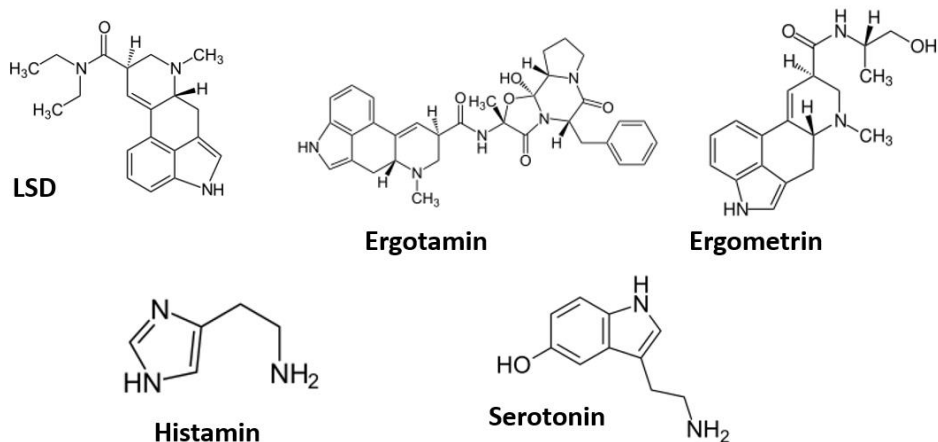


Abbildung 2: Strukturformeln von LSD, Ergotamin, Ergometrin, Histamin und Serotonin (Quellen siehe Anhang)

Die missbräuchliche Verwendung von LSD als halluzinogene Substanz, aber auch eine mögliche zukünftige medizinische Verwendung könnten insbesondere im Rahmen von Intoxikationen über H<sub>2</sub>-oder 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren zu kardialen (Neben)wirkungen führen. Bei Intoxikationen durch LSD kommt es in ca. 40% der Fälle zu kardialen Nebenwirkungen (Leonard et al. 2018; Passie et al. 2008). Daher ist ein Ziel von Untersuchungen zu LSD an Histamin- und Serotoninrezeptoren des menschlichen Herzens die Klärung der Fragestellung, ob solche Nebenwirkungen eventuell durch Gabe von Rezeptorantagonisten therapiert werden könnten.

## 1.5 Geschichte, Eigenschaften und Verwendung von Ergotamin

Ergotamin (2'-methyl-5' $\alpha$ -benzyl-12'-hydroxy-3',6',18-trioxoergotaman) ist ein Alkaloid aus dem Pilz *Claviceps purpurea* (deutsch Mutterkornpilz, bekannt als Schädling im Getreideanbau). Intoxikationen durch Ergotamin, besser bekannt als Ergotismus oder Antoniusfeuer, führen zu potentiell bedrohlichen arteriellen Gefäßspasmen durch Stimulation von  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren sowie Halluzinationen (Cervellin et al. 2020; Huybrechts et al. 2021; Liegl and McGrath 2016; Stange et al. 2008). Die Synthese von Ergotamin in *Claviceps purpurea* erfolgt durch kovalente Bindung von Alanin, Prolin und Phenylalanin an die chemische Leitsubstanz Lysergsäure (Jamieson et al. 2021). Ergotamin erlangte neben seiner historischen Relevanz als Ursache von Massenvergiftungen durch befallenes Getreide in der Moderne Bedeutung als Medikament zur Behandlung der Migräne (Ngo and Tadi 2023; Nguyen et al. 2022). Erstmals isoliert von Arthur Stoll 1918, bindet und aktiviert Ergotamin unter anderem zerebrale 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptoren und 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren (Ngo and Tadi 2023). Die Aktivierung letzterer bedingt vermutlich seinen halluzinogenen Effekt (Gulbranson et al. 2002; Silberstein and McCrory 2003a). Weiterhin führt Ergotamin durch die Aktivierung peripherer vaskulärer 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren und  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren zur Vasokonstriktion (Silberstein and McCrory 2003a).

Ergotamin führte in früheren Experimenten zu keinen inotropen Effekten am Katzenherz (Rabinowitz et al. 1975), was jedoch an der speziesspezifischen funktionellen Abwesenheit funktioneller H<sub>2</sub>-Rezeptoren und 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren liegen mag (Laher and McNeill 1980a, 1980b; Übersicht: Neumann et al. 2021e). Das Bindungsverhalten anderer chemisch verwandter Substanzen, wie LSD und Ergometrin, an H<sub>2</sub>-Rezeptoren des Meerschweinchens bzw. Kaninchens (Bongrani et al. 1979; Neumann et al. 2021e) gab dennoch Anlass, eine mögliche Aktivierung des menschlichen H<sub>2</sub>-Rezeptors mit dementsprechenden kardialen Wirkungen mittels des hier beschriebenen H<sub>2</sub>-TG Mausmodells zu untersuchen, insbesondere da Ergotamin mit einem Azolring eine strukturelle Ähnlichkeit mit dem Imidazolring des Histamins aufweist. Die Wirkung von Ergotamin auf menschliche H<sub>2</sub>-Rezeptoren war unseres Wissens bis dato nicht gezeigt worden.

Weiterhin liegt es aufgrund der Bindung von Ergotamin an Serotoninrezeptoren des Subtyps 1 und 2A sowie der Ähnlichkeit der chemischen Strukturen (Tryptaminring sowohl in Ergotamin als auch in Serotonin) nahe, daß es auch an andere menschliche Serotoninrezeptoren binden könnte. Von kardialer Bedeutung sind dabei die 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren. Daher wurde eine mögliche Aktivierung des menschlichen 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptors mit dementsprechenden kardialen Wirkungen



mittels des 5-HT<sub>4</sub>-TG Mausmodells im Vergleich zu WT untersucht. Die Wirkung von Ergotamin auf menschliche 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren ist unseres Wissens bisher ebenfalls nicht untersucht worden. Daß Ergotamin prinzipiell an verschiedene Rezeptoren binden kann, wurde bereits mittels Kristallographie gezeigt, in diesem Fall jedoch in Bezug zu 5-HT<sub>2A</sub> und 5-HT<sub>2B</sub>-Rezeptoren (Wang et al. 2013).

Analog zu LSD, sind die rezeptorvermittelten kardialen Wirkungen von Ergotamin, insbesondere vor dem Hintergrund seiner pharmakologischen Verwendungen sowie den Massenvergiftungen der Vergangenheit, von Interesse angesichts möglicher Therapiemöglichkeiten.

### 1.6 Geschichte, Eigenschaften und Verwendung von Ergometrin

Ergometrin (6aR,9R)-N-((S)-1-hydroxypropan-2-yl)-7-methyl-4,6,6a,7,8,9-hexa-hydro-indolo-[4,3-fg]chinolin-9-carboxamid oder auch Lysergsäure β-Ethanolamid oder auch Ergonovin) ist neben dem zuvor behandelten Ergotamin ein wichtiges Alkaloid aus dem Mutterkornpilz, sowie verwandten Arten und wurde 1935 von Arthur Stoll, dem Entdecker des Ergotamins, erstmals beschrieben. Ergometrin bzw. insbesondere sein Derivat Methylergometrin kann als Medikament zur Blutstillung bei postpartaler Hämorrhagie eingesetzt werden und steht als solches auf der *Model List of Essential Medicines* (World Health Organisation 2019), sodass ein gutes Verständnis der pharmakologischen Wirkung dieser Substanz wünschenswert ist. Auch diagnostisch wird Ergometrin – außerhalb Deutschlands - zur Erkennung der Prinzmetal- Angina sowie vereinzelt für Stressechokardiographien eingesetzt (Selva et al., 1989). Es hat eine fast 100 %-ige orale Bioverfügbarkeit und eine Plasmahalbwertszeit von ca. 1,4h (Groot et al. 1993).

Analog zu LSD und Ergotamin kann Ergometrin an zerebrale 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren binden und über diese einen halluzinogenen Effekt entfalten (Cortijo et al. 1997), weshalb Ergometrin auch teilweise missbräuchlicherweise eingenommen wird (Ott and Neely 1980). Weiterhin führt Ergometrin durch die Aktivierung peripherer vaskulärer 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren und α<sub>1</sub>-Adrenozeptoren zur Vasokonstriktion (Silberstein and McCrory 2003a). Es konnte zudem gezeigt werden, daß Ergometrin die Kontraktionskraft im Herzen des Meerschweinchens steigert, welches funktionelle H<sub>2</sub>-Rezeptoren enthält (Bongrani et al. 1979; Neumann et al. 2021e). Ein möglicher Effekt von Ergometrin auf menschliche H<sub>2</sub>-Rezeptoren wurde unseres Wissens nach bisher nicht untersucht, sodass sich entschlossen wurde, eine mögliche Aktivierung des menschlichen H<sub>2</sub>-Rezeptors mit dementsprechenden kardialen Wirkungen mittels des H<sub>2</sub>-TG Mausmodells im Vergleich zu WT zu untersuchen.

Der Agonismus von Ergometrin an 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren lässt vermuten, daß es ebenso an weitere Subtypen des Serotoninrezeptors binden kann, so auch an den für mögliche kardiale Wirkungen des Serotonins verantwortlichen 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor, insbesondere da Ergometrin chemisch ebenfalls den im Serotonin vorhandenen Tryptaminring enthält. Daher wurde sich entschlossen, eine mögliche Aktivierung des menschlichen 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptors durch Ergometrin mit dementsprechenden kardialen Wirkungen mittels des 5-HT<sub>4</sub>-TG Mausmodells im Vergleich zu WT zu untersuchen. Die chemische Struktur der betrachteten Substanzen sowie deren Ähnlichkeiten (Azolring in Ergometrin und Histamin) ist in Abbildung 2 dargestellt.

Ergometrin bzw. Derivate wie Methylergometrin finden weit verbreitet Einsatz in der Medizin. Bei der Gabe von Ergometrin zu diagnostischen oder therapeutischen Zwecken konnte teilweise eine Steigerung der Herzfrequenz beobachtet werden (Cortell et al. 2010; Song et al. 2018). Daher besteht ein Interesse daran, zu untersuchen ob eine Behandlung möglicher kardialer Nebenwirkungen mit Antagonisten an H<sub>2</sub>-oder 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren eine therapeutische Alternative sein könnte.

## 2. Zielsetzung

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war es, einen möglichen Agonismus von LSD, Ergotamin und/oder Ergometrin an menschlichen H<sub>2</sub>-Rezeptoren bzw. 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren, oder ggf. dessen Fehlen, nachzuweisen. Zu diesem Zwecke wurden als Modell die spontan schlagenden rechten Vorhofpräparate und die elektrisch stimulierten linken Vorhofpräparate transgener Mäuse mit kardiomyozytenspezifischer Überexpression des menschlichen 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptors bzw. des menschlichen H<sub>2</sub>-Rezeptors im Vergleich zu vergleichbaren Wildtypen (WT) verwendet.

Hierzu sollte ein Vergleich der Kontraktionsversuche der Mausvorhofpräparate von transgenen gegenüber WT-Tieren unter dem Einfluss von steigenden Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen gezogen werden, bei ansonsten identischen Bedingungen, um auf die transgenen Rezeptoren rückzuführende herzmechanische Wirkungen von LSD, Ergotamin und Ergometrin hinsichtlich Potenz und Effektivität beurteilen zu können. Eine Bestätigung der Beteiligung des H<sub>2</sub>-Rezeptors bzw. des 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptors sollte ggf. durch Nachweis der Reversibilität dieser Effekte durch Gabe der jeweiligen Rezeptorantagonisten Cimetidin bzw. Tropisetron erfolgen.

Weiterhin sollte die Beteiligung des H<sub>2</sub>-Rezeptors bzw. des 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptors an der Wirkung von LSD, Ergotamin und Ergometrin durch vergleichende Bestimmung von phosphoryliertem Phospholamban (PLB 16) in WT und transgenen Mausvorhofpräparaten untersucht werden, da PLB 16 Teil der anzunehmenden intrazellulären Signalkaskade bei Aktivierung dieser Rezeptoren ist.

Weiterhin wurde die isometrische Kontraktion elektrisch stimulierter menschlicher Herzmuskelpräparate aus dem rechten Vorhof, welche im Rahmen von Bypass-Operationen verfügbar wurden, untersucht. Die Identifizierung der für die beobachteten Effekte verantwortlichen Rezeptoren erfolgte durch Gabe verschiedener rezeptorspezifischer Antagonisten, nämlich Cimetidin für den hH<sub>2</sub>-Rezeptor, Tropisetron für den h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor und Propranolol für den menschlichen  $\beta$ -Rezeptor.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Maus

#### 3.1.1 TIERZUCHT

Die Bedingungen der Versuche entsprachen den Richtlinien des *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 8th edn. (2011) (National Academies Press (US) 2011) . Die Versorgung und Handhabung der Tiere entsprachen den Vorgaben zum Tierschutz der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Das Verfahren zur Generation der beiden transgenen Mauslinien sowie deren initiale Beschreibung sind bereits publiziert (Gergs et al. 2010; Gergs et al. 2019). Grob vereinfacht beschreibend wurde die cDNA für den menschlichen H<sub>2</sub>-Rezeptor oder den menschlichen 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor in die Promotorregion des Gens der schweren Kette des kardialen  $\alpha$ -Myosins eingefügt, um eine für Kardiomyozyten spezifische Überexpression des jeweiligen menschlichen Rezeptorproteins auf der Zelloberfläche zu erreichen. Für die Versuche wurden mindestens 12 Wochen alte Tiere beider Geschlechter der transgenen Linien im direkten Vergleich zu WT-Tieren verwendet. Die Tiere aller drei verwendeten Genotypen des Stammes CD1 wurden mit Leitungswasser und handelsüblichem Labortierfutter versorgt und in schallisolierten, klimatisierten Räumen im 12:12 Hell-Dunkel-Zyklus durch die Zentrale Tierhaltung der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg entsprechend den gesetzlichen Vorschriften gehalten und versorgt.

Nach Geburt wurden die Tiere durch aus dem Ohr entnommene Gewebeproben mittels PCR-Amplifikation und Agarose-Gelelektrophorese genotypisiert und durch eine Kombination von Ohrmarkierungen identifiziert, um die verschiedenen Genotypen jederzeit differenzieren zu können. Dies war ebenfalls eine Dienstleistung der Core-Facility Tierhaltung. Es wurde eine Fallzahl von insgesamt mindestens 72 angestrebt. Die tatsächlichen Fallzahlen können höher liegen, da zusätzliche Versuche mit Rezeptorantagonisten durchgeführt wurden und in einigen Fällen aufgrund Versagens einzelner Präparate zusätzliche Versuche nötig wurden. Tierversuche wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Alle Versuche waren genehmigungsfreie, aber anzeigepflichtige Organentnahmen, welche unter dem Aktenzeichen I8M9 durchgeführt wurden. Die Dokumentation zu den Tieren erfolgte in der Software Tick@Lab der zentralen Tierhaltung, die auch die jährliche Anzeige der verbrauchten Tiere übernahm.

### 3.1.2 ORGANENTNAHME

Wie bereits von Gergs (Gergs et al. 2013) und Neumann (Neumann et al. 1998) beschrieben, wurden aus den entnommenen ganzen Herzen der Mäuse isolierte linke und rechte Vorhofpräparate erstellt. Dazu wurden anhand der Ohrmarkierungen die Tiere der benötigten Genotypen identifiziert und gewogen. Die Tiere wurden zunächst mit einer Überdosis (50-75 mg/kg Körpergewicht) Pentobarbital-Natrium (Narcoren) intraperitoneal euthanasiert, um Stress zu vermeiden und eine schmerzlose Organentnahme zu ermöglichen. Zur intraperitonealen Injektion wurden die Tiere in Rückenlage in der Hand gehalten und die zu applizierenden Substanzen mittels Kanüle in den Unterbauch injiziert. Anschließend wurde der vollständige Bewusstseinsverlust abgewartet und (ggf. wiederholt) durch Schmerzreize überprüft. Nach dem Tod erhielten die Mäuse unabhängig vom Genotyp eine intraperitoneale Injektion mit 1000 IE unfraktioniertem Heparin (0,2ml einer 5000 IE/ml Injektionslösung), um Koagulationsprozesse im Herzen während der nachfolgenden Präparation zu vermeiden. Die sich anschließende Organentnahme erfolgte nach Fixierung der Mäuse auf einer Präparierschale. Hierzu wurde zunächst die Bauchdecke eröffnet und anschließend das Zwerchfell von kaudal durchtrennt sowie der Thorax von ventral eröffnet. Nach unblutiger Darstellung des schlagenden Herzens wurde selbiges durch einen Schnitt zwischen Herz und Wirbelsäule mitsamt anhängenden Gefäßen und des Thymus entnommen und bei Raumtemperatur in zuvor frisch hergestellter Tyrode-Lösung (119.8 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.05 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.42 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 22.6 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.05 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 0.28 mM Ascorbinsäure und 5.05 mM Glucose) gelagert und durch sanftes Massieren von Blutresten befreit. Die Tyrode-Lösung soll dabei annähernd physiologische Bedingungen simulieren.

### 3.1.3 VORHOFPRÄPARATION

Das entnommene ganze Herz wurde nun in eine Präparierschale verbracht, die mit Tyrode-Lösung gefüllt war, die bei Raumtemperatur kontinuierlich mit 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> begast wurde. Mittels Schere und Pinzette wurden nun der rechte und linke Vorhof einzeln abgetrennt und sorgfältig von Gefäßen, Thymus sowie anderen Geweberesten befreit, wobei bei Präparation des rechten Vorhofs insbesondere auf den Erhalt des Sinusknotens zu achten war. Im Anschluss wurden beide Vorhöfe mit jeweils zwei Häkchen versehen, über die nachfolgend das Einhängen in die pro Versuch vier Doppelwandgefäße erfolgte. In Abbildung 3 sind zunächst ein entnommenes ganzes Herz, dann ein fertig präpariertes und zuletzt ein mit Häkchen versehene Herzvorhofpräparat dargestellt:

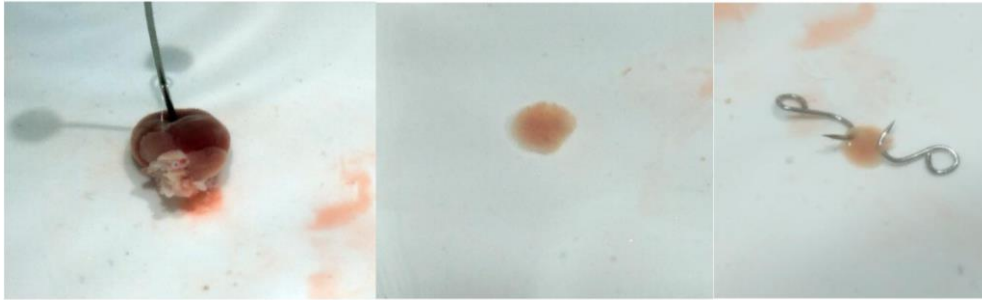


Abbildung 3: Photographien verschiedener Schritte des Präparationsprozesses von Mausvorhöfen: zunächst ein entnommenes ganzes Herz, dann ein fertig präparierter und zuletzt ein mit Häkchen für die spätere Aufhängung versehenes linkes Herzvorhofpräparat (Quelle: Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)

### 3.1.4 VERSUCHSAUFBAU

Die verwendeten Doppelwandgefäße wurden zunächst mit 10 ml kontinuierlich mit 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> begaster modifizierter Tyrode-Lösung befüllt, welche durch das Wasserbad im äußeren Volumen konstant bei 37°C gehalten wurde (Kim et al. 2004; Neumann et al. 1998). In das innere Volumen erfolgte die freie Aufhängung jeweils eines zuvor angefertigten Vorhofpräparates, wobei die Aufhängung eine (zuvor kalibrierte) kontinuierliche Messung der Zugspannung des Präparates bzw. deren Zu- und Abnahme im Rahmen von Kontraktionen beinhaltete. Der Kraftaufnehmer war über einen Brückenverstärker mit einem Computer verbunden, auf dem die Messwerte in Echtzeit durch die Software LabChart pro (AdInstruments LabChart Version 8 2017) dargestellt wurden. In Abbildung 4 ist der Versuchsaufbau im Doppelwandgefäß schematisch dargestellt.

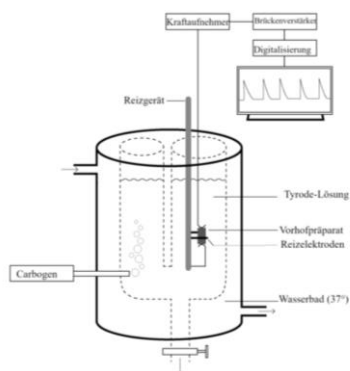


Abbildung 4: schematischer beschrifteter Versuchsaufbau eines im Doppelwandgefäß eingehängten Herzvorhofpräparates (Quelle: Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)

Die eingehängten Präparate wurden nun auf eine Zugspannung von 5 mN vorgedehnt, was gemäß Ruhedehnungskurve annähernd einer idealen Vorspannung entsprach. Die eingehängten rechten Vorhöfe begannen nach der Temperaturerhöhung sofort, spontan zu kontrahieren. Die Präparate der linken Vorhöfe hingegen mussten durch ein Reizgerät, dessen Elektroden in das Organbad eingetaucht waren, mit Rechteckimpulsen von 5 ms Dauer mit einer Frequenz von 1

Hz elektrisch stimuliert werden, um eine regelmäßige Kontraktion zu erreichen, wobei die Reizspannung ca. 20% oberhalb der empirischen minimalen Reizschwelle gewählt wurde.

### 3.1.5 MESSUNG

Zur Bestimmung eventueller chronotroper Effekte dienten aufgrund des erhaltenen Sinusknotens spontan schlagende Präparate des rechten Herzvorhofs, während mit 1 Hz elektrisch gereizte Präparate des linken Herzvorhofs zur Ermittlung der Kontraktionskraft und Bestimmung möglicher inotroper Effekte herangezogen wurden. Bestimmt wurden dabei neben der Kontraktionskraft auch die Zeit bis zur maximalen Kontraktion sowie bis zur maximalen Relaxation und der maximale Anstieg der Kraftentwicklung und des Kraftabfalls. Linke Vorhofpräparate mit einer initialen Kontraktionskraft  $<1,5$  mN, sowie rechte Vorhofpräparate mit durch suboptimale Präparation verursachten starken Arrhythmien wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

Nach Erreichen eines initialen Gleichgewichts durch wiederholtes Spülen der Präparate mit Tyrode-Lösung über mindestens 30 Minuten wurden die zu diesem Zeitpunkt gemessenen Ausgangswerte als Kontrollwerte definiert und anschließend kumulativ entweder LSD, Ergotamin oder Ergometrin in steigenden Mengen in das Organbad gegeben, um Konzentrations-Wirkungs-Kurven im Bereich von  $0,1 \mu\text{M}$  bis  $10 \mu\text{M}$  (Steigerung jeweils um den Faktor drei) zu erstellen. Dazu wurden nach jeder Substanzzugabe die Werte nach Erreichen eines Plateaus herangezogen. Anschließend wurde zusätzlich entweder Histamin (bei Verwendung  $\text{hH}_2$ -Rezeptor-transgener Mäuse) oder Serotonin (bei Verwendung  $\text{h5-HT}_4$ -transgener Mäuse) ebenfalls in steigender Menge hinzugegeben und eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve im Bereich von  $1 \text{ nM}$  bis  $10 \mu\text{M}$  erstellt. Dies sollte eine Aussage darüber liefern, ob die zuvor gegebene Substanz ein partieller oder vollständiger Agonist am jeweiligen Rezeptor sei. Wären LSD/Ergotamin/Ergometrin ein partieller Agonist, so sollte der nachfolgend gegebene vollständige Agonist Histamin bzw. Serotonin einen zusätzlichen Effekt bewirken. Sollte dieser fehlen, spräche dies für einen vollständigen Agonismus (Khonsary 2023).

Anschließend wurden beide zugegebenen Substanzen vollständig ausgewaschen und nach Festlegung der zu diesem Zeitpunkt gemessenen Werte als zweiter Kontrollwert eine zweite Konzentrations-Wirkungs-Kurve der initial zugegebenen Substanz LSD/Ergotamin/Ergometrin im Bereich  $0,1 \mu\text{M}$  bis  $10 \mu\text{M}$  erstellt, um für die abschließende Asservierung von Gewebe in flüssigem Stickstoff für die nachfolgende Proteinanalyse mittels Western Blot Präparate zu

erhalten, die ausschließlich durch 10  $\mu$ M LSD oder Ergotamin oder Ergometrin beeinflusst worden waren.

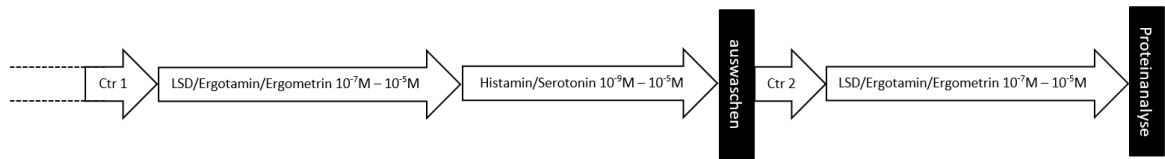


Abbildung 5: schematischer Versuchsablauf der Untersuchung der Mausvorhofpräparate

Da sich initial zugegebenes Ergotamin nicht wieder auswaschen ließ, wurden für die Proteinanalyse mit Ergotamin behandelte Proben zusätzliche Versuche mit verkürzten Versuchsschema (Abbildung 6) durchgeführt.



Abbildung 6: schematischer Versuchsablauf abgewandelt verkürzter Experimente bei Verwendung von Ergotamin zur Gewinnung von Präparaten für die molekularbiologische Untersuchung

Es ergaben sich demnach folgende Kombinationen zugegebener Substanzen:

- LSD + Histamin (an jeweils 6 hH<sub>2</sub>-Rezeptor-transgenen und 6 WT-Präparaten)
- LSD + Serotonin (an jeweils 6 h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen und 6 WT-Präparaten)
- Ergotamin + Histamin (an jeweils 6 hH<sub>2</sub>-Rezeptor-transgenen und 6 WT-Präparaten)
- Ergotamin + Serotonin (an jeweils 6 h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen und 6 WT-Präparaten)
- Ergometrin + Histamin (an jeweils 6 hH<sub>2</sub>-Rezeptor-transgenen und 6 WT-Präparaten)
- Ergometrin + Serotonin (an jeweils 6 h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen und 6 WT-Präparaten)

Ein typischer Versuchsablauf umfasste dabei jeweils die gleichzeitige Untersuchung des rechten und linken Vorhofpräparates jeweils einer transgenen und einer WT-Maus in insgesamt vier Organbädern unter identischen Bedingungen und Substanzkonzentrationen, um eine bessere Vergleichbarkeit der Genotypen zu erreichen. Dabei wurden zwischen den verschiedenen Versuchen die jeweiligen Positionen der Präparate der verschiedenen Genotypen in den vier Organbädern variiert, um eine Verzerrung der Ergebnisse durch mögliche Unterschiede zwischen den verwendeten Organbädern zu vermeiden.



In einzelnen Versuchen wurde darüber hinaus nach Zugabe von 10  $\mu$ M LSD oder Ergotamin oder Ergometrin durch zusätzliche Applikation von 10  $\mu$ M Cimetidin (bei Verwendung hH<sub>2</sub>-Rezeptor-transgener Präparate) oder Tropisetron (bei Verwendung h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgener Präparate) die Reversibilität des zuvor erreichten Effekts durch den Antagonisten des jeweils betrachteten Rezeptors untersucht. Auch ein selektiver Antagonist des 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptors, GR124587, wurde in einigen zusätzlichen Experimenten analog zu Tropisetron verwendet. Diese Substanz ist aber als Medikament nie zugelassen worden, spielt deshalb im klinischen Alltag keine Rolle und soll daher nicht Gegenstand dieser Arbeit sein.

Durch das Wiegen der Versuchstiere und entnommenen Herzen vor der Präparation der Muskelstreifen sollten Größenunterschiede der Herzen der verschiedenen Genotypen ausgeschlossen werden.

### 3.2 Mensch

Für Kontraktionsversuche an menschlichen Präparaten wurden in Zusammenarbeit mit der Herzchirurgie des Universitätsklinikums Halle bei Bypass-Operationen angefallenes Gewebe aus den rechten Herzvorhöfen von Patienten beiderlei Geschlechts mit koronarer Herzkrankheit CCS I-III und Herzinsuffizienz NYHA II-III verwendet. Die Vormedikation der Patienten beinhaltete Acetylsalicylsäure, Amlodipin, Apixaban, Atorvastatin, Furosemid, Lisinopril, Metoprolol, Pantoprazol, Sacubitril/Valsartan, Spironolacton, Ticagrelor und Torasemid. Der Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der Lösung in den Organbädern entsprachen denen der zuvor beschriebenen Kontraktionsversuche an Mauspräparaten. Aufgrund fehlender Spontanaktivität der menschlichen Herzmuskelpräparate (die Präparate bestehen ausschließlich aus Arbeitsmyokard, Sinus- oder AV-Knoten sind nicht enthalten) müssen diese elektrisch gereizt werden. Hierfür wurde eine Frequenz von 1 Hz gewählt, um eine vergleichbare Kontraktionsfrequenz mit der physiologischen menschlichen Herzfrequenz zu erreichen. Die Zustimmung der zuständigen Ethikkommission lag vor (hm-bü 04.08.2005).

Es erfolgte bei einigen Präparaten die Vorbehandlung mit dem Phosphodiesterasehemmstoff Cilostamid, welcher die im menschlichen Herzen relevante Phosphodiesterase 3 hemmt und somit die Wirkung aller Substanzen verstärkt, die über eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration von cAMP wirken, so also auch die postulierte Wirkung von LSD, Ergotamin oder Ergometrin über den hH<sub>2</sub>- oder den h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor, indem er den physiologischen Abbau des Signalstoffes cAMP zu AMP reduziert.

### 3.3 Western Blot

#### 3.3.1 HOMOGENISIERUNG

Nach Beendigung der Kontraktionsversuche wurden die Präparate sowohl von WT, als auch von transgenen Mäusen (hH<sub>2</sub>-TG und h5-HT<sub>4</sub>-TG), die zuvor 10 µM LSD oder Ergotamin oder Ergometrin ausgesetzt worden waren, sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und nach Zwischenlagerung bei -80°C homogenisiert. Dazu wurde das tiefgefrorene Vorhofpräparat mit 100 µl SDS-haltigem Homogenisationspuffer (siehe Anhang) versetzt und mit einem Mikro-Dismembrator (B. Braun Mikro-Dismembrator Typ S 2000 rpm 16mm Schüttelamplitude) durch eine Stahlkugel bei 2000 rpm pulverisiert. Nach dem Auftauen des Homogenats erfolgte für jedes Präparat eine Ultraschallhomogenisierung (Ultraschallstab von Bandelin UW 2070) auf Eis für 2x30 Sekunden und die Homogenate wurden dann für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation bei 14.000 rpm in einer auf 4°C gekühlten Eppendorf-Zentrifuge für 30 Minuten. Abschließend wurde der flüssige Überstand (Homogenat genannt) abpipettiert und das verbleibende feste Sediment verworfen.

#### 3.3.2 QUANTITATIVE PROTEINBESTIMMUNG NACH LOWRY

Die Ermittlung des Proteingehaltes der Homogenate folgte dem Protokoll von Lowry 1954 (Lösungen siehe Anhang). Dazu wurden definiert verdünnte Proben und Mengenstandards (aus Rinderserumalbumin) mit demineralisiertem Wasser hergestellt. Mithilfe eines Eppendorf BioPhotometers bei 595 nm wurde zunächst aus den bekannten Verdünnungen der Mengenstandards eine Standardkurve erstellt und durch Abgleich der mehrfachen photometrischen Messung der verdünnten Homogenate mit der Standardkurve deren Proteinkonzentration bestimmt. Es folgte die der ermittelten Proteinkonzentration entsprechende Verdünnung der Homogenate auf eine Proteinkonzentration von 20µg/µl. Um die visuelle Beurteilung der Elektrophorese zu erleichtern, wurden die Proben mit einem Bromphenolblau-haltigen SDS-Probenpuffer versetzt.

#### 3.3.3 SDS-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)

SDS-PAGE beschreibt die Wanderung zu untersuchender Proteine im elektrischen Feld durch ein Polyacrylamidgel nach Inkubation mit Natriumdodecylsulfat (SDS), um sie nach ihrer Größe aufzutrennen (Laemmli et al. 1970). Dazu wurde eine zuvor vorbereitete vertikale Elektrophorese-Apparatur mit Elektrophoresepuffer befüllt und jede der 20 Geltaschen mit 20

µg einer der zu untersuchenden Proben befüllt. Es folgte die Elektrophorese bei 100 V für 75 Minuten, wobei ein sogenannter Rainbow-Marker und das Bromphenolblau zur Beurteilung der Laufweite der Proben benutzt wurde. Wenn die Laufweite als ausreichend beurteilt wurde, wurde die Elektrophoresekassette entfernt und das Polyacrylamidgel entnommen.

#### 3.3.4 WESTERN BLOT

Im nächsten Schritt wurden die ihrer Größe entsprechend aufgetrennten Proteinbanden für die weitere Untersuchung per Western Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Dazu wurde das entnommene Gel in eine Transferkassette geschichtet. Das Transfersandwich war folgendermaßen aufgebaut: ausgehend von der Kathodenseite (-) ein Schaumstoffschwamm, ein Blatt Blottingpapier, das Gel, eine Nitrocellulosemembran (0,45 µm), ein Blatt Blottingpapier und wieder ein Schaumstoffschwamm. In einer Trans-Blot Zelle (BIO-RAD) konnten in Transferpuffer (siehe Anhang) nun über Nacht bei insgesamt 4,5 Ampère-Stunden die im Gel enthaltenen Proteine auf die Membran übertragen werden. Am nächsten Morgen wurde mit einer reversiblen Ponceau-Rot-Färbung kontrolliert, ob der Transfer erfolgreich war, indem unselektiv alle übertragenen Proteine auf der Membran angefärbt wurden.

#### 3.3.5 IMMUNOLOGISCHER PROTEINNACHWEIS

Die mit Ponceau-Rot gefärbte Membran wurde nun gescannt, um die erfolgreiche Elektrophorese und den Transfer zu dokumentieren. Außerdem konnte diese Kopie als Vorlage für das Schneiden der Membran genutzt werden. Dies war nötig, um die Membranbereiche des CSQ und die des PLB16 zu trennen, um sie getrennt voneinander mit dem jeweiligen passenden Antikörper inkubieren zu können. Die Molekulargewichte in kDa von CSQ und PLB16 waren bekannt, daher konnte anhand der standardisierten Laufweiten des Rainbow-Markers die Position der jeweiligen Banden abgeschätzt werden. Nun wurde die Membran geschnitten. Nach dem Schneiden wurde ein definierter Rand der Membranstreifen markiert, um ein späteres falsches Ablesen zu vermeiden. Die entstandenen Streifen wurden in geschlossene Inkubationskammern gelegt und mit 10 ml Tris-HCl Puffer mit pH 7,4 (TBST) 3 x 10 Minuten schüttelnd äquilibriert und der Ponceau-Farbstoff ausgewaschen. Dann wurden die Streifen mit je 10 ml Blocking-Puffer (siehe Anhang) weitere zwei Stunden schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert, um freie Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Für die Inkubation mit dem CSQ-Antikörper (polyklonaler anti Calsequestrin Antikörper (CSQ, abcam, Cambridge, UK) aus

Kaninchen) wurde 5% Milchpulver in TBST zum Blocken verwendet, für den Anti PS16-PLB Antikörper (polyklonaler anti phospho serine-16-PLB Antikörper (Antikörper wurde generiert gegen an Serin-16 phosphoryliertes Phospholamban, Badrilla, Leeds, UK) aus Kaninchen) wurde mit 2% Rinderserumalbumin in TBST geblockt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen spezifischen Antikörper, also Anti CSQ und Anti PLB16 in dem jeweiligen Blocking-Puffer für eine Stunde bei Raumtemperatur. Dieser wurde wieder ausgewaschen (3 x 10 Minuten TBST) und ein sekundärer mit Peroxidase markierter Antikörper (Anti rabbit IgG in Blocking-Puffer) gegen die beiden ersten Antikörper für eine Stunde zugegeben, um die mit Antikörper markierten Proteinbanden zu markieren. Dann wurden auch überschüssige zweite Antikörper wieder ausgewaschen (3 x 10 Minuten TBST) und der verbliebene gebundene zweite Antikörper mittels Enhanced Chemiluminescence (ECL, Amersham (Cytiva), Freiburg, Deutschland) und eines Amersham ImageQuant 800 imagers (Cytiva, Freiburg, Deutschland) dargestellt. So konnte für jede der untersuchten Proben die Menge von CSQ und PS16-PLB anhand der detektierten Signalintensität quantifiziert werden. Die Eigenschaften und Verwendungsmöglichkeiten dieser Antikörper wurden zuvor publiziert (Kirchhefer et al. 2002).

Dabei ist CSQ in seiner Konzentration unabhängig von der Aktivität der Signalkaskaden, welche dem H<sub>2</sub>- und dem 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor (Aktivierung der PKA) nachgeschaltet sind, und weist die Beladung des Gels mit Proteinen aus Kardiomyozyten nach. Phospholamban in seiner phosphorylierten Form hingegen entsteht als Produkt selbiger Signalkaskaden durch Aktivierung der PKA. Nicht phosphoryliertes PLB würde nicht nachgewiesen. Sollten LSD/Ergotamin/Ergometrin eine agonistische Wirkung am H<sub>2</sub>-Rezeptor bzw. 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor haben, so sollte sich in Proben, die selbigen Rezeptor aufgrund ihrer transgenen Eigenschaften tragen, nach Zugabe von 10 µM der jeweiligen Substanz eine erhöhte Konzentration von phosphoryliertem PLB im Vergleich zu identisch behandelten WT-Proben nachweisen lassen, während sich die Menge an CSQ aufgrund des identischen Proteingehaltes der Aliquots nicht relevant unterscheiden sollte ( Neumann et al. 2021d). Es wurde bereits gezeigt, daß Histamin über H<sub>2</sub>-Rezeptoren (H K Simmerman et al. 1986) und Serotonin über 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren (Christ et al. 2014; Gergs et al. 2010) die Phosphorylierung von Phospholamban steigern. Es wurde daher, unter der Annahme, daß die Konzentration des CSQ in verschiedenen Präparaten vergleichbar sei, für jedes Präparat sein jeweiliger Quotienten aus PS16-PLB und CSQ errechnet, um eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Proben untereinander zu erreichen.

Als Positivkontrolle bei der Bestimmung von PS16-PLB dienten Proben aus Herzvorhöfen von WT-Mäusen, welche zuvor mit dem β-Adrenozeptoragonisten Isoprenalin behandelt worden waren. Wie zuvor beschrieben, führt der aktivierte β-Adrenozeptor über einen vergleichbaren

intrazellulären Mechanismus wie der  $H_2$ - und der  $5-HT_4$ -Rezeptor zu einer erhöhten Phosphorylierung von Phospholamban an Serin 16. Bei dieser Probe ist also eine gesichert erhöhte Signalstärke für PS16-PLB im Westernblot zu erwarten. Eine weitere Besonderheit des Phospholambans liegt darin, daß es in zwei Zustandsformen vorliegen kann: In einer monomeren (ca. 5 kDa) und einer pentameren (ca. 25-30 kDa) Form. Unter physiologischen Bedingungen kommt es fast nur in seiner pentameren Form vor, welche aber unter SDS-Homogenisation zu kleinen Anteilen und unter Hitzeeinwirkung vollständig in die monomere Form zerfällt. Daher wurde neben einer mit Isoprenalin behandelten WT-Probe eine weitere verwendet, welche zuvor für 10 min bei  $95^\circ C$  erhitzt worden war und bei der folglich nur eine Bande bei 5 kDa zu erwarten war. Somit zeigten sich für PS16-PLB zwei Banden, von denen die hochmolekulare Bande (entsprechend dem Pentamer) bei der erhitzten Probe fehlte (Simmerman et al. 1986). Dies erleichterte die zweifelsfreie Identifikation von PLB 16 auf der Membran.

### 3.4 Datenanalyse

Die Aufzeichnung der Zugspannung der Präparate sowie die Berechnung von Kraft, Frequenz, Dauer der Kontraktion und Relaxation sowie des maximalen Anstiegs und Abfalls der Kraft erfolgte durch die LabChart Software (ADInstruments, Sydney, Australien). Die Berechnung der Mittelwerte, SEM sowie der p-Werte erfolgte mittels Microsoft Excel. Anschließend wurden die gewonnenen Daten mittels GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc, San Diego, USA) graphisch dargestellt.

Die Daten werden als Mittelwert  $\pm$  SEM (Standardfehler) angegeben. Die Beurteilung der statistischen Signifikanz erfolgte mittels Varianzanalyse und eines t-Tests. Ein  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant betrachtet.

### 3.5 Materialien

LSD wurde als Stammlösung (1.0 mg/ml in Acetonitril) bezogen von LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland. Ergotamin und Ergometrin standen als Stammlösung in Dimethylsulfoxid (DMSO) zur Verfügung. Histamin und Serotonin wurden von Sigma-Aldrich, Deutschland bezogen. Alle weiteren verwendeten Chemikalien waren von analytischer Reinheit. Alle verwendeten Lösungen wurden täglich frisch mit destilliertem Wasser hergestellt.

Bei der Wahl möglicher Antagonisten an den beiden betrachteten Rezeptoren wurde sich mit Cimetidin ( $H_2$ -Rezeptorantagonist) und Tropisetron ( $5-HT_4$ -Rezeptorantagonist) für zwei

zugelassene und im klinischen Kontext gut bekannte Substanzen entschieden. Tropisetron ist besser bekannt als 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonist, wurde jedoch auch bereits als 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptorantagonist beschrieben, wobei sein pK<sub>b</sub>-Wert mit 6,7 angegeben wurde (Kaumann et al. 1990).

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Vergleich der Versuchstiere

Es wurde von allen untersuchten Mäusen sowie deren ganzen entnommenen Herzen vor dem Beginn des Experimentes deren Gewicht gemessen und die relativen Herzgewichte als Quotienten von Herzgewicht und Tiergewicht berechnet, um mögliche relevante Unterschiede in der Größe der Tiere bzw. deren Herzen auszuschließen. Dabei ergaben sich für die beiden transgenen Mauslinien weder im Vergleich mit den WT-Mäusen noch im Vergleich untereinander signifikante Unterschiede ( $p > 0.05$ ). Die Vorhofpräparate wogen durchschnittlich 230 mg (WT), 238 mg (hH<sub>2</sub>-R-transgen) bzw. 235 mg (h5-HT<sub>4</sub>-R-transgen). Die Ergebnisse seien im Folgenden tabellarisch dargestellt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Vergleich des Körpergewichts der Mäuse, der entnommenen Herzen, sowie der relativen Herzgewichte als Anteil des Körpergewichts der verschiedenen Genotypen

	N	Herzgewicht	Mausgewicht	rel. Herzgewicht
WT	40	230 (±46) mg	37,52 (±7,09) g	6 (±1) mg/g
H <sub>2</sub> -TG	23	238 (±48) mg	38,66 (±6,52) g	6 (±1) mg/g
5-HT <sub>4</sub> -TG	20	235 (±42) mg	37,21 (±7,58) g	6 (±1) mg/g

Somit ist nicht davon auszugehen, daß die folgenden Ergebnisse durch systematische Unterschiede der Organgrößen verzerrt seien. Es wurden von allen Genotypen Versuchstiere beiderlei Geschlechts zufällig nach Verfügbarkeit verwendet. Die drei verwendeten Genotypen unterschieden sich dabei nicht relevant in der Verteilung der Geschlechter, sodass nicht von einer Verzerrung der Ergebnisse durch die Geschlechterverteilung auszugehen ist.

### 4.2 LSD

Es wurden Vorhofpräparate von hH<sub>2</sub>-transgenen Mäusen mit denen von WT-Mäusen verglichen. Dazu wurde kumulativ zunächst LSD in die Organbäder pipettiert, sodass die darin befindliche Konzentration von LSD schrittweise (multipliziert jeweils um den Faktor drei) von 0,1 µM auf 10 µM anstieg. Im Anschluss wurde zusätzlich ebenfalls schrittweise Histamin hinzugegeben

(Konzentration im Organbad von 1 nM bis 10  $\mu$ M ansteigend). Anschließend wurden gemäß des Versuchsprotokolls beide Substanzen vollständig ausgewaschen und erneut LSD nach demselben Schema hinzugegeben, bevor die Proben für die molekularbiologische Analyse tiefgefroren wurden (Abbildung 7). Dies geschah zeitgleich für jeweils ein WT und ein hH<sub>2</sub>-transgenes linkes und rechtes Vorhofpräparat, also jeweils vier Präparate.

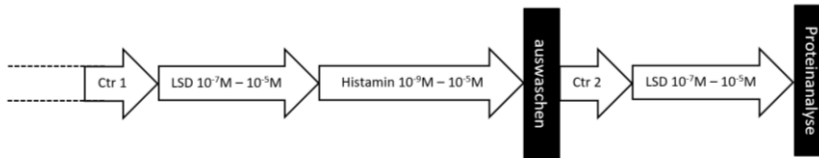


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs von H<sub>2</sub>-tg und WT rechten und linken Mausvorhöfen mit Zugabe von LSD und Histamin

#### 4.2.1 WT LINKE VORHOFPRÄPARATE

Linke Vorhofpräparate von WT-Mäusen zeigten keinen positiv inotropen Effekt unter Zugabe von LSD oder Histamin, wie das Mechanogramm in Abbildung 8 exemplarisch zeigt. Die Daten aus allen Versuchen unter diesen Bedingungen wurden zusammengefasst und in Abbildung 9 dargestellt.

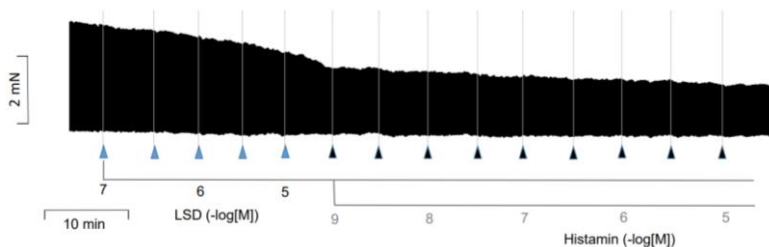


Abbildung 8: Repräsentatives Mechanogramm (exemplarisch): Effekt von 0,1 bis 10  $\mu$ M LSD, sowie nachfolgend von zusätzlich gegebenen 1 nM bis 10  $\mu$ M Histamin auf die Kontraktionskraft eines exemplarischen WT linken Vorhofpräparates der Maus. Waagrecht: Zeit, negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von LSD und nachfolgend Histamin, senkrecht: Durch das Präparat entwickelte Kontraktionskraft

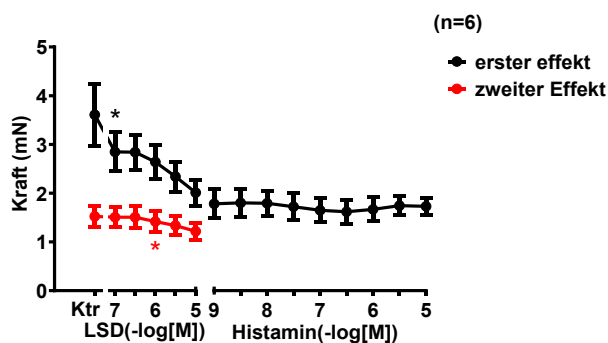


Abbildung 9: Effekt von LSD sowie nachfolgend zusätzlich gegebenem Histamin auf die Kontraktionskraft von WT linken Vorhofpräparaten der Maus. Der schwarze Graph stellt die gemessenen Werte unter initialer Gabe von LSD und nachfolgend zusätzlich gegebenem Histamin (nach dem Skalenstrich) dar, der rote die Werte unter anschließender erneuter Gabe von LSD nach zwischenzeitlichem Auswaschen aller zugegebenen Substanzen. Ktr=nach Einstellung des initialen Gleichgewichts gemessene Kontraktionskraft (schwarz), bzw. nach dem zwischenzeitlichen Auswaschen gemessener Wert (rot), Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von LSD sowie nachfolgend Histamin, Ordinate: absoluter Wert der gemessenen Kraftentwicklung mit SEM in mN, n=Anzahl der Experimente, \*=erster signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle (p<0,05)

#### 4.2.2 $H_2$ -TRANSGENE LINKE VORHOFPRÄPARATE

LSD verursachte an  $H_2$ -transgenen linken Vorhofpräparaten einen konzentrationsabhängigen positiv inotropen Effekt, der durch zusätzliche Gabe von Histamin nicht weiter zu steigern war, wie das Mechanogramm in Abbildung 10 exemplarisch zeigt. Die Daten aus allen Versuchen unter diesen Bedingungen wurden zusammengefasst und in Abbildung 11 dargestellt.

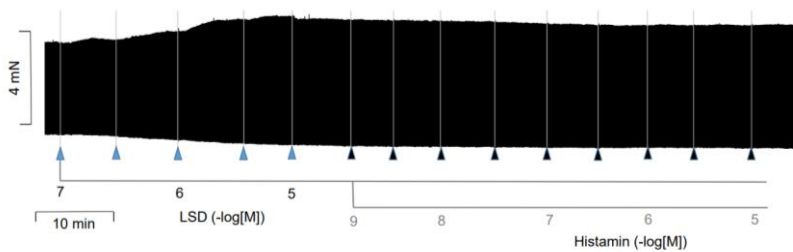


Abbildung 10: Mechanogramm (exemplarisch): Effekt von 0,1 bis 10  $\mu$ M LSD, sowie nachfolgend von zusätzlich gegebenen 1 nM bis 10  $\mu$ M Histamin auf die Kontraktionskraft eines exemplarischen  $H_2$ -Rezeptor-transgenen linken Vorhofpräparates der Maus. Waagrecht: Zeit, negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von LSD und nachfolgend Histamin, senkrecht: Durch das Präparat entwickelte Kontraktionskraft

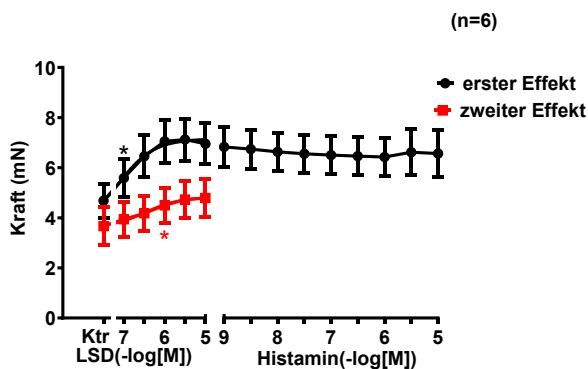


Abbildung 11: Effekt von LSD sowie nachfolgend zusätzlich gegebenem Histamin auf die Kontraktionskraft von  $H_2$ -Rezeptor-transgenen linken Vorhofpräparaten der Maus. Der schwarze Graph stellt die gemessenen Werte unter initialer Gabe von LSD und nachfolgend zusätzlich gegebenem Histamin (nach dem Skalenstrich) dar, der rote die Werte unter anschließender erneuter Gabe von LSD nach zwischenzeitlichem Auswaschen aller zugegebenen Substanzen. Ktr=nach Einstellung des initialen Gleichgewichts gemessene Kontraktionskraft (schwarz), bzw. nach dem zwischenzeitlichen Auswaschen gemessener Wert (rot), Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von LSD sowie nachfolgend Histamin, Ordinate: absoluter Wert der gemessenen Kraftentwicklung mit SEM in mN, n=Anzahl der Experimente, \*=erster signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle (p<0,05)

10  $\mu$ M LSD führten zu einer Erhöhung der Kontraktionskraft von 4,68 mN ( $\pm$ 1,52 mN) auf 6,95 mN ( $\pm$ 2,00 mN), was einer Steigerung um 48,5% entspricht.



Dabei wurden bei der ersten Gabe von LSD 0,1387 nM LSD und bei der zweiten Gabe 0,4025 nM LSD benötigt, um die Hälfte der jeweiligen erreichten Effektstärke von 10  $\mu$ M LSD zu erreichen. Die Angabe eines EC50-Wertes ist aufgrund der bei der zweiten Gabe nicht erwiesenermaßen erreichten Maximalwirkung von LSD nicht sinnvoll möglich. Dennoch zeigt dies, daß bei wiederholter Gabe von LSD eine höhere Konzentration nötig war, um die gleiche relative Steigerung der Effektstärke zu erreichen.

Weiterhin verkürzte LSD an diesen Präparaten die Zeit bis zur maximalen Kontraktion (Abbildung 12) und steigerte den maximalen Anstieg der Kraftentwicklung (Abbildung 13), ohne daß zusätzlich hinzugegebenes Histamin diese Effekte weiter verstärken konnte, wie aus den folgenden Diagrammen hervorgeht. Zudem zeigte sich die Dauer der Relaxation verkürzt, sowie der maximale Anstieg der Relaxation gesteigert.

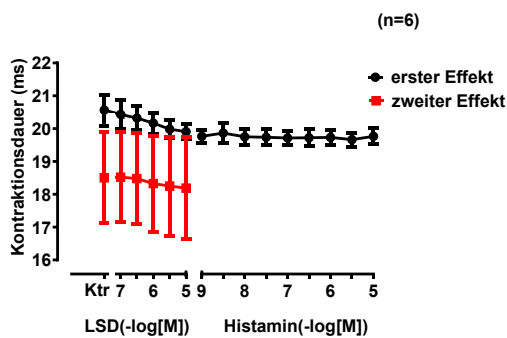


Abbildung 12: Effekt von LSD sowie nachfolgendzusätzlich gegebenem Histamin auf die Dauer der Kontraktion von  $hH_2$ -Rezeptor-transgenen linken Vorhofpräparaten der Maus. Der schwarze Graph stellt die gemessenen Werte unter initialer Gabe von LSD und nachfolgend zusätzlich gegebenem Histamin (nach dem Skalenstrich) dar, der rote die Werte unter anschließender erneuter Gabe von LSD nach zwischenzeitlichem Auswaschen aller zugegebenen Substanzen. Ktr=nach Einstellung des initialen Gleichgewichts gemessene Werte (schwarz), bzw. nach dem zwischenzeitlichen Auswaschen gemessener Wert (rot), Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von LSD sowie nachfolgend Histamin, Ordinate: absoluter Wert der Dauer der Kontraktion in ms, jeweils mit SEM, n=Anzahl der Experimente, \*=erster signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle ( $p < 0,05$ )

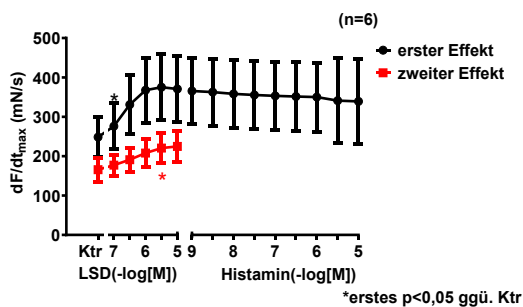


Abbildung 13: Effekt von LSD sowie nachfolgendzusätzlich gegebenem Histamin auf die maximale Anstiegssteilheit der Kontraktionsentwicklung von  $hH_2$ -Rezeptor-transgenen linken Vorhofpräparaten der Maus. Der schwarze Graph stellt die gemessenen Werte unter initialer Gabe von LSD und nachfolgend zusätzlich gegebenem Histamin (nach dem Skalenstrich) dar, der rote die Werte unter anschließender erneuter Gabe von LSD nach zwischenzeitlichem Auswaschen aller zugegebenen Substanzen. Ktr=nach Einstellung des initialen Gleichgewichts gemessene Werte (schwarz), bzw. nach dem zwischenzeitlichen Auswaschen gemessener Wert (rot), Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von LSD sowie nachfolgend Histamin, Ordinate:

absoluter Wert maximalen Anstiegssteilheit der Kontraktionsentwicklung in mN/s jeweils mit SEM, n=Anzahl der Experimente, \*=erster signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle (p<0,05)

Alle diese Effekte ließen sich bei der Wiederholung der Zugabe von LSD nach dem Auswaschen reproduzieren (vgl. jeweils rote Kurven der Diagramme).

#### 4.2.3 $hH_2$ -TRANSGENE RECHTE VORHOFPRÄPARATE

LSD verursachte an  $hH_2$ -transgenen rechten Vorhofpräparaten einen konzentrationsabhängigen positiv chronotropen Effekt, der durch zusätzliche Gabe von Histamin nicht weiter zu steigern war, wie das Mechanogramm in Abbildung 14 exemplarisch zeigt. Die Daten aus allen Versuchen unter diesen Bedingungen wurden zusammengefasst und in Abbildung 15 dargestellt.

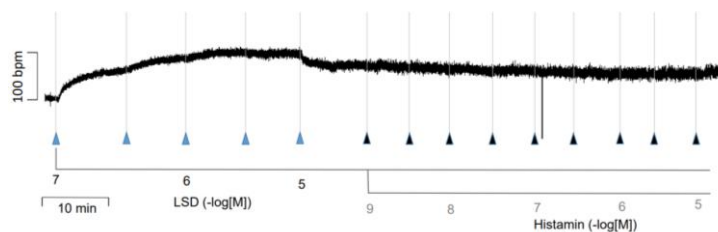


Abbildung 14: Mechanogramm (exemplarisch): Effekt von 0,1 bis 10  $\mu$ M LSD, sowie nachfolgend von zusätzlich gegebenen 1 nM bis 10  $\mu$ M Histamin auf die Frequenz eines exemplarischen  $hH_2$ -Rezeptor-transgenen rechten Vorhofpräparates der Maus. Waagrecht: Zeit, negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von LSD und nachfolgend Histamin, senkrecht: Frequenz des spontan schlagenden Präparates

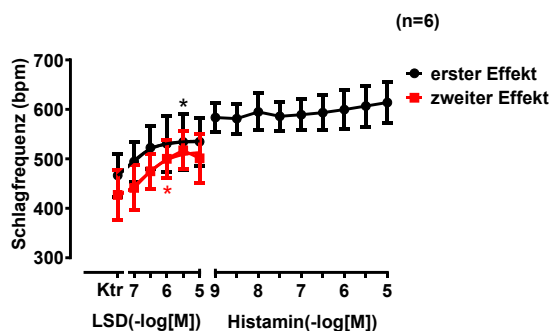


Abbildung 15: Effekt von LSD sowie nachfolgend zusätzlich gegebenem Histamin auf die Frequenz von  $hH_2$ -Rezeptor-transgenen rechten Vorhofpräparaten der Maus. Der schwarze Graph stellt die gemessenen Werte unter initialer Gabe von LSD und nachfolgend zusätzlich gegebenem Histamin (nach dem Skalenstrich) dar, der Rote die Werte unter anschließender erneuter Gabe von LSD nach zwischenzeitlichem Auswaschen aller zugegebenen Substanzen. Ktr=nach Einstellung des initialen Gleichgewichts gemessene Frequenz (schwarz), bzw. nach dem zwischenzeitlichen Auswaschen gemessener Wert (rot), Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von LSD sowie nachfolgend Histamin, Ordinate: absoluter Wert der gemessenen Frequenz mit SEM in beats per minute, n=Anzahl der Experimente, \*=erster signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle (p<0,05)

LSD (10  $\mu$ M) führte im Mittel zu einer Steigerung der Frequenz von 466,25 bpm ( $\pm$ 43,72 bpm) auf 544,97 bpm ( $\pm$ 40,96 bpm), was einer Steigerung um 16,88% entspricht.

Dieser Effekt ließ sich bei der Wiederholung der Zugabe von LSD nach dem Auswaschen reproduzieren (vgl. jeweils rote Kurven der Diagramme).

#### 4.2.4 h5-HT<sub>4</sub>-TRANSGENE LINKE VORHOFPRÄPARATE

Es wurden Vorhofpräparate von h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen Mäusen mit denen von WT-Mäusen verglichen. Es wurde dazu zunächst kumulativ LSD in die Organbäder pipettiert, sodass die darin befindliche Konzentration von LSD schrittweise (multipliziert jeweils um den Faktor drei) von 0,1  $\mu$ M auf 10  $\mu$ M anstieg. Im Anschluss wurde zusätzlich ebenfalls schrittweise Serotonin hinzugegeben (Konzentration im Organbad von 1 nM bis 10  $\mu$ M ansteigend). Anschließend wurden gemäß des Versuchsprotokolls beide Substanzen vollständig ausgewaschen und erneut LSD nach demselben Schema hinzugegeben, bevor die Proben für die molekularbiologische Analyse tiefgefroren wurden (Abbildung 16). Dies geschah zeitgleich für jeweils ein WT und ein h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenes linkes und rechtes Vorhofpräparat, also jeweils vier Präparate.

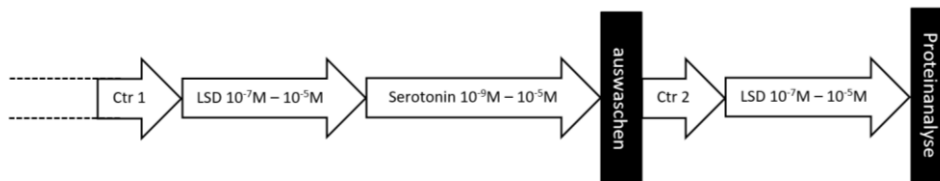


Abbildung 16: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs von 5-HT<sub>4</sub>-tg und WT rechten und linken Mausvorhöfen mit Zugabe von LSD und Serotonin

LSD bewirkte an h5-HT<sub>4</sub>-transgenen linken Vorhofpräparaten einen konzentrationsabhängigen positiv inotropen Effekt, der durch zusätzliche Gabe von Serotonin weiter zu steigern war, wie das folgende Mechanogramm exemplarisch zeigt (Abbildung 17). Die Daten aus allen Versuchen unter diesen Bedingungen wurden zusammengefasst und in Abbildung 18 dargestellt.

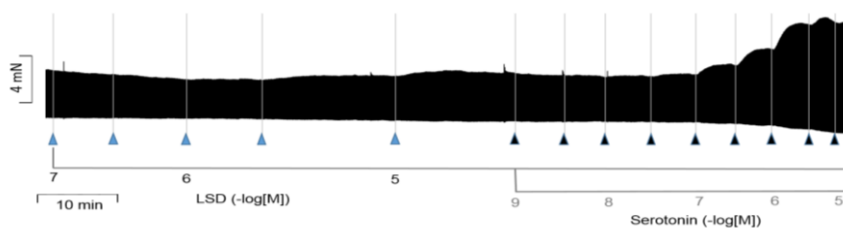


Abbildung 17: Mechanogramm (exemplarisch): Effekt von 0,1 bis 10  $\mu$ M LSD, sowie nachfolgend von zusätzlich gegebenen 1 nM bis 10  $\mu$ M Serotonin auf die Kontraktionskraft eines exemplarischen h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen linken Vorhofpräparates der Maus. Waagrecht: Zeit, negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von LSD und nachfolgend Serotonin, senkrecht: Durch das Präparat entwickelte Kontraktionskraft

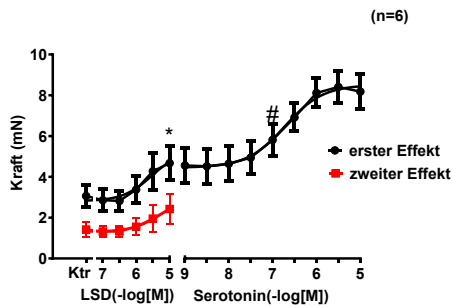


Abbildung 18: Effekt von LSD sowie nachfolgend zusätzlich gegebenem Serotonin auf die Kontraktionskraft von h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen linken Vorhofpräparaten der Maus. Der schwarze Graph stellt die gemessenen Werte unter initialer Gabe von LSD und nachfolgend zusätzlich gegebenem Serotonin (nach dem Skalenstrich) dar, der rote die Werte unter anschließender erneuter Gabe von LSD nach zwischenzeitlichem Auswaschen aller zugegebenen Substanzen. Ktr=nach Einstellung des initialen Gleichgewichts gemessene Kontraktionskraft (schwarz), bzw. nach dem zwischenzeitlichen Auswaschen gemessener Wert (rot), Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von LSD sowie nachfolgend Serotonin, Ordinate: absoluter Wert der gemessenen Kraftentwicklung mit SEM in mN, n=Anzahl der Experimente, \*=erster signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle (p<0,05), #=erster signifikanter Unterschied gegenüber 10 µM LSD

LSD (10 µM) bewirkte an h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen linken Vorhofpräparaten der Maus einen positiv inotropen Effekt von 3,06 mN (±0,70 mN) auf 4,67 mN (±0,73 mN), was einer Steigerung um 52,61% entspricht. Zusätzlich gegebenes Serotonin konnte einen darüberhinausgehenden zusätzlichen positiv inotropen Effekt mit einer Steigerung der Kontraktionskraft bis auf 8,18 mN (±1,95 mN) bewirken, was einer relativen Steigerung von 114% des Ausgangswertes entspricht.

Dabei wurden bei der ersten Gabe von LSD 3,101 nM LSD und bei der zweiten Gabe 6,23 nM LSD benötigt, um die Hälfte der jeweiligen erreichten Effektstärke von 10 µM LSD zu erreichen. Die Angabe eines EC<sub>50</sub>-Wertes ist aufgrund der nicht erwiesenermaßen erreichten Maximalwirkung von LSD nicht sinnvoll möglich. Dennoch zeigt dies, daß bei wiederholter Gabe von LSD eine höhere Konzentration nötig war, um die gleiche relative Steigerung der Effektstärke zu erreichen.

Um die maximale Effektstärke von LSD im Vergleich zu Serotonin zu quantifizieren, wurde aus diesen Daten der Effekt von LSD allein relativ zum Gesamteffekt von LSD und Serotonin als 29.37% ± 8.89% berechnet.

Weiterhin verkürzte LSD an diesen Präparaten die Zeit bis zur maximalen Kontraktionsentwicklung (Abbildung 19) und steigerte den maximalen Anstieg der Kraftentwicklung (Abbildung 20). Zudem zeigte sich die Dauer der Relaxation verkürzt, sowie der maximale Anstieg der Relaxation gesteigert.

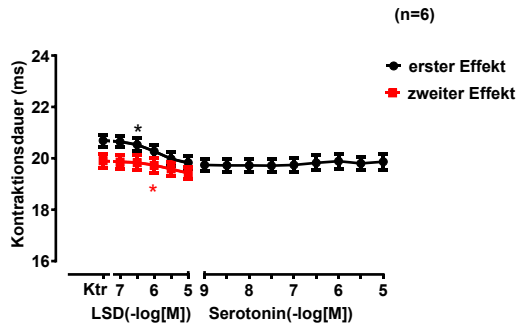


Abbildung 19: Effekt von LSD sowie nachfolgend zusätzlich gegebenem Serotonin auf die Dauer der Kontraktion von h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen linken Vorhofpräparaten der Maus. Der schwarze Graph stellt die gemessenen Werte unter initialer Gabe von LSD und nachfolgend zusätzlich gegebenem Serotonin (nach dem Skalenstrich) dar, der Rote die Werte unter anschließender erneuter Gabe von LSD nach zwischenzeitlichem Auswaschen aller zugegebenen Substanzen. Ktr=nach Einstellung des initialen Gleichgewichts gemessene Werte (schwarz), bzw. nach dem zwischenzeitlichen Auswaschen gemessener Wert (rot), Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von LSD sowie nachfolgend Serotonin, Ordinate: absoluter Wert der Dauer der Kontraktion in ms, mit SEM, n=Anzahl der Experimente, \*=erster signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle (p<0,05), #=erster signifikanter Unterschied gegenüber 10 µM LSD

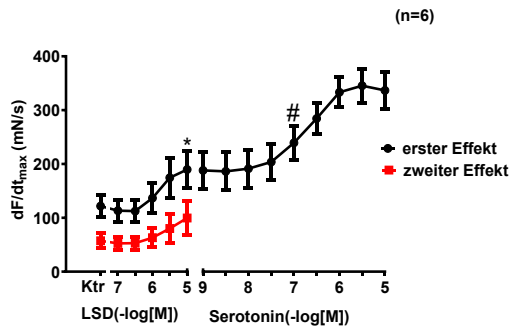


Abbildung 20: Effekt von LSD sowie nachfolgend zusätzlich gegebenem Serotonin auf die maximale Anstiegssteilheit der Kontraktionsentwicklung von h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen linken Vorhofpräparaten der Maus. Der schwarze Graph stellt die gemessenen Werte unter initialer Gabe von LSD und nachfolgend zusätzlich gegebenem Serotonin (nach dem Skalenstrich) dar, der Rote die Werte unter anschließender erneuter Gabe von LSD nach zwischenzeitlichem Auswaschen aller zugegebenen Substanzen. Ktr=nach Einstellung des initialen Gleichgewichts gemessene Werte (schwarz), bzw. nach dem zwischenzeitlichen Auswaschen gemessener Wert (rot), Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von LSD sowie nachfolgend Serotonin, Ordinate: absoluter Wert der maximalen Anstiegssteilheit der Kontraktionsentwicklung in mN/s jeweils mit SEM, n=Anzahl der Experimente, \*=erster signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle (p<0,05), #=erster signifikanter Unterschied gegenüber 10 µM LSD

Alle diese Effekte ließen sich bei der Wiederholung der Zugabe von LSD nach dem Auswaschen reproduzieren (vgl. jeweils rote Kurven der Diagramme), wobei jedoch die zuvor beschriebene Desensitivierung ebenfalls auftrat.

#### 4.2.5 H5-HT<sub>4</sub>-TRANSGENE RECHTE VORHOFPRÄPARATE

LSD verursachte an h5-HT<sub>4</sub>-transgenen rechten Vorhofpräparaten einen konzentrationsabhängigen positiv chronotropen Effekt, welcher durch zusätzlich hinzugegebenes Serotonin noch leicht zu steigern war, wie das Mechanogramm in Abbildung 21

exemplarisch zeigt. Die Daten aus allen Versuchen unter diesen Bedingungen wurden zusammengefasst und in Abbildung 22 dargestellt.

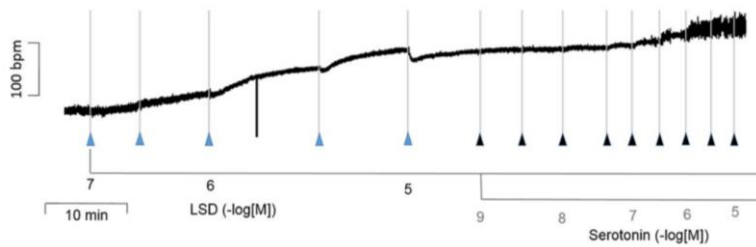


Abbildung 21: Mechanogramm (exemplarisch): Effekt von 0,1 bis 10  $\mu\text{M}$  LSD, sowie nachfolgend von zusätzlich gegebenen 1 nM bis 10  $\mu\text{M}$  Serotonin auf die Frequenz eines exemplarischen  $h5\text{-HT}_4$ -Rezeptor-transgenen rechten Vorhofpräparates der Maus. Waagrecht: Zeit, negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von LSD und nachfolgend Serotonin, senkrecht: Frequenz des Präparates

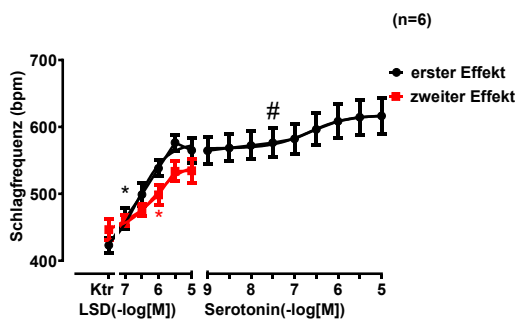


Abbildung 22: Effekt von LSD sowie nachfolgend zusätzlich gegebenem Serotonin auf die Frequenz von  $h5\text{-HT}_4$ -Rezeptor-transgenen rechten Vorhofpräparaten der Maus. Der schwarze Graph stellt die gemessenen Werte unter initialer Gabe von LSD und nachfolgend zusätzlich gegebenem Serotonin (nach dem Skalenstrich) dar, der rote die Werte unter anschließender erneuter Gabe von LSD nach zwischenzeitlichem Auswaschen aller zugegebenen Substanzen. Ktr=nach Einstellung des initialen Gleichgewichts gemessene Frequenz (schwarz), bzw. nach dem zwischenzeitlichen Auswaschen gemessener Wert (rot), Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von LSD sowie nachfolgend Serotonin, Ordinate: absoluter Wert der gemessenen Frequenz mit SEM in beats per minute, n=Anzahl der Experimente, \*=erster signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle ( $p < 0,05$ ), #=erster signifikanter Unterschied gegenüber 10  $\mu\text{M}$  LSD

10  $\mu\text{M}$  LSD führten im Mittel zu einer Steigerung der Frequenz  $h5\text{-HT}_4$ -Rezeptor-transgener rechter Mausvorhofpräparate von 423,17 bpm ( $\pm 27,95$  bpm) um 33,51% auf 565,00 bpm ( $\pm 46,48$  bpm). Zusätzlich gegebene 10  $\mu\text{M}$  Serotonin erhöhten dies weiter auf 615,50 bpm ( $\pm 65,48$  bpm), was einer Steigerung um 11,9% des Initialwertes entspricht.

Um die maximale Effektstärke von LSD zu quantifizieren, wurde aus diesen Daten der Effekt von LSD allein relativ zum Gesamteffekt von LSD und Serotonin als  $76.69\% \pm 6.65\%$  berechnet.

Dieser Effekt ließ sich bei der Wiederholung der Zugabe von LSD nach dem Auswaschen reproduzieren (vgl. rote Kurve in Abbildung 22).

#### 4.2.6 VERSUCHE MIT REZEPTORANTAGONISTEN

Um die Beteiligung des H<sub>2</sub>-Rezeptors und des 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptors an der Wirkung von LSD zu bestätigen, wurden die jeweiligen Antagonisten verwendet: 10 µM Cimetidin hoben die positiv inotrope (Abbildung 23) und chronotrope (Abbildung 24) Wirkung von zuvor appliziertem LSD an hH<sub>2</sub>-Rezeptor-transgenen Präparaten auf.

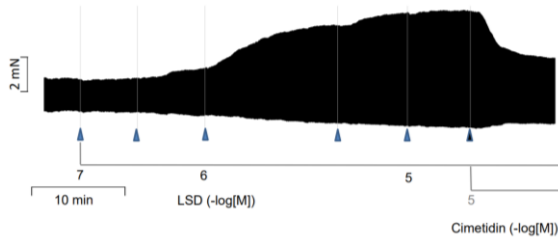


Abbildung 23: Mechanogramm: Effekt von 0,1 bis 10 µM LSD, sowie nachfolgend von zusätzlich gegebenen 10 µM Cimetidin auf die Kontraktionskraft eines hH<sub>2</sub>-Rezeptor-transgenen linken Vorhofpräparates einer Maus. Waagrecht: Zeit, negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von LSD und nachfolgend Cimetidin, senkrecht: Durch das Präparat entwickelte Kontraktionskraft

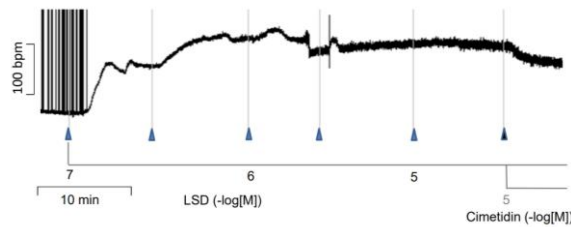


Abbildung 24: Mechanogramm: Effekt von 0,1 bis 10 µM LSD, sowie nachfolgend von zusätzlich gegebenen 10 µM Cimetidin auf die Frequenz eines hH<sub>2</sub>-Rezeptor-transgenen rechten Vorhofpräparates einer Maus. Waagrecht: Zeit, negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von LSD und nachfolgend Cimetidin, senkrecht: Durch das Präparat entwickelte Frequenz

10 µM Tropisetron hoben die positiv inotrope (Abbildung 25) und chronotrope (Abbildung 26) Wirkung von zuvor appliziertem LSD an h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen Präparaten auf.

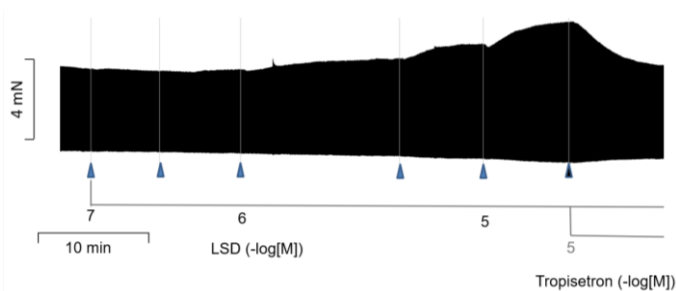


Abbildung 25: Mechanogramm: Effekt von 0,1 bis 10 µM LSD, sowie nachfolgend von zusätzlich gegebenen 10 µM Tropisetron auf die Kontraktionskraft eines h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen linken Vorhofpräparates einer Maus. Waagrecht: Zeit, negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von LSD und nachfolgend Tropisetron, senkrecht: Durch das Präparat entwickelte Kontraktionskraft

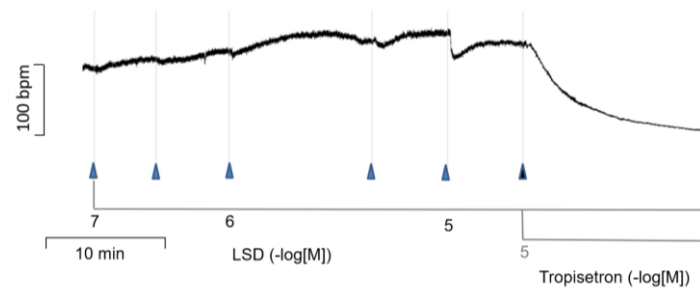


Abbildung 26: Mechanogramm: Effekt von 0,1 bis 10  $\mu\text{M}$  LSD, sowie nachfolgend von zusätzlich gegebenen 10  $\mu\text{M}$  Tropisetron auf die Frequenz eines h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen rechten Vorhofpräparates einer Maus. Waagrecht: Zeit, negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von LSD und nachfolgend Tropisetron, senkrecht: Durch das Präparat entwickelte Frequenz

#### 4.2.7 PROTEINPHOSPHORYLIERUNG IN MAUSPRÄPARATEN

An mittels Western Blot untersuchten Proben, die zuvor 10  $\mu\text{M}$  LSD ausgesetzt worden waren, konnte gezeigt werden, daß 10  $\mu\text{M}$  LSD die Menge von an Serin-16 phosphoryliertem Phospholamban in hH<sub>2</sub>-Rezeptor-transgenen und zu einem geringeren Grad auch an h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen Vorhofpräparaten, jedoch nicht in WT-Präparaten erhöhte, wie Abbildung 27 zeigt. Nachfolgend wurden die Quotienten aus PS16-PLB und CSQ bestimmt und vergleichend graphisch dargestellt (Abbildung 28).

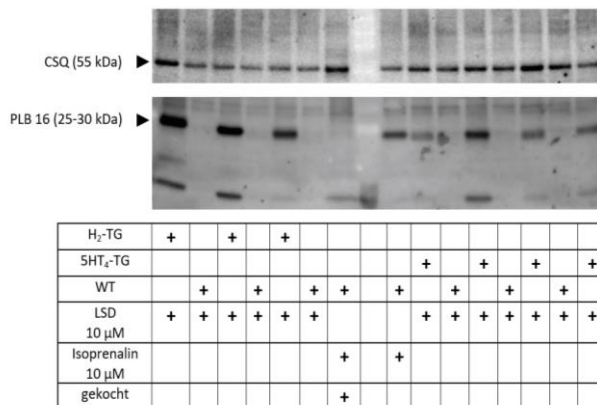


Abbildung 27: Aufnahme einer Nitrocellulosemembran: Die Banden von Calsequestrin (CSQ) sowie der pentameren Form von an Serin-16 phosphoryliertem Phospholamban (PS16-PLB) mit dem jeweiligen Molekulargewicht wurden mittels Chemilumineszenz dargestellt. Die Bedingungen, denen die Proben in den einzelnen Geltaschen ausgesetzt waren, sowie deren jeweilige Genotypen, sind der darunter befindlichen Tabelle zu entnehmen. Bezeichnung des Rainbow-Markers fehlt.



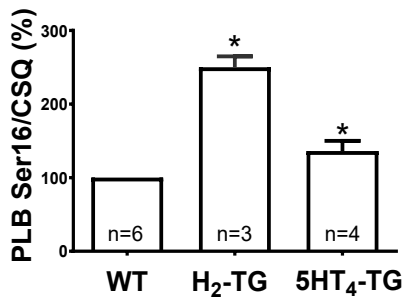


Abbildung 28: Graphische Darstellung der Quotienten der gemessenen Bandenintensitäten von PS16-PLB gegenüber CSQ für hH2- und h5-HT4-Rezeptor-transgene Präparate normiert auf den Quotienten von WT-Präparaten (WT = 100%). Abszisse: Genotyp, Ordinate: relative Werte der Quotienten aus PS16-PLB und CSQ, n=Anzahl der analysierten Proben, \*=p<0,05 gegenüber WT

#### 4.2.8 KONTRAKTIONSVERSUCHE MENSCHLICHER PRÄPARATE

LSD führte an isolierten Präparaten aus menschlichen rechten Vorhöfen zu keinem positiv inotropen Effekt, wie das Mechanogramm in Abbildung 29 beispielhaft zeigt. Die Daten aus allen Versuchen unter diesen Bedingungen wurden zusammengefasst und in Abbildung 30 dargestellt.

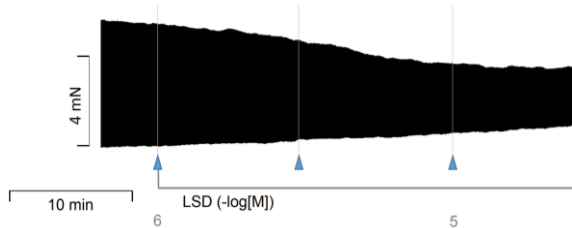


Abbildung 29: Mechanogramm: Effekt von 1 bis 10  $\mu\text{M}$  LSD auf die Kontraktionskraft eines menschlichen rechten Vorhofpräparates. Waagrecht: Zeit, negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von LSD, senkrecht: Durch das Präparat entwickelte Kontraktionskraft

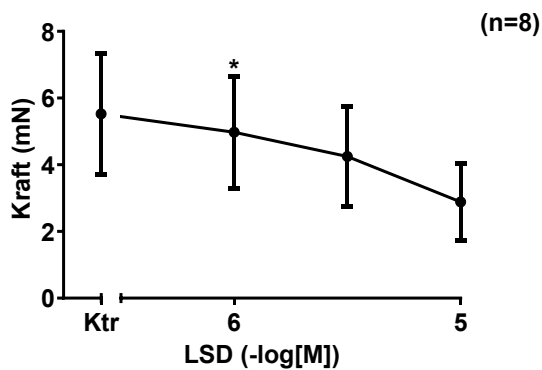


Abbildung 30: Effekt von LSD auf die Kontraktionskraft von menschlichen rechten Vorhofpräparaten. Ktr=nach Einstellung des initialen Gleichgewichts gemessene Kontraktionskraft (definiert als 100%), Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von LSD, Ordinate: relativer Wert der gemessenen Kontraktionskraft mit SEM in % der Ktr, n=Anzahl der Experimente, \*=erster signifikanter Unterschied gegenüber Ktr

Im Gegensatz zu den transgenen Mausvorhöfen hatte LSD am menschlichen Vorhof eher einen negativ inotropen Effekt. Es ist zu vermuten, daß dies auf einem antagonistischen Effekt von LSD an humanen  $\beta$ -Adrenozeptoren beruhen könnte und führten Versuche an menschlichen Präparaten durch, in denen zunächst 10 nM Isoprenalin als bekannter  $\beta$ -Agonist und anschließend zusätzlich LSD zugegeben wurde. Es zeigte sich nach einer initialen Kraftzunahme durch Isoprenalin ein deutlicher negativ inotroper Effekt durch zusätzlich gegebenes LSD, wie das Diagramm in Abbildung 31 zeigt.

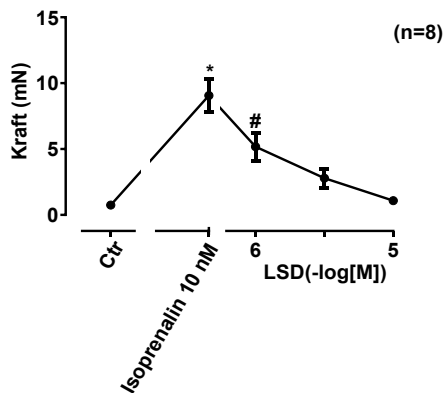


Abbildung 31: Effekt von 10 nM Isoprenalin und nachfolgend (nach dem Skalenstrich) zusätzlich gegebenen 1 bis 10  $\mu$ M LSD auf die absolute Kontraktionskraft menschlicher rechter Vorhofpräparate. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Isoprenalin und nachfolgend LSD, Ordinate: Wert der gemessenen Kontraktionskraft mit SEM in mN, n=Anzahl der Experimente, \*=erster signifikanter Unterschied gegenüber Ktr, #=erster signifikanter Unterschied gegenüber dem unter 10 nM Isoprenalin gemessenen Wert.

Erstaunlicherweise konnte jedoch eine einzelne Ausnahme beobachtet werden, in deren Fall 10  $\mu$ M LSD an einem menschlichen Präparat zu einem erkennbaren positiv inotropen Effekt führte, der sich jedoch nicht an anderen Präparaten reproduzieren ließ. Das entsprechende Mechanogramm ist in Abbildung 32 dargestellt.

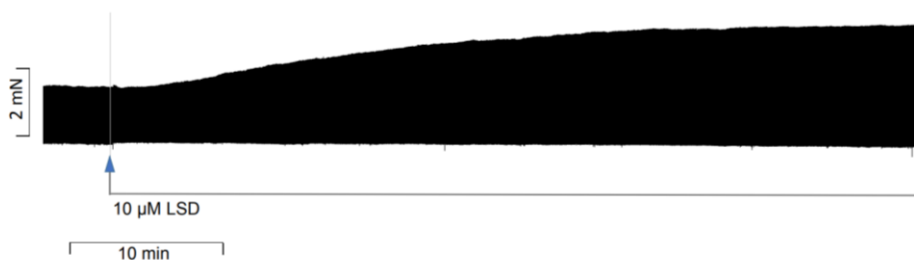


Abbildung 32: Mechanogramm: Effekt von 10  $\mu$ M LSD auf die Kontraktionskraft eines menschlichen rechten Vorhofpräparates. Waagrecht: Zeit, senkrecht: Durch das Präparat entwickelte Kontraktionskraft

Um weitere, möglicherweise durch den postulierten  $\beta$ -Antagonismus überlagerte Effekte von LSD auf menschliche Herzmuskelzellen zu untersuchen, wurden Versuche durchgeführt, in denen die Proben vor Zugabe von 10  $\mu$ M LSD mit 1  $\mu$ M Cilostamid, einem Hemmstoff der im

menschlichen Herzen vorkommenden Phosphodiesterase III (von der Leyen et al., 1991), behandelt wurden, um mögliche Wirkungen über die untersuchten h<sub>2</sub>-Rezeptoren bzw.- h<sub>5</sub>-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren nachgeschalteten Signalkaskaden mit einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels zu verstärken und somit sichtbar zu machen. Die dermaßen durchgeführten Experimente ließen neben dem positiv inotropen Effekt des Cilostamids einen darüberhinausgehenden zusätzlichen positiv inotropen Effekt von 10 µM LSD erkennen. Dieser Effekt war durch Zugabe von Antagonisten am h<sub>2</sub>- bzw.- h<sub>5</sub>-HT<sub>4</sub>-Rezeptor zumindest teilweise reversibel, was auf eine Wirkung von LSD an in menschlichen Kardiomyozyten vorkommenden Rezeptoren dieser Typen schließen lässt. Dafür wurden entweder 10 µM Cimetidin und 10 µM Tropisetron verwendet. Im Folgenden ist ein repräsentatives Mechanogramm (Abbildung 33) sowie die Zusammenfassung der erhobenen inotropen Effekte (Abbildung 34) dargestellt:

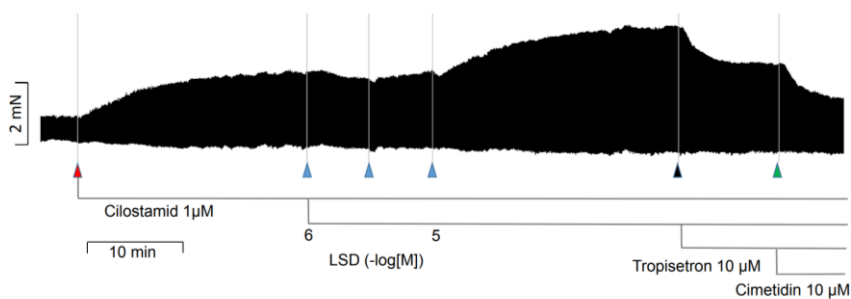
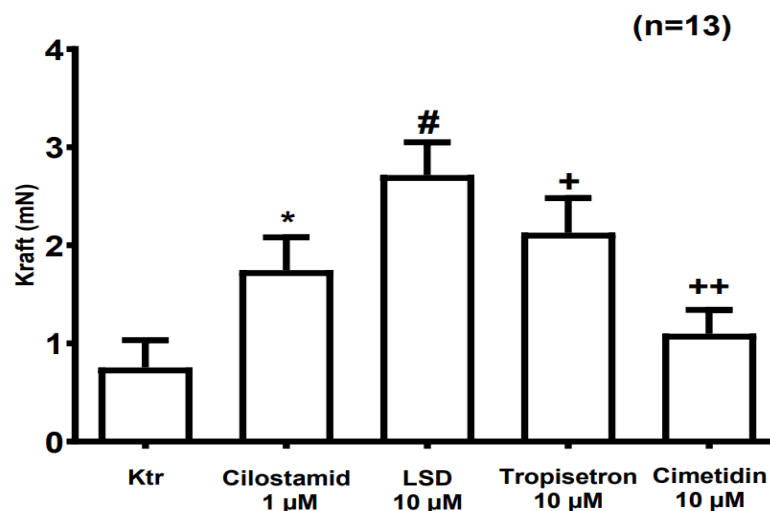


Abbildung 33: Mechanogramm: Effekt von 1 µM Cilostamid, sowie nachfolgend zusätzlich 10 µM LSD sowie 10 µM Cimetidin auf die Kontraktionskraft eines menschlichen rechten Vorhofpräparates. Waagrecht: Zeit, senkrecht: Durch das Präparat entwickelte Kontraktionskraft.



Cilostamide 1 µM		+	+	+	+
LSD 10 µM			+		+
Tropisetron 10 µM				+	+
Cimetidine 10 µM					+

Abbildung 34: Darstellung der Kontraktionskraft menschlicher rechter Vorhofpräparate in Anwesenheit von Cilostamid sowie zusätzlich 10 µM LSD, 10 µM Tropisetron bzw. 10 µM Cimetidin. Die zum jeweiligen Zeitpunkt zugegebenen Substanzen bzw. deren Kombination sind der Tabelle zu entnehmen. Ordinate: Kontraktionskraft in mN, n=Anzahl der Versuche, \*=signifikanter Unterschied gegenüber Kontrolle(p<0,05), #=signifikanter Unterschied gegenüber 1 µM Cilostamid(p<0,05), +=signifikanter Unterschied gegenüber 10 µM Tropisetron(p<0,05), ++=signifikanter Unterschied gegenüber 10 µM Tropisetron (p<0,05)

Eine vergleichbare Steigerung ließ sich auch für die maximale Rate der Kraftentwicklung (Abbildung 35) bzw. der Kraftabnahme (Abbildung 36) zeigen.

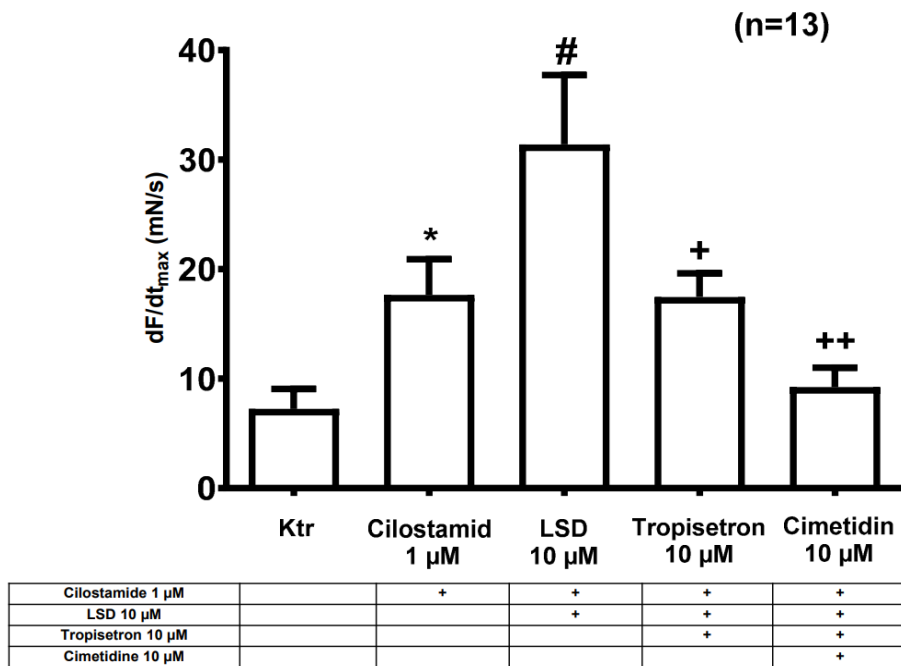


Abbildung 35: Darstellung der maximalen Anstiegssteilheit der Entwicklung der Kraft menschlicher rechter Vorhofpräparate in Anwesenheit von Cilostamid sowie zusätzlich 10 µM LSD, 10 µM Tropisetron bzw. 10 µM Cimetidin. Die zum jeweiligen Zeitpunkt zugegebenen Substanzen bzw. deren Kombination sind der Tabelle zu entnehmen. Ordinate: maximale Anstiegssteilheit der Entwicklung der Kraft mit SEM in mN/s, n=Anzahl der Versuche, \*=signifikanter Unterschied gegenüber Kontrolle(p<0,05), #=signifikanter Unterschied gegenüber 1 µM Cilostamid(p<0,05), +=signifikanter Unterschied gegenüber 10 µM Tropisetron(p<0,05), ++=signifikanter Unterschied gegenüber 10 µM Tropisetron (p<0,05)

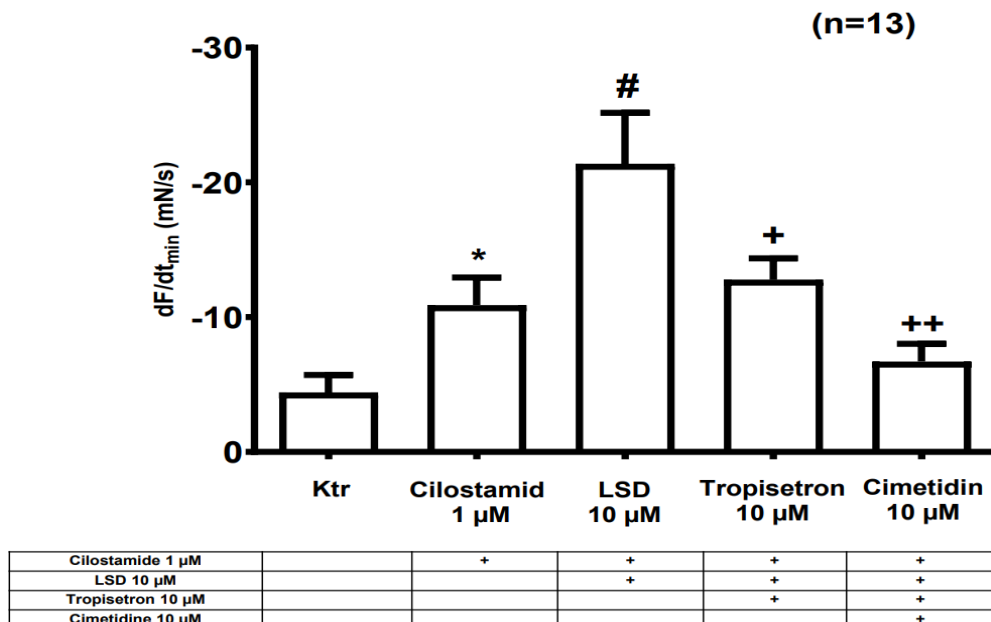


Abbildung 36: Darstellung der maximalen Anstiegssteilheit der Entwicklung der Relaxation menschlicher rechter Vorhofpräparate in Anwesenheit von Cilostamid sowie zusätzlich 10 µM LSD, 10 µM Tropisetron bzw. 10 µM Cimetidin. Die zum jeweiligen Zeitpunkt zugegebenen Substanzen bzw. deren Kombination sind der Tabelle zu entnehmen. Ordinate: maximale Anstiegssteilheit der Entwicklung der Relaxation mit SEM in mN/s, n=Anzahl der Versuche, \*=signifikanter Unterschied gegenüber Kontrolle(p<0,05),

#=signifikanter Unterschied gegenüber 1  $\mu\text{M}$  Cilostamid( $p<0,05$ ), +=signifikanter Unterschied gegenüber 10  $\mu\text{M}$  Tropicisetron( $p<0,05$ ), ++=signifikanter Unterschied gegenüber 10  $\mu\text{M}$  Tropicisetron ( $p<0,05$ )

Um auszuschließen, daß der negativ inotrope Effekt des Cimetidins auf einer möglichen Interaktion mit dem zuvor applizierten Cilostamid beruhen könnte, wurden Versuche mit ausschließlicher Zugabe von zunächst 1  $\mu\text{M}$  Cilostamid und anschließend zusätzlich 10  $\mu\text{M}$  Cimetidin (ohne Zugabe von LSD) durchgeführt: Hierbei ließ sich zwar der bereits bekannte positiv inotrope Effekt des Cilostamids, jedoch kein darüber hinausgehender Effekt von Cimetidin gegenüber dem zuvor gegebenen Cilostamid erkennen, wie das folgende Mechanogramm in Abbildung 37 zeigt. Die Daten aus allen Versuchen unter diesen Bedingungen wurden zusammengefasst und in Abbildung 38 dargestellt.



Abbildung 37 Mechanogramm: Effekt von 1  $\mu\text{M}$  Cilostamid sowie nachfolgend zusätzlich gegebenen 10  $\mu\text{M}$  Cimetidin auf die Kontraktionskraft menschlicher rechter Vorhofpräparate. Waagrecht: Zeit, senkrecht: Kontraktionskraft.

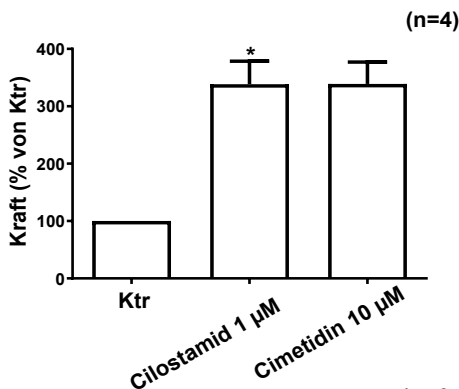


Abbildung 38: Darstellung der relativen Kontraktionskraft menschlicher rechter Vorhofpräparate vor und nach Gabe von 1  $\mu\text{M}$  Cilostamid sowie zusätzlich 10  $\mu\text{M}$  Cimetidin. Abszisse: Zugegebene Substanzen, Ordinate: Kontraktionskraft relativ zum initial gemessenen Wert mit SEM in % der Kontrolle, n=Anzahl der Versuche, \*=erster signifikanter Unterschied gegenüber Kontrolle

Somit erscheint eine Verzerrung der zuvor beschriebenen Ergebnisse durch eine Interaktion von Cilostamid und Cimetidin unwahrscheinlich.

### 4.3 Ergotamin

Es wurden Vorhofpräparate von hH<sub>2</sub>-transgenen Mäusen mit denen von WT-Mäusen verglichen. Dazu wurde kumulativ zunächst Ergotamin in die Organbäder gegeben, sodass die darin befindliche Konzentration von Ergotamin schrittweise (multipliziert jeweils um den Faktor drei) von 0,1 µM auf 10 µM anstieg. Im Anschluss wurde zusätzlich ebenfalls schrittweise Histamin hinzugegeben (Konzentration im Organbad von 1 nM bis 10 µM ansteigend). Dies geschah zeitgleich für jeweils ein WT und ein hH<sub>2</sub>-transgenes linkes und rechtes Vorhofpräparat, also jeweils vier Präparate. Da sich auch nach mehrfachem Spülen kein Rückgang der Kontraktionskraft auf das Niveau zu Beginn des Versuchs erreichen ließ, wurde Ergotamin als nicht vollständig auswaschbar betrachtet, sodass auf die Erhebung einer zweiten Konzentrations-Wirkungskurve (wie zuvor bei LSD beschrieben), verzichtet wurde (Abbildung 39). Um die Ergebnisse der Proteinanalyse nicht durch unvollständiges Auswaschen zu verfälschen wurden zur Gewinnung von Proben dafür zusätzliche Versuche an hH<sub>2</sub>- und h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen Vorhofpräparaten der Maus durchgeführt, in denen ausschließlich die initiale Zugabe von Ergotamin (also ohne zusätzliches Histamin oder Serotonin) und anschließend die sofortige Asservierung des Präparates in flüssigem Stickstoff erfolgte (Abbildung 40).

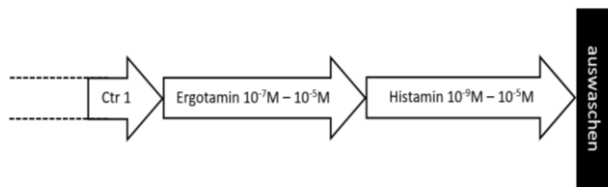


Abbildung 39: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs von H<sub>2</sub>-tg und WT rechten und linken Mausvorhöfen mit Zugabe von Ergotamin und Histamin

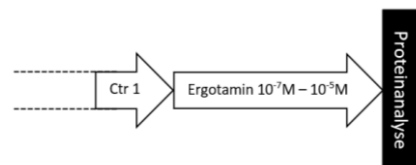


Abbildung 40: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs von H<sub>2</sub>-tg und WT rechten und linken Mausvorhöfen mit Zugabe von Ergotamin und Histamin

#### 4.3.1 WT LINKE VORHOFPRÄPARATE

Linke Vorhofpräparate von WT-Mäusen zeigten keinen positiv inotropen Effekt unter Zugabe von Ergotamin oder Histamin, wie das Mechanogramm in Abbildung 41 exemplarisch zeigt. Die Daten

aus allen Versuchen unter diesen Bedingungen wurden zusammengefasst und in Abbildung 42 dargestellt.

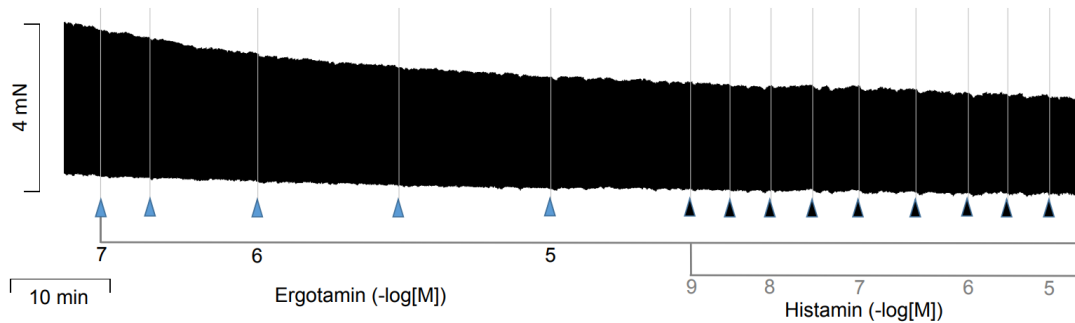


Abbildung 41: Repräsentatives Mechanogramm (exemplarisch): Effekt von 0,1 bis 10  $\mu$ M Ergotamin, sowie nachfolgend von zusätzlich gegebenen 1 nM bis 10  $\mu$ M Histamin auf die Kontraktionskraft eines exemplarischen WT linken Vorhofpräparates einer Maus. Waagerecht: Zeit, negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergotamin und nachfolgend Histamin, senkrecht: Durch das Präparat entwickelte Kontraktionskraft

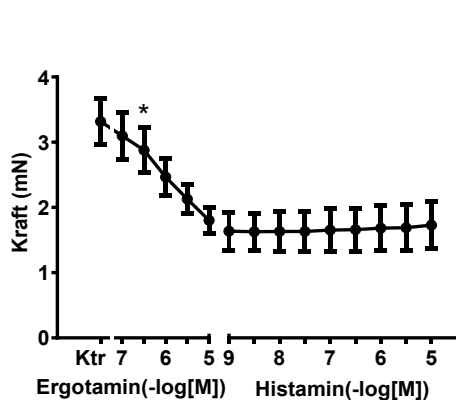


Abbildung 42: Effekt von Ergotamin sowie nachfolgend zusätzlich gegebenem Histamin auf die Kontraktionskraft von WT linken Vorhofpräparaten der Maus. Ktr=nach Einstellung des initialen Gleichgewichts gemessene Kontraktionskraft, Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergotamin sowie nachfolgend Histamin, Ordinate: absoluter Wert der gemessenen Kraftentwicklung mit SEM in mN, n=Anzahl der Experimente, \*=erster signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle (p<0,05)

#### 4.3.2 $H_2$ -TRANSGENE LINKE VORHOFPRÄPARATE

Ergotamin verursachte an  $H_2$ -transgenen linken Vorhofpräparaten einen konzentrationsabhängigen positiv inotropen Effekt, der durch zusätzliche Gabe von Histamin nicht weiter zu steigern war, wie das Mechanogramm in Abbildung 43 exemplarisch zeigt. Daten aus allen Versuchen unter diesen Bedingungen wurden zusammengefasst und in Abbildung 44 dargestellt.

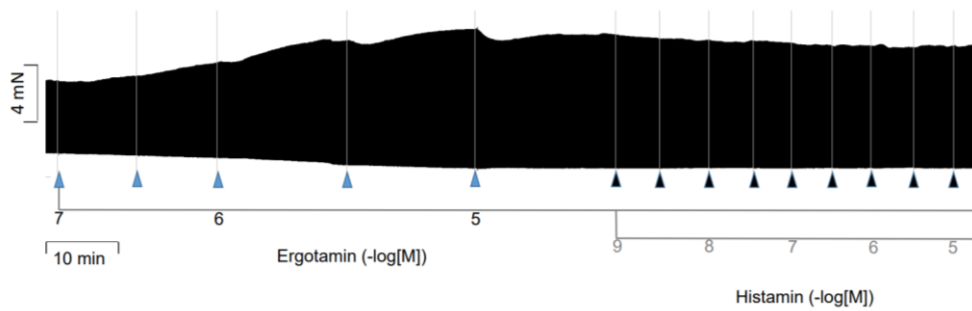


Abbildung 43: Repräsentatives Mechanogramm (exemplarisch): Effekt von 0,1 bis 10  $\mu\text{M}$  Ergotamin, sowie nachfolgend von zusätzlich gegebenen 1 nM bis 10  $\mu\text{M}$  Histamin auf die Kontraktionskraft eines exemplarischen  $\text{hH}_2$ -Rezeptor-transgenen linken Vorhofpräparates einer Maus. Waagrecht: Zeit, negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergotamin und nachfolgend Histamin, senkrecht: Durch das Präparat entwickelte Kontraktionskraft

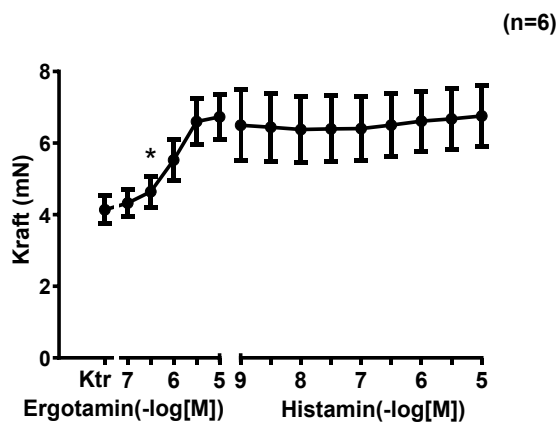


Abbildung 44: Effekt von Ergotamin sowie nachfolgend zusätzlich gegebenem Histamin auf die Kontraktionskraft von  $\text{hH}_2$ -Rezeptor-transgenen linken Vorhofpräparaten der Maus. Ktr=nach Einstellung des initialen Gleichgewichts gemessene Kontraktionskraft, Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergotamin sowie nachfolgend Histamin, Ordinate: absoluter Wert der gemessenen Kraftentwicklung mit SEM in mN, n=Anzahl der Experimente, \*=erster signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle ( $p < 0,05$ )

10  $\mu\text{M}$  Ergotamin führten im Mittel zu einem positiv inotropen Effekt von 4,04 mN ( $\pm 1,49$  mN) auf 6,51 mN ( $\pm 2,43$  mN), was einer Steigerung um +61,13% entspricht.

Weiterhin verkürzte Ergotamin an diesen Präparaten die Zeit bis zur maximalen Kontraktion (Abbildung 45) und steigerte den maximalen Anstieg der Kraftentwicklung (Abbildung 46), ohne daß zusätzlich hinzugegebenes Histamin diese Effekte weiter verstärken konnte. Zudem zeigte sich die Dauer der Relaxation verkürzt, sowie der maximale Anstieg der Relaxation gesteigert.



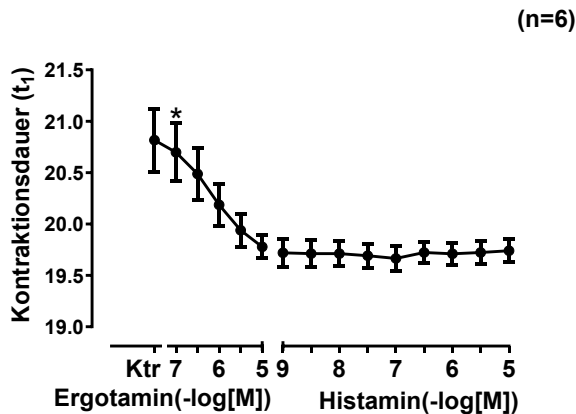


Abbildung 45: Effekt von Ergotamin sowie nachfolgend zusätzlich gegebenem Histamin auf die Dauer der Kontraktion von hH<sub>2</sub>-Rezeptor-transgenen linken Vorhofpräparaten der Maus. Ktr=nach Einstellung des initialen Gleichgewichts gemessene Werte. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergotamin sowie nachfolgend Histamin, Ordinate: absoluter Wert der Dauer der Kontraktion in ms, jeweils mit SEM, n=Anzahl der Experimente, \*=erster signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle (p<0,05)

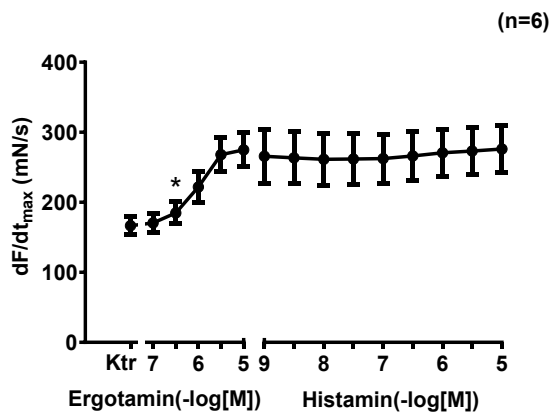


Abbildung 46: Effekt von Ergotamin sowie nachfolgend zusätzlich gegebenem Histamin auf die maximale Anstiegssteilheit der Kontraktionsentwicklung von hH<sub>2</sub>-Rezeptor-transgenen linken Vorhofpräparaten der Maus. Ktr=nach Einstellung des initialen Gleichgewichts gemessene Werte. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergotamin sowie nachfolgend Histamin, Ordinate: absoluter Wert der maximalen Anstiegssteilheit der Kontraktionsentwicklung in mN/s jeweils mit SEM, n=Anzahl der Experimente, \*=erster signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle (p<0,05)

#### 4.3.3 hH<sub>2</sub>-TRANSGENE RECHTE VORHOFPRÄPARATE

Ergotamin verursachte an hH<sub>2</sub>-transgenen rechten Vorhofpräparaten einen konzentrationsabhängigen positiv chronotropen Effekt, der durch zusätzliche Gabe von Histamin nicht weiter zu steigern war, wie das Mechanogramm in Abbildung 47 exemplarisch zeigt. Daten aus allen Versuchen unter diesen Bedingungen wurden zusammengefasst und in Abbildung 48 dargestellt.

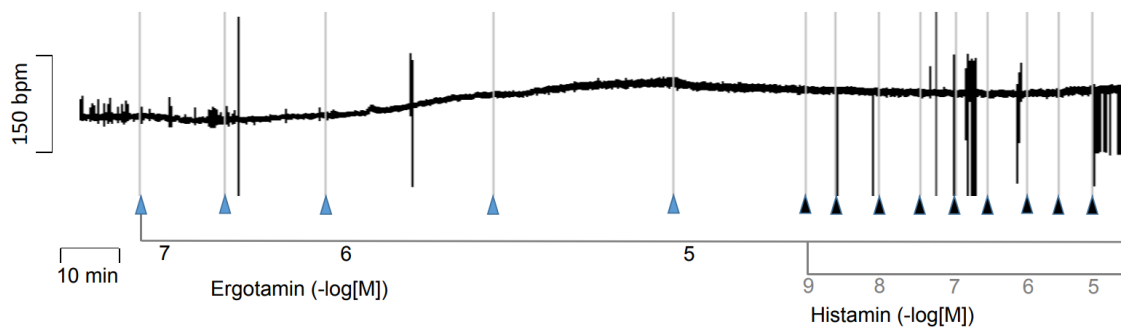


Abbildung 47: Mechanogramm (exemplarisch): Effekt von 0,1 bis 10  $\mu\text{M}$  Ergotamin, sowie nachfolgend von zusätzlich gegebenen 1 nM bis 10  $\mu\text{M}$  Histamin auf die Frequenz eines exemplarischen  $\text{hH}_2$ -Rezeptor-transgenen rechten Vorhofpräparates einer Maus. Waagerecht: Zeit, negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergotamin und nachfolgend Histamin, senkrecht: Frequenz des spontan schlagenden Präparates

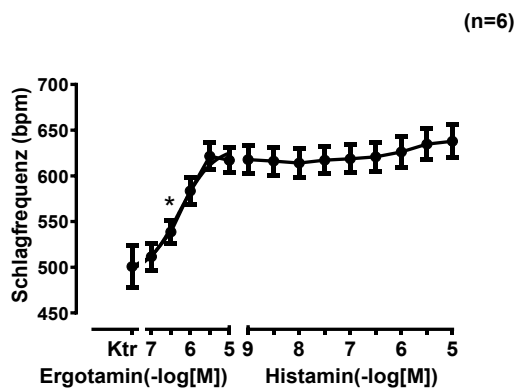


Abbildung 48: Effekt von Ergotamin sowie nachfolgend zusätzlich gegebenem Histamin auf die Frequenz von  $\text{hH}_2$ -Rezeptor-transgenen rechten Vorhofpräparaten der Maus. Ktr=nach Einstellung des initialen Gleichgewichts gemessene Frequenz. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergotamin sowie nachfolgend Histamin, Ordinate: absoluter Wert der gemessenen Frequenz mit SEM in beats per minute, n=Anzahl der Experimente, \*=erster signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle ( $p < 0,05$ )

Ergotamin in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  führte im Mittel zu einer Steigerung der Frequenz von 520,57 bpm ( $\pm 67,23$  bpm) auf 615,86 bpm ( $\pm 36,92$  bpm), was einer Steigerung um 18,25% entspricht.

#### 4.3.4 $\text{h5-HT}_4$ -TRANSGENE LINKE VORHOFPRÄPARATE

Es wurden Vorhofpräparate von  $\text{h5-HT}_4$ -transgenen Mäusen mit denen von WT-Mäusen verglichen. Dazu wurde kumulativ zunächst Ergotamin in die Organbäder gegeben, sodass die darin befindliche Konzentration von Ergotamin schrittweise (multipliziert jeweils um den Faktor drei) von 0,1  $\mu\text{M}$  auf 10  $\mu\text{M}$  anstieg. Im Anschluss wurde zusätzlich ebenfalls schrittweise Serotonin hinzugegeben (Konzentration im Organbad von 1 nM bis 10  $\mu\text{M}$  ansteigend). Dies geschah zeitgleich für jeweils ein WT und ein  $\text{h5-HT}_4$ -transgenes linkes und rechtes Vorhofpräparat, also jeweils vier Präparate. Da sich auch nach mehrfachem Spülen kein

Rückgang der Kontraktionskraft auf das Niveau zu Beginn des Versuchs erreichen ließ, wurde Ergotamin als nicht vollständig auswaschbar betrachtet, sodass auf die Erhebung einer zweiten Konzentrations-Wirkungskurve (wie zuvor bei LSD beschrieben), verzichtet wurde (vergleiche Abbildung 39).

Ergotamin verursachte an h5-Ht<sub>4</sub>-transgenen linken Vorhofpräparaten einen konzentrationsabhängigen positiv inotropen Effekt, der durch zusätzliche Gabe von Serotonin weiter zu steigern war, wie das Mechanogramm in Abbildung 49 exemplarisch zeigt. Daten aus allen Versuchen unter diesen Bedingungen wurden zusammengefasst und in Abbildung 50 dargestellt.

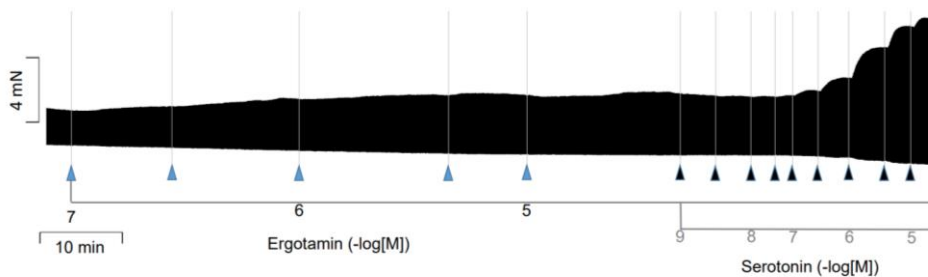


Abbildung 49: Mechanogramm (exemplarisch): Effekt von 0,1 bis 10  $\mu$ M Ergotamin, sowie nachfolgend von zusätzlich gegebenen 1 nM bis 10  $\mu$ M Serotonin auf die Kontraktionskraft eines exemplarischen h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen linken Vorhofpräparates einer Maus. Waagrecht: Zeit, negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergotamin und nachfolgend Serotonin, senkrecht: Durch das Präparat entwickelte Kontraktionskraft

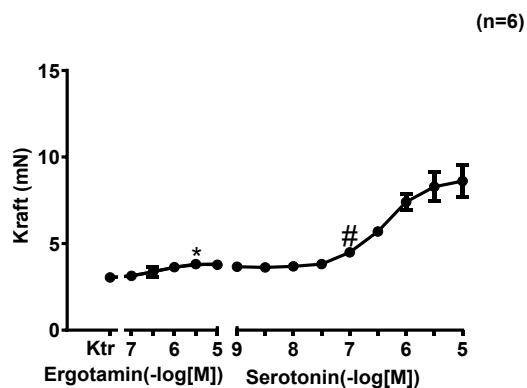


Abbildung 50: Effekt von Ergotamin sowie nachfolgend zusätzlich gegebenem Serotonin auf die Kontraktionskraft von h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen linken Vorhofpräparaten der Maus. Ktr=nach Einstellung des initialen Gleichgewichts gemessene Kontraktionskraft. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergotamin sowie nachfolgend Serotonin, Ordinate: absoluter Wert der gemessenen Kraftentwicklung mit SEM in mN, n=Anzahl der Experimente, \*=erster signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle ( $p < 0,05$ ), #=erster signifikanter Unterschied gegenüber 10  $\mu$ M Ergotamin

Ergotamin (10  $\mu$ M) steigerte die Kontraktionskraft von 3,05 mN ( $\pm 0,46$  mN) auf 3,78 mN ( $\pm 0,53$  mN), was einer Steigerung 23,93% entspricht. 10  $\mu$ M Serotonin konnten dies weiter auf 8,61 mN ( $\pm 2,10$  mN) steigern, was einer zusätzlichen Steigerung um 158,4% des Initialwertes entspricht.

Um die maximale Effektstärke von Ergotamin zu quantifizieren, wurde aus diesen Daten der Effekt von Ergotamin allein relativ zum Gesamteffekt von Ergotamin und Serotonin als 11,67% ( $\pm 8,41\%$ ) berechnet.

Weiterhin verkürzte Ergotamin an diesen Präparaten die Zeit bis zur maximalen Kontraktion (Abbildung 51) und steigerte den maximalen Anstieg der Kraftentwicklung (Abbildung 52). Zudem zeigte sich die Dauer der Relaxation verkürzt, sowie der maximale Anstieg der Relaxation gesteigert.

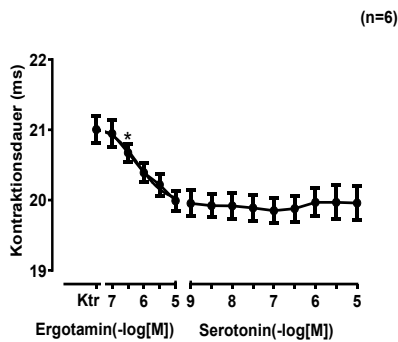


Abbildung 51: Effekt von Ergotamin sowie nachfolgend zusätzlich gegebenem Serotonin auf die Dauer der Kontraktion von h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen linken Vorhofpräparaten der Maus. Ktr=nach Einstellung des initialen Gleichgewichts gemessene Werte. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergotamin sowie nachfolgend Serotonin, Ordinate: absoluter Wert der Dauer der Kontraktion in ms, jeweils mit SEM, n=Anzahl der Experimente, \*=erster signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle ( $p < 0,05$ ), #=erster signifikanter Unterschied gegenüber 10  $\mu$ M Ergotamin

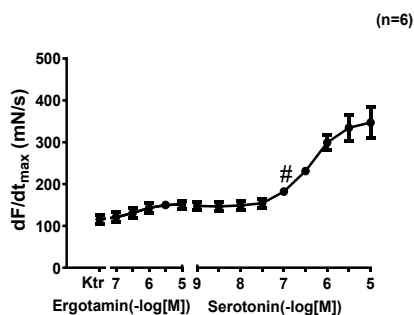


Abbildung 52: Effekt von Ergotamin sowie nachfolgend zusätzlich gegebenem Serotonin auf die maximale Anstiegssteilheit der Kontraktionsentwicklung von h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen linken Vorhofpräparaten der Maus. Ktr=nach Einstellung des initialen Gleichgewichts gemessene Werte. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergotamin sowie nachfolgend Serotonin, Ordinate: absoluter Wert der maximalen Anstiegssteilheit der Kontraktionsentwicklung in mN/s jeweils mit SEM, n=Anzahl der Experimente, \*=erster signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle ( $p < 0,05$ ), #=erster signifikanter Unterschied gegenüber 10  $\mu$ M Ergotamin

#### 4.3.5 h5-HT<sub>4</sub>-TRANSGENE RECHTE VORHOFPRÄPARATE

Ergotamin verursacht hat h5-HT<sub>4</sub>-transgenen rechten Vorhofpräparaten einen konzentrationsabhängigen positiv chronotropen Effekt, welcher durch zusätzlich hinzugegebenes Serotonin noch zu steigern war, wie das Mechanogramm in Abbildung 53 exemplarisch zeigt. Daten aus allen Versuchen unter diesen Bedingungen wurden zusammengefasst und in Abbildung 54 dargestellt.

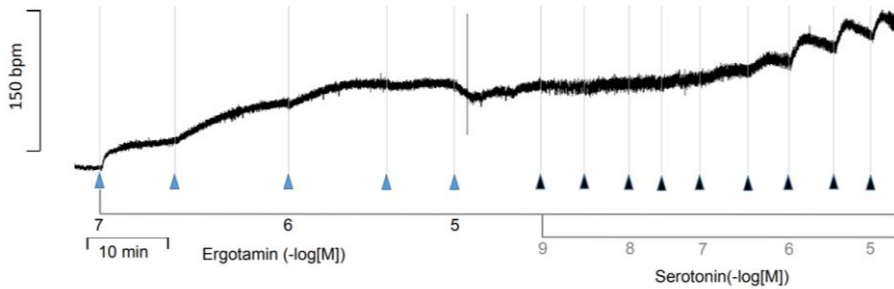


Abbildung 53: Mechanogramm (exemplarisch): Effekt von 0,1 bis 10  $\mu$ M Ergotamin, sowie nachfolgend von zusätzlich gegebenen 1 nM bis 10  $\mu$ M Serotonin auf die Frequenz eines exemplarischen h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen rechten Vorhofpräparates einer Maus. Waagerecht: Zeit, negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergotamin und nachfolgend Serotonin, senkrecht: Frequenz des Präparates

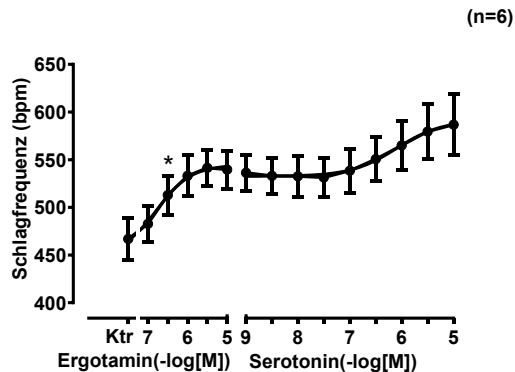


Abbildung 54: Effekt von Ergotamin sowie nachfolgend zusätzlich gegebenem Serotonin auf die Frequenz von h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen rechten Vorhofpräparaten der Maus. Ktr=nach Einstellung des initialen Gleichgewichts gemessene Frequenz. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergotamin sowie nachfolgend Serotonin, Ordinate: absoluter Wert der gemessenen Frequenz mit SEM in beats per minute, n=Anzahl der Experimente, \*=erster signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle (p < 0,05)

10  $\mu$ M Ergotamin führten im Mittel zu einer Steigerung der Frequenz h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgener rechter Mausvorhofpräparate von 466,90 bpm ( $\pm$ 53,41 bpm) um 15,60% auf 539,69 bpm ( $\pm$ 48,75 bpm). Zusätzlich gegebene 10  $\mu$ M Serotonin erhöht dies weiter auf 586,78 bpm ( $\pm$ 77,52 bpm), was einer weiteren Steigerung um 10,10% des initialwertes entspricht.

Um die maximale Effektstärke von Ergotamin zu quantifizieren, wurde aus diesen Daten der Effekt von Ergotamin allein relativ zum Gesamteffekt von Ergotamin und Serotonin als 58,42% ( $\pm$  20,28%) berechnet.

#### 4.3.6 VERSUCHE MIT REZEPTORANTAGONISTEN

Um die Beteiligung des  $H_2$ -Rezeptors und des  $5-HT_4$ -Rezeptors an der Wirkung von Ergotamin zu bestätigen, wurden die jeweiligen Antagonisten verwendet: 10  $\mu$ M Cimetidin hoben die positiv inotrope (Abbildung 55) und chronotrope (Abbildung 56) Wirkung von zuvor appliziertem Ergotamin an  $hH_2$ -Rezeptor-transgenen Präparaten auf.

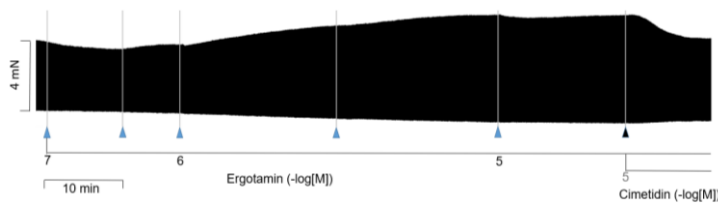


Abbildung 55: Mechanogramm: Effekt von 0,1 bis 10  $\mu$ M Ergotamin, sowie nachfolgend von zusätzlich gegebenen 10  $\mu$ M Cimetidin auf die Kontraktionskraft eines  $hH_2$ -Rezeptor-transgenen linken Vorhofpräparates einer Maus. Waagrecht: Zeit, negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergotamin und nachfolgend Cimetidin, senkrecht: Durch das Präparat entwickelte Kontraktionskraft

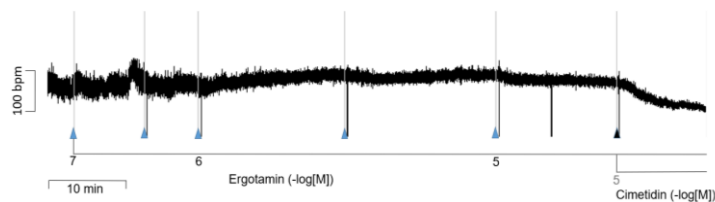


Abbildung 56: Mechanogramm: Effekt von 0,1 bis 10  $\mu$ M Ergotamin, sowie nachfolgend von zusätzlich gegebenen 10  $\mu$ M Cimetidin auf die Frequenz eines  $hH_2$ -Rezeptor-transgenen rechten Vorhofpräparates einer Maus. Waagrecht: Zeit, negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergotamin und nachfolgend Cimetidin, senkrecht: Durch das Präparat entwickelte Frequenz

10  $\mu$ M Tropisetron hoben die positiv inotrope (Abbildung 57) und chronotrope (Abbildung 58) Wirkung von zuvor appliziertem Ergotamin an  $h5-HT_4$ -Rezeptor-transgenen Präparaten auf.

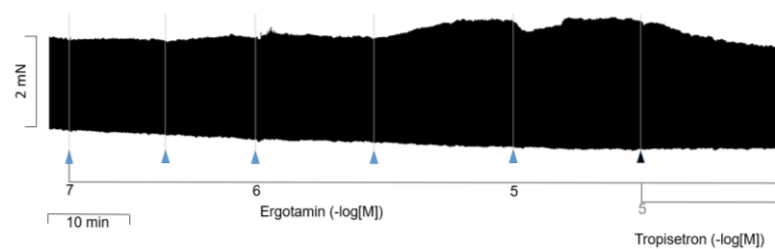


Abbildung 57: Mechanogramm: Effekt von 0,1 bis 10  $\mu\text{M}$  Ergotamin, sowie nachfolgend von zusätzlich gegebenen 10  $\mu\text{M}$  Tropisetron auf die Kontraktionskraft eines h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen linken Vorhofpräparates einer Maus. Waagerecht: Zeit, negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergotamin und nachfolgend Tropisetron, senkrecht: Durch das Präparat entwickelte Kontraktionskraft

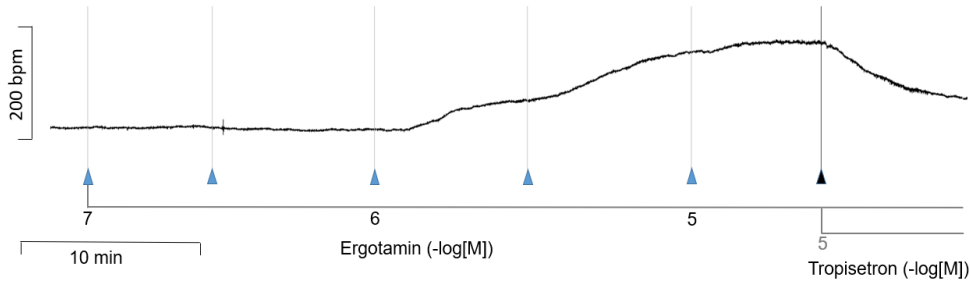
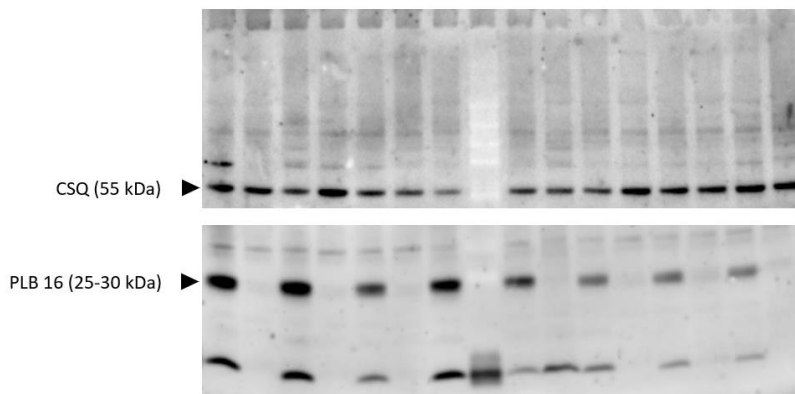


Abbildung 58: Mechanogramm: Effekt von 0,1 bis 10  $\mu\text{M}$  Ergotamin, sowie nachfolgend von zusätzlich gegebenen 10  $\mu\text{M}$  Tropisetron auf die Frequenz eines h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen rechten Vorhofpräparates einer Maus. Waagerecht: Zeit, negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergotamin und nachfolgend Tropisetron, senkrecht: Durch das Präparat entwickelte Frequenz

#### 4.3.7 PROTEINPHOSPHORYLIERUNG IN MAUSPRÄPARATEN

An mittels Western Blot untersuchten Proben, die zuvor 10  $\mu\text{M}$  Ergotamin ausgesetzt worden waren, konnte gezeigt werden, daß 10  $\mu\text{M}$  Ergotamin die Menge von an Serin-16 phosphoryliertem Phospholamban in hH<sub>2</sub>-Rezeptor-transgenen und zu einem geringeren Grad auch an h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen Vorhofpräparaten, jedoch nicht in WT-Präparaten erhöhte, wie Abbildung 59 zeigt:



H <sub>2</sub> -TG	+		+		+		+								
5HT <sub>4</sub> -TG										+		+			+
WT		+		+		+			+	+		+		+	+
Ergotamin 10 $\mu\text{M}$	+	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+
Isoprenalin 10 $\mu\text{M}$									+	+					
gekocht										+					

Abbildung 59: Aufnahme einer Nitrocellulosemembran: Die Banden von Calsequestrin (CSQ) sowie der pentameren Form von PLB16 mit dem jeweiligen Molekulargewicht wurden mittels Chemilumineszenz dargestellt. Die Bedingungen, denen die Proben in den einzelnen Geltaschen ausgesetzt waren, sowie deren jeweilige Genotypen, sind der darunter befindlichen Tabelle zu entnehmen.

#### 4.3.8 KONTRAKTIONSVERSUCHE MENSCHLICHER PRÄPARATE

Vergleichbar zu LSD, führte Ergotamin allein nicht zu einem positiv inotropen Effekt an menschlichen rechten Vorhofpräparaten, wie das Mechanogramm in Abbildung 60 beispielhaft zeigt:

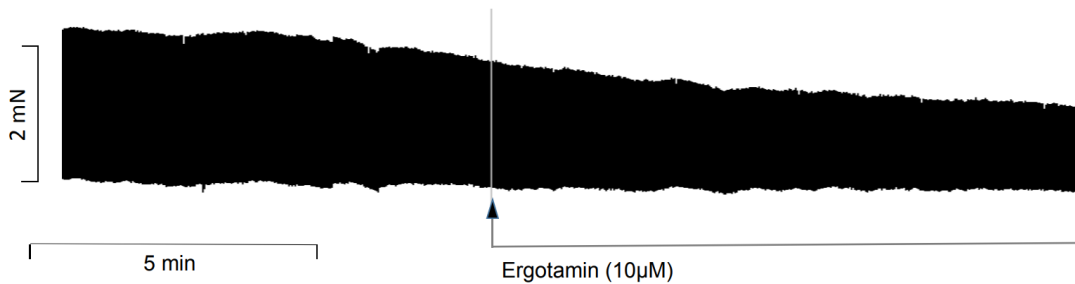


Abbildung 60: Mechanogramm: Effekt von 10 µM Ergotamin auf die Kontraktionskraft menschlichen rechten Vorhofpräparates. Waagerecht: Zeit, Zugabe von 10 µM Ergotamin, senkrecht: Durch das Präparat entwickelte Kontraktionskraft.

Tatsächlich ließ sich sogar ein negativ inotroper Effekt von Ergometrin erkennen. Analog zu LSD erwägten wir die Hypothese, daß Ergometrin antagonistisch am menschlichen  $\beta$ -Adrenozeptor wirken könnte. Dazu wurden Versuche an menschlichen rechten Vorhofpräparaten durchgeführt, in denen nach vorheriger Gabe von 10 nM des  $\beta$ -Adrenozeptoragonisten Isoprenalin zunächst Ergotamin und anschließend zusätzlich noch Ergometrin jeweils bis zu einer Maximalkonzentration von 10 µM hinzugegeben wurden. Ein beispielhaftes Mechanogramm ist in Abbildung 61 dargestellt.

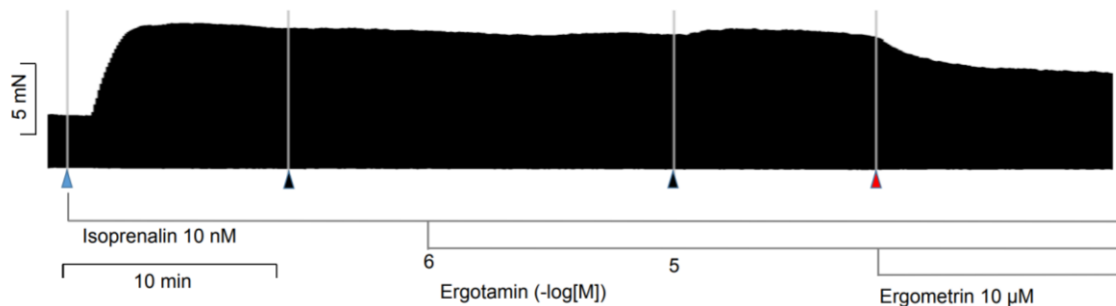


Abbildung 61: Mechanogramm: Effekt von 10 nM Isoprenalin sowie nachfolgend zusätzlich gegebenen 10 µM Ergotamin und 10 µM Ergometrin auf die Kontraktionskraft menschlichen rechten Vorhofpräparates. Waagerecht: Zeit, Zugabe von Isoprenalin, Ergotamin und Ergometrin, senkrecht: Durch das Präparat entwickelte Kontraktionskraft.

10 nM Isoprenalin bewirkten einen positiv inotropen Effekt. Anders als LSD und Ergometrin führten 10 µM Ergotamin jedoch nicht zu einer Umkehr dieses Effektes. Die Daten aus allen



Versuchen unter diesen Bedingungen wurden in zusammengefasst und in Abbildung 62 dargestellt.

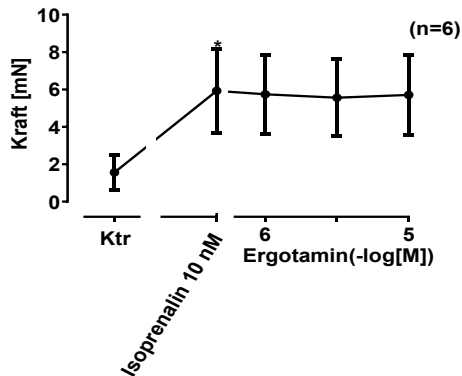


Abbildung 62: Effekt von Isoprenalin sowie nachfolgend zusätzlich gegebenem Ergotamin auf die Kraft von menschlichen rechten Vorhofpräparaten. Ktr=nach Einstellung des initialen Gleichgewichts gemessene Kraft. Abszisse: Zugabe von Isoprenalin und negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergometrin, Ordinate: absoluter Wert der gemessenen Kraft mit SEM in mN, n=Anzahl der Experimente, \*=erster signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle ( $p < 0,05$ )

Es wurden weiterhin 10  $\mu\text{M}$  Ergometrin hinzugegeben, dadurch ließ sich der positiv inotrope Effekt von Isoprenalin umkehren. Die Wirkung von Isoprenalin war also durch Ergometrin, nicht aber durch Ergotamin reversibel (Abbildung 61).

Analog zu den mit LSD an menschlichen rechten Vorhofpräparaten durchgeführten Versuchen wurde bei den Versuchen mit Ergotamin eine Vorbehandlung mit 1  $\mu\text{M}$  des Phosphodiesteraseinhibitors Cilostamid durchgeführt. Es ließ sich neben dem positiv inotropen Effekt des Cilostamids ein darüberhinausgehender positiv inotroper Effekt zusätzlich applizierten Ergotamins (10 $\mu\text{M}$ ) erkennen, welcher sich als nicht durch 10  $\mu\text{M}$  Tropisetron, jedoch durch 10  $\mu\text{M}$  Cimetidin reversibel präsentierte, wie das Mechanogramm in Abbildung 63 zeigt. Die Daten aus allen Versuchen unter diesen Bedingungen wurden zusammengefasst und in Abbildung 64 dargestellt.

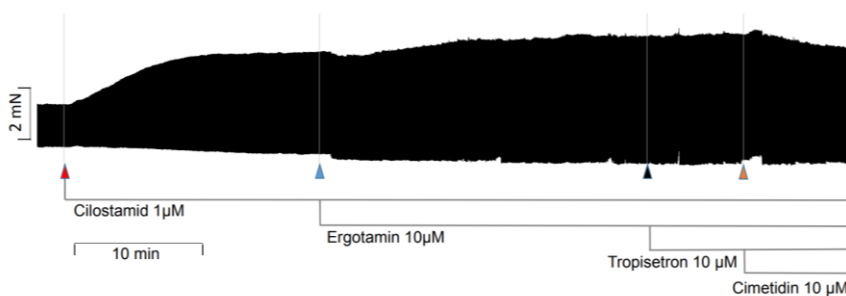


Abbildung 63: Mechanogramm: Effekt von 1  $\mu\text{M}$  Cilostamid, sowie nachfolgend zusätzlich 10  $\mu\text{M}$  Ergotamin sowie 10  $\mu\text{M}$  Tropisetron und 10  $\mu\text{M}$  Cimetidin auf die Kontraktionskraft eines menschlichen rechten Vorhofpräparates. Waagrecht: Zeit, senkrecht: Durch das Präparat entwickelte Kontraktionskraft.

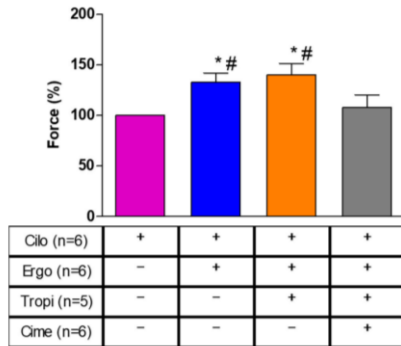


Abbildung 64: Darstellung der relativen Kontraktionskraft menschlicher rechter Vorhofpräparate in Anwesenheit von Cilostamid sowie zusätzlich 10  $\mu\text{M}$  Ergotamin, 10  $\mu\text{M}$  Tropisetron bzw. 10  $\mu\text{M}$  Cimetidin. Die zum jeweiligen Zeitpunkt zugegebenen Substanzen bzw. deren Kombination sind der Tabelle zu entnehmen. Ordinate: Kontraktionskraft in % der Kontrolle, n=Anzahl der Versuche, \*=signifikanter Unterschied gegenüber Kontrolle( $p < 0,05$ ), #=signifikanter Unterschied gegenüber 1  $\mu\text{M}$  Cilostamid( $p < 0,05$ )

#### 4.4 Ergometrin

Es wurden Vorhofpräparate von  $\text{hH}_2$ -transgenen Mäusen mit denen von WT-Mäusen verglichen. Dazu wurde kumulativ zunächst Ergometrin in die Organbäder gegeben, sodass die darin befindliche Konzentration von Ergometrin schrittweise (multipliziert jeweils um den Faktor drei) von 0,1  $\mu\text{M}$  auf 10  $\mu\text{M}$  anstieg. Im Anschluss wurde zusätzlich ebenfalls schrittweise Histamin hinzugegeben (Konzentration im Organbad von 1 nM bis 10  $\mu\text{M}$  ansteigend). Anschließend wurden gemäß des Versuchsprotokolls beide Substanzen vollständig ausgewaschen und erneut Ergometrin nach demselben Schema hinzugegeben, bevor die Proben für die molekularbiologische Analyse tiefgefroren wurden (Abbildung 65). Dies geschah zeitgleich für jeweils ein WT und ein  $\text{hH}_2$ -transgenes linkes und rechtes Vorhofpräparat, also jeweils vier Präparate.

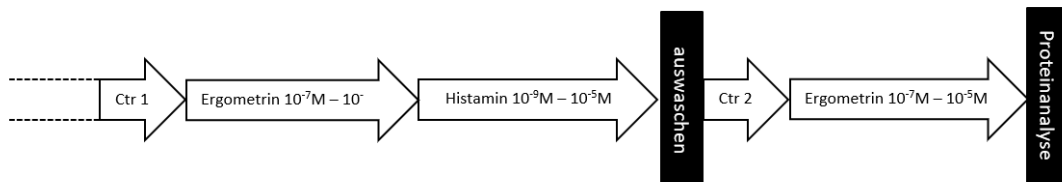


Abbildung 65: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs von  $\text{H}_2$ -tg und WT rechten und linken Mausvorhöfen mit Zugabe von Ergometrin und Histamin

#### 4.4.1 WT LINKE VORHOFPRÄPARATE

Linke Vorhofpräparate von WT-Mäusen zeigten keinen positiv inotropen Effekt unter Zugabe von Ergometrin oder Histamin, wie das Mechanogramm in Abbildung 66 exemplarisch zeigt. Daten aus allen Versuchen unter diesen Bedingungen wurden zusammengefasst und in Abbildung 67 dargestellt.

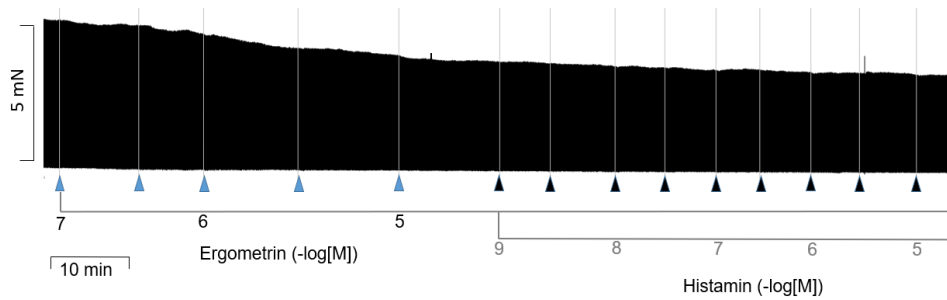


Abbildung 66: Mechanogramm (exemplarisch): Effekt von 0,1 bis 10  $\mu\text{M}$  Ergometrin, sowie nachfolgend von zusätzlich gegebenen 1 nM bis 10  $\mu\text{M}$  Histamin auf die Kontraktionskraft eines exemplarischen WT linken Vorhofpräparates einer Maus. Waagerecht: Zeit, negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergometrin und nachfolgend Histamin, senkrecht: Durch das Präparat entwickelte Kontraktionskraft

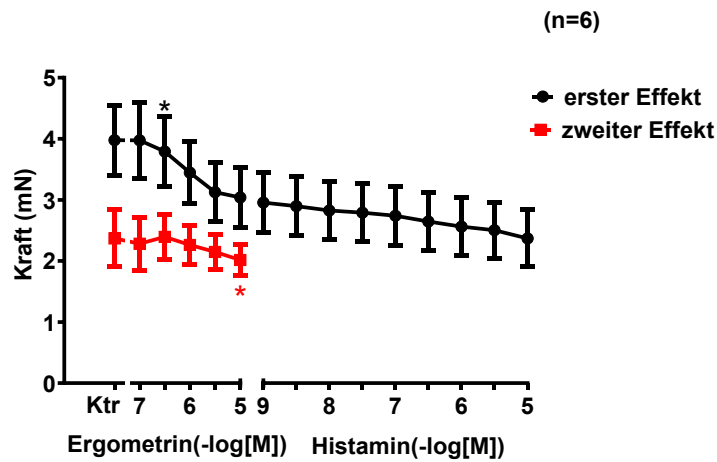


Abbildung 67: Effekt von Ergometrin sowie nachfolgend zusätzlich gegebenem Histamin auf die Kontraktionskraft von WT linken Vorhofpräparaten der Maus. Der schwarze Graph stellt die gemessenen Werte unter initialer Gabe von Ergometrin und nachfolgend zusätzlich gegebenem Histamin (nach dem Skalenstrich) dar, der rote die Werte unter anschließender erneuter Gabe von Ergometrin nach zwischenzeitlichem Auswaschen aller zugegebenen Substanzen. Ktr=nach Einstellung des initialen Gleichgewichts gemessene Kontraktionskraft (schwarz), bzw. nach dem zwischenzeitlichen Auswaschen gemessener Wert (rot), Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergometrin sowie nachfolgend Histamin, Ordinate: absoluter Wert der gemessenen Kraftentwicklung mit SEM in mN, n=Anzahl der Experimente, \*=erster signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle ( $p < 0,05$ ), #=erster signifikanter Unterschied gegenüber 10  $\mu\text{M}$  Ergometrin

#### 4.4.2 $H_2$ -TRANSGENE LINKE VORHOFPRÄPARATE

Ergometrin verursachte an  $H_2$ -transgenen linken Vorhofpräparaten einen konzentrationsabhängigen positiv inotropen Effekt, der durch zusätzliche Gabe von Histamin nicht weiter zu steigern war, wie das Mechanogramm in Abbildung 68 exemplarisch zeigt. Daten aus allen Versuchen unter diesen Bedingungen wurden zusammengefasst und in Abbildung 69 dargestellt.

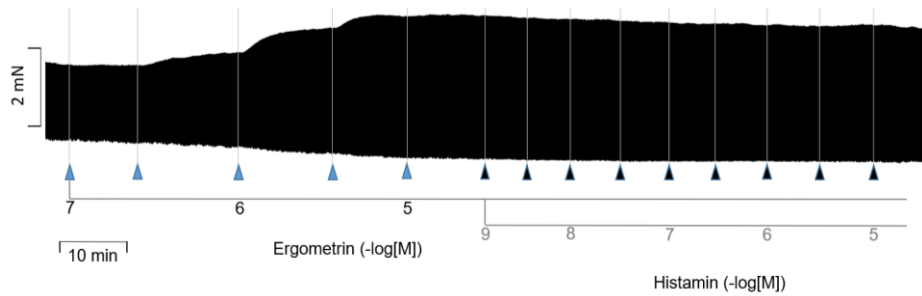


Abbildung 68: Mechanogramm (exemplarisch): Effekt von 0,1 bis 10  $\mu$ M Ergometrin, sowie nachfolgend von zusätzlich gegebenen 1 nM bis 10  $\mu$ M Histamin auf die Kontraktionskraft eines exemplarischen  $H_2$ -Rezeptor-transgenen linken Vorhofpräparates einer Maus. Waagrecht: Zeit, negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergometrin und nachfolgend Histamin, senkrecht: Durch das Präparat entwickelte Kontraktionskraft

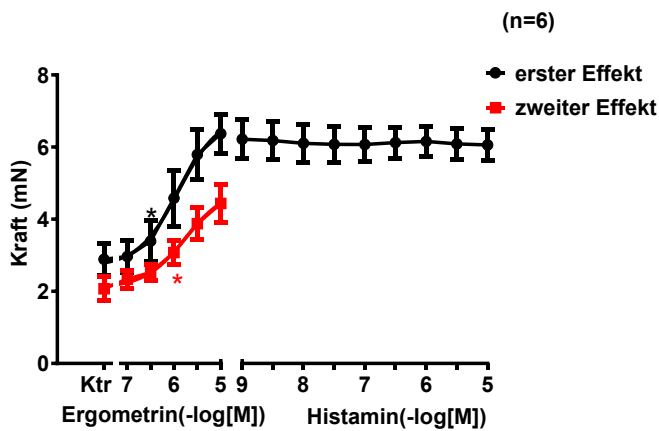


Abbildung 69: Effekt von Ergometrin sowie nachfolgend zusätzlich gegebenem Histamin auf die Kontraktionskraft von  $H_2$ -Rezeptor-transgenen linken Vorhofpräparaten der Maus. Der schwarze Graph stellt die gemessenen Werte unter initialer Gabe von Ergometrin und nachfolgend zusätzlich gegebenem Histamin (nach dem Skalenstrich) dar, der rote die Werte unter anschließender erneuter Gabe von Ergometrin nach zwischenzeitlichem Auswaschen aller zugegebenen Substanzen. Ktr=nach Einstellung des initialen Gleichgewichts gemessene Kontraktionskraft (schwarz), bzw. nach dem zwischenzeitlichen Auswaschen gemessener Wert (rot), Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergometrin sowie nachfolgend Histamin, Ordinate: absoluter Wert der gemessenen Kraftentwicklung mit SEM in mN, n=Anzahl der Experimente, \*=erster signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle (p<0,05)

10  $\mu$ M Ergometrin führten im Mittel zu einer Steigerung der Kontraktionskraft von 2,89 mN ( $\pm 1,18$  mN) auf 6,37 mN ( $\pm 1,43$  mN), was einer Steigerung um +120,41% entspricht.

Dabei wurden bei der ersten Gabe von Ergometrin 1,358  $\mu$ M Ergometrin und bei der zweiten Gabe 1,808  $\mu$ M Ergometrin benötigt, um die Hälfte der jeweiligen erreichten Effektstärke von 10

$\mu\text{M}$  Ergometrin zu erreichen. Die Angabe eines  $\text{EC}_{50}$ -Wertes ist aufgrund der nicht erwiesenermaßen erreichten Maximalwirkung von Ergometrin nicht sinnvoll möglich. Dennoch zeigt dies, daß bei wiederholter Gabe von Ergometrin eine höhere Konzentration nötig war, um die gleiche relative Steigerung der Effektstärke zu erreichen.

Weiterhin verkürzte Ergometrin an diesen Präparaten die Zeit bis zur maximalen Kontraktion (Abbildung 70) und steigerte den maximalen Anstieg der Kraftentwicklung (Abbildung 71), ohne daß zusätzlich hinzugegebenes Histamin diese Effekte weiter verstärken konnte. Zudem zeigte sich die Dauer der Relaxation verkürzt, sowie der maximale Anstieg der Relaxation gesteigert.

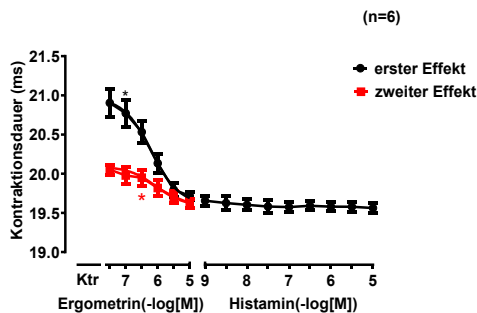


Abbildung 70: Effekt von Ergometrin sowie nachfolgend zusätzlich gegebenem Histamin auf die Dauer der Kontraktion von  $\text{hH}_2$ -Rezeptor-transgenen linken Vorhofpräparaten der Maus. Der schwarze Graph stellt die gemessenen Werte unter initialer Gabe von Ergometrin und nachfolgend zusätzlich gegebenem Histamin (nach dem Skalenstrich) dar, der rote die Werte unter anschließender erneuter Gabe von Ergometrin nach zwischenzeitlichem Auswaschen aller zugegebenen Substanzen. Ktr=nach Einstellung des initialen Gleichgewichts gemessene Werte (schwarz), bzw. nach dem zwischenzeitlichen Auswaschen gemessener Wert (rot), Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergometrin sowie nachfolgend Histamin, Ordinate: absoluter Wert der Dauer der Kontraktion in ms, jeweils mit SEM, n=Anzahl der Experimente, \*=erster signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle ( $p < 0,05$ )

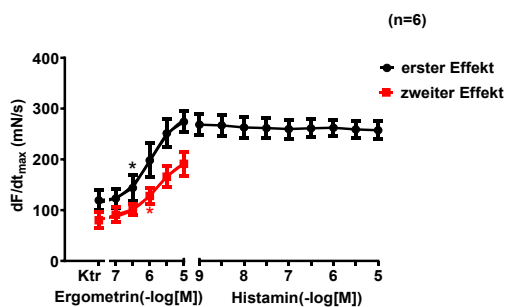


Abbildung 71: Effekt von Ergometrin sowie nachfolgend zusätzlich gegebenem Histamin auf die maximale Anstiegsteilheit der Kontraktionsentwicklung von  $\text{hH}_2$ -Rezeptor-transgenen linken Vorhofpräparaten der Maus. Der schwarze Graph stellt die gemessenen Werte unter initialer Gabe von Ergometrin und nachfolgend zusätzlich gegebenem Histamin (nach dem Skalenstrich) dar, der rote die Werte unter anschließender erneuter Gabe von Ergometrin nach zwischenzeitlichem Auswaschen aller zugegebenen Substanzen. Ktr=nach Einstellung des initialen Gleichgewichts gemessene Werte (schwarz), bzw. nach dem zwischenzeitlichen Auswaschen gemessener Wert (rot), Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergometrin sowie nachfolgend Histamin, Ordinate: absoluter Wert der der maximalen Anstiegsteilheit der Kontraktionsentwicklung in  $\text{mN/s}$  jeweils mit SEM, n=Anzahl der Experimente, \*=erster signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle ( $p < 0,05$ )

Alle diese Effekte ließen sich bei der Wiederholung der Zugabe von Ergometrin nach dem Auswaschen reproduzieren (vgl. jeweils rote Kurven der Diagramme).

#### 4.4.3 $H_2$ -TRANSGENE RECHTE VORHOFPRÄPARATE

Ergometrin verursachte an  $H_2$ -transgenen rechten Vorhofpräparaten einen konzentrationsabhängigen positiv chronotropen Effekt, der durch zusätzliche Gabe von Histamin nicht weiter zu steigern war, wie das Mechanogramm in Abbildung 72 exemplarisch zeigt. Daten aus allen Versuchen unter diesen Bedingungen wurden zusammengefasst und in Abbildung 73 dargestellt.

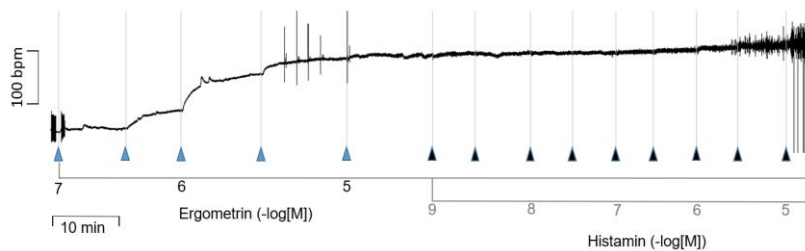


Abbildung 72: Mechanogramm (exemplarisch): Effekt von 0,1 bis 10  $\mu$ M Ergometrin, sowie nachfolgend von zusätzlich gegebenen 1 nM bis 10  $\mu$ M Histamin auf die Frequenz eines exemplarischen  $H_2$ -Rezeptor-transgenen rechten Vorhofpräparates einer Maus. Waagrecht: Zeit, negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergometrin und nachfolgend Histamin, senkrecht: Frequenz des spontan schlagenden Präparates

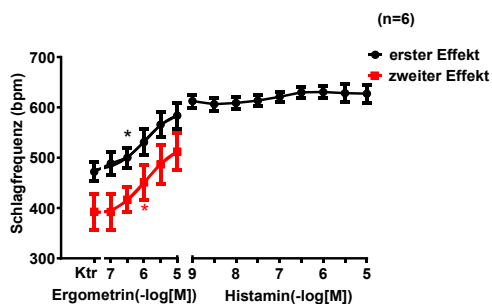


Abbildung 73: Effekt von Ergometrin sowie nachfolgend zusätzlich gegebenem Histamin auf die Frequenz von  $H_2$ -Rezeptor-transgenen rechten Vorhofpräparaten der Maus. Der schwarze Graph stellt die gemessenen Werte unter initialer Gabe von Ergometrin und nachfolgend zusätzlich gegebenem Histamin (nach dem Skalenstrich) dar, der Rote die Werte unter anschließender erneuter Gabe von Ergometrin nach zwischenzeitlichem Auswaschen aller zugegebenen Substanzen. Ktr=nach Einstellung des initialen Gleichgewichts gemessene Frequenz (schwarz), bzw. nach dem zwischenzeitlichen Auswaschen gemessener Wert (rot), Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergometrin sowie nachfolgend Histamin, Ordinate: absoluter Wert der gemessenen Frequenz mit SEM in beats per minute, n=Anzahl der Experimente, \*=erster signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle ( $p < 0,05$ )

10  $\mu$ M Ergometrin führten im Mittel zu einer Steigerung der Frequenz von 472,00 bpm ( $\pm 50,77$  bpm) auf 583,67 bpm ( $\pm 63,39$  bpm), was einer Steigerung um 23,66% entspricht.

Dieser Effekt ließ sich bei der Wiederholung der Zugabe von Ergometrin nach dem Auswaschen reproduzieren (vgl. jeweils rote Kurven der Diagramme).

#### 4.4.4 h5-HT<sub>4</sub>-TRANSGENE LINKE VORHOFPRÄPARATE

Es wurden Vorhofpräparate von h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen Mäusen mit denen von WT-Mäusen verglichen. Dazu wurde kumulativ zunächst Ergometrin in die Organbäder gegeben, sodass die darin befindliche Konzentration von Ergometrin schrittweise (multipliziert jeweils um den Faktor drei) von 0,1  $\mu$ M auf 10  $\mu$ M anstieg. Im Anschluss wurde zusätzlich ebenfalls schrittweise Serotonin hinzugegeben (Konzentration im Organbad von 1 nM bis 10  $\mu$ M ansteigend). Anschließend wurden gemäß des Versuchsprotokolls beide Substanzen vollständig ausgewaschen und erneut Ergometrin nach demselben Schema hinzugegeben (Abbildung 74). Dies geschah zeitgleich für jeweils ein WT und ein h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenes linkes und rechtes Vorhofpräparat, also jeweils vier Präparate.

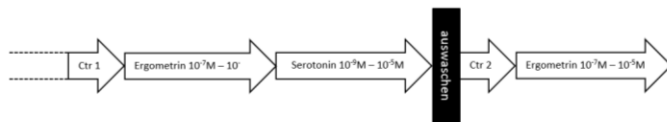


Abbildung 74: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs von 5-HT<sub>4</sub>-tg und WT rechten und linken Mausvorhöfen mit Zugabe von Ergometrin und Serotonin

Ergometrin verursachte an h5-HT<sub>4</sub>-transgenen linken Vorhofpräparaten keinen positiv inotropen Effekt, zusätzlich hinzugegebenes Serotonin jedoch schon, wie das Mechanogramm in Abbildung 75 exemplarisch zeigt. Daten aus allen Versuchen unter diesen Bedingungen wurden zusammengefasst und in Abbildung 76 dargestellt.

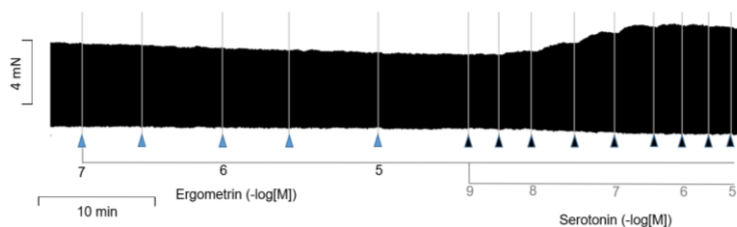


Abbildung 75: Mechanogramm (exemplarisch): Effekt von 0,1 bis 10  $\mu$ M Ergometrin, sowie nachfolgend von zusätzlich gegebenen 1 nM bis 10  $\mu$ M Serotonin auf die Kontraktionskraft eines exemplarischen h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen linken Vorhofpräparates einer Maus. Waagerecht: Zeit, negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergometrin und nachfolgend Serotonin, senkrecht: Durch das Präparat entwickelte Kontraktionskraft

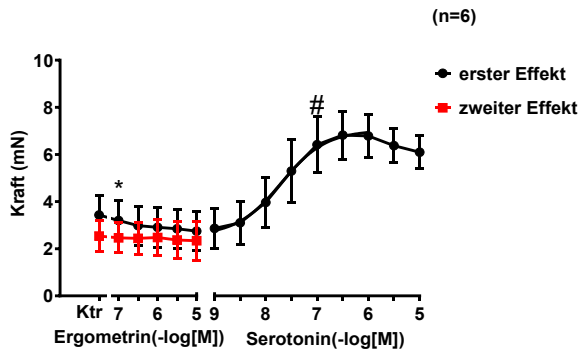


Abbildung 76: Effekt von Ergometrin sowie nachfolgend zusätzlich gegebenem Serotonin auf die Kontraktionskraft von h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen linken Vorhofpräparaten der Maus. Der schwarze Graph stellt die gemessenen Werte unter initialer Gabe von Ergometrin und nachfolgend zusätzlich gegebenem Serotonin (nach dem Skalenstrich) dar, der rote die Werte unter anschließender erneuter Gabe von Ergometrin nach zwischenzeitlichem Auswaschen aller zugegebenen Substanzen. Ktr=nach Einstellung des initialen Gleichgewichts gemessene Kontraktionskraft (schwarz), bzw. nach dem zwischenzeitlichen Auswaschen gemessener Wert (rot), Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergometrin sowie nachfolgend Serotonin, Ordinate: absoluter Wert der gemessenen Kraftentwicklung mit SEM in mN, n=Anzahl der Experimente, \*=erster signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle (p<0,05), #=erster signifikanter Unterschied gegenüber 10 µM Ergometrin

Unter Gabe von 10 µM Ergometrin fiel die Kontraktionskraft h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgener linker Mausvorhofpräparate im Mittel von 3,43 mN (±1,68 mN) um 19,83% auf 2,75 mN (±1,68 mN) ab. Zusätzlich hinzugegebenes Serotonin (10 µM) hingegen steigerte die mittlere Kontraktionskraft auf 6,10 mN (±1,41 mN), was einer Steigerung um 97,7% des Initialwertes entspricht.

Weiterhin steigerte zusätzlich hinzugegebenes Serotonin, nicht jedoch das initial gegebene Ergometrin den maximalen Anstieg der Kraftentwicklung, wie aus Abbildung 77 hervorgeht. Gleiches zeigte sich für den maximalen Anstieg der Relaxation.

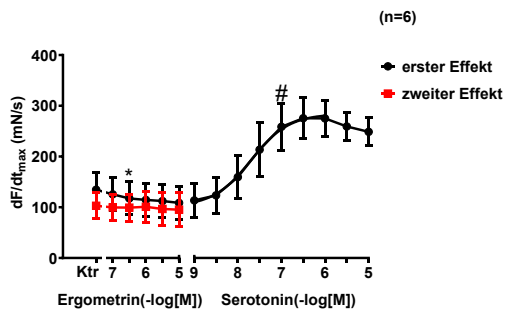


Abbildung 77: Effekt von Ergometrin sowie nachfolgend zusätzlich gegebenem Serotonin auf die maximale Anstiegssteilheit der Kontraktionsentwicklung von h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen linken Vorhofpräparaten der Maus. Der schwarze Graph stellt die gemessenen Werte unter initialer Gabe von Ergometrin und nachfolgend zusätzlich gegebenem Serotonin (nach dem Skalenstrich) dar, der rote die Werte unter anschließender erneuter Gabe von Ergometrin nach zwischenzeitlichem Auswaschen aller zugegebenen Substanzen. Ktr=nach Einstellung des initialen Gleichgewichts gemessene Werte (schwarz), bzw. nach dem zwischenzeitlichen Auswaschen gemessener Wert (rot), Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergometrin sowie nachfolgend Serotonin, Ordinate: absoluter Wert der maximalen Anstiegssteilheit der Kontraktionsentwicklung in mN/s jeweils mit SEM, n=Anzahl der Experimente, \*=erster signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle (p<0,05), #=erster signifikanter Unterschied gegenüber 10 µM Ergometrin



#### 4.4.5 h5-HT<sub>4</sub>-TRANSGENE RECHTE VORHOFPRÄPARATE

Ergometrin verursachte an h5-HT<sub>4</sub>-transgenen rechten Vorhofpräparaten einen schwachen konzentrationsabhängigen positiv chronotropen Effekt, welcher durch zusätzlich hinzugegebenes Serotonin noch weiter steigern war, wie das Mechanogramm in Abbildung 78 exemplarisch zeigt. Daten aus allen Versuchen unter diesen Bedingungen wurden zusammengefasst und in Abbildung 79 dargestellt.

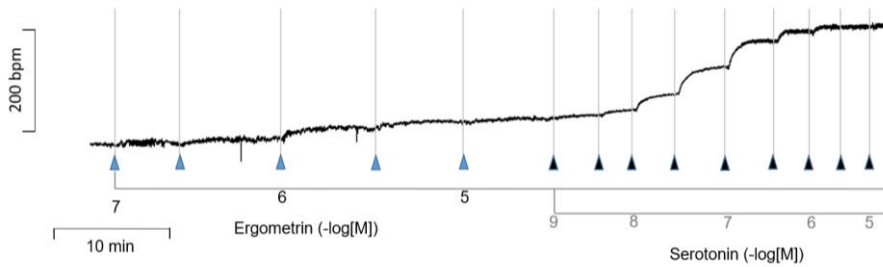


Abbildung 78: Mechanogramm (exemplarisch): Effekt von 0,1 bis 10  $\mu$ M Ergometrin, sowie nachfolgend von zusätzlich gegebenen 1 nM bis 10  $\mu$ M Serotonin auf die Frequenz eines exemplarischen h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen rechten Vorhofpräparates einer Maus. Waagerecht: Zeit, negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergometrin und nachfolgend Serotonin, senkrecht: Frequenz des Präparates

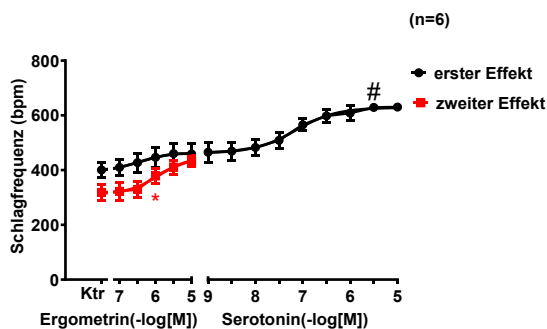


Abbildung 79: Effekt von Ergometrin sowie nachfolgend zusätzlich gegebenem Serotonin auf die Frequenz von h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen rechten Vorhofpräparaten der Maus. Der schwarze Graph stellt die gemessenen Werte unter initialer Gabe von Ergometrin und nachfolgend zusätzlich gegebenem Serotonin (nach dem Skalenstrich) dar, der rote die Werte unter anschließender erneuter Gabe von Ergometrin nach zwischenzeitlichem Auswaschen aller zugegebenen Substanzen. Ktr=nach Einstellung des initialen Gleichgewichts gemessene Frequenz (schwarz), bzw. nach dem zwischenzeitlichen Auswaschen gemessener Wert (rot), Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergometrin sowie nachfolgend Serotonin, Ordinate: absoluter Wert der gemessenen Frequenz mit SEM in beats per minute, n=Anzahl der Experimente, \*=erster signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle ( $p < 0,05$ ), #=erster signifikanter Unterschied gegenüber 10  $\mu$ M Ergometrin

10  $\mu$ M Ergometrin bewirkten an h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen rechten Mausvorhofpräparaten einen Anstieg der Frequenz von 400,63 bpm ( $\pm 59,81$  bpm) um 14,60% auf 459,13 bpm ( $\pm 83,54$  bpm). Zusätzlich gegebene 10  $\mu$ M Serotonin konnten dies weiter auf 630,11 bpm ( $\pm 30,36$  bpm) steigern, was einer zusätzlichen Steigerung um 42,7% des Initialwertes entspricht.

#### 4.4.6 VERSUCHE MIT REZEPTORANTAGONISTEN

Um die Beteiligung des  $H_2$ -Rezeptors an der Wirkung von Ergometrin zu bestätigen, wurde der entsprechende Antagonist verwendet: 10  $\mu\text{M}$  Cimetidin hoben die positiv inotrope (Abbildung 80) und chronotrope (Abbildung 81) Wirkung von zuvor appliziertem LSD an  $hH_2$ -Rezeptor-transgenen Präparaten auf.

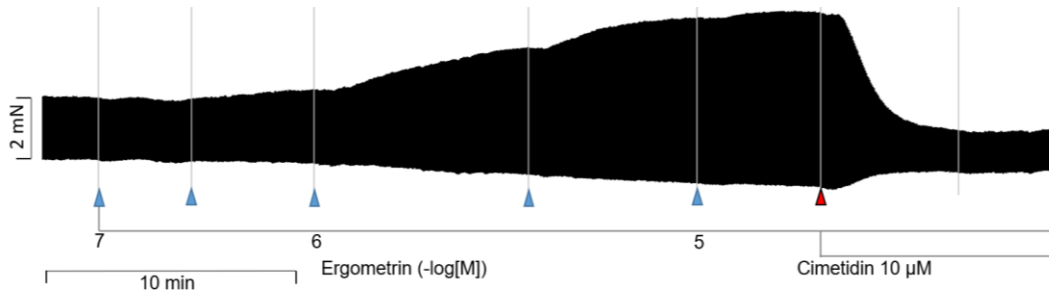


Abbildung 80: Mechanogramm: Effekt von 0,1 bis 10  $\mu\text{M}$  Ergometrin, sowie nachfolgend von zusätzlich gegebenen 10  $\mu\text{M}$  Cimetidin auf die Kontraktionskraft eines  $hH_2$ -Rezeptor-transgenen linken Vorhofpräparates einer Maus. Waagrecht: Zeit, negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergometrin und nachfolgend Cimetidin, senkrecht: Durch das Präparat entwickelte Kontraktionskraft

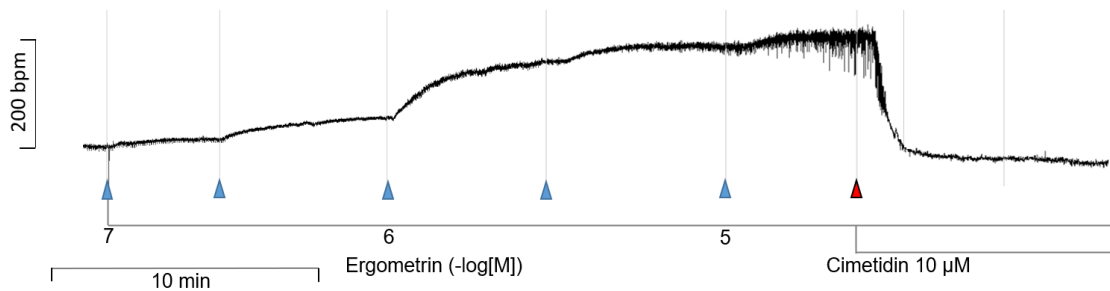


Abbildung 81: Mechanogramm: Effekt von 0,1 bis 10  $\mu\text{M}$  Ergometrin, sowie nachfolgend von zusätzlich gegebenen 10  $\mu\text{M}$  Cimetidin auf die Frequenz eines  $hH_2$ -Rezeptor-transgenen rechten Vorhofpräparates einer Maus. Waagrecht: Zeit, negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergometrin und nachfolgend Cimetidin, senkrecht: Durch das Präparat entwickelte Frequenz

#### 4.4.7 PROTEINPHOSPHORYLIERUNG IN MAUSPRÄPARATEN

An mittels Western Blot untersuchten Proben, die zuvor 10  $\mu\text{M}$  Ergometrin ausgesetzt worden waren, konnte gezeigt werden, daß 10  $\mu\text{M}$  Ergometrin die Menge von an Serin-16 phosphoryliertem Phospholamban in  $hH_2$ -Rezeptor-transgenen Vorhofpräparaten, jedoch nicht in WT-Präparaten erhöhte, wie Abbildung 82 zeigt. Nachfolgend wurden die Quotienten aus PLB16 und CSQ bestimmt und in Abbildung 83 vergleichend graphisch dargestellt:

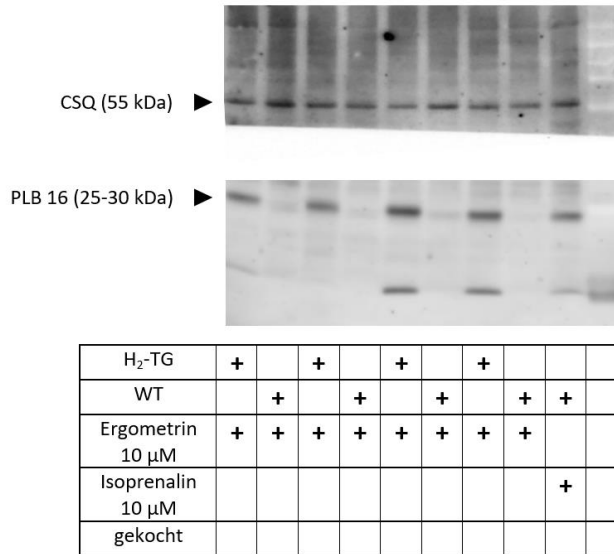


Abbildung 82: Aufnahme einer Nitrocellulosemembran: Die Banden von Calsequestrin (CSQ) sowie der pentameren Form von PLB16 mit dem jeweiligen Molekulargewicht wurden mittels Chemilumineszenz dargestellt. Die Bedingungen, denen die Proben in den einzelnen Geltaschen ausgesetzt waren, sowie deren Genotypen, sind der darunter befindlichen Tabelle zu entnehmen

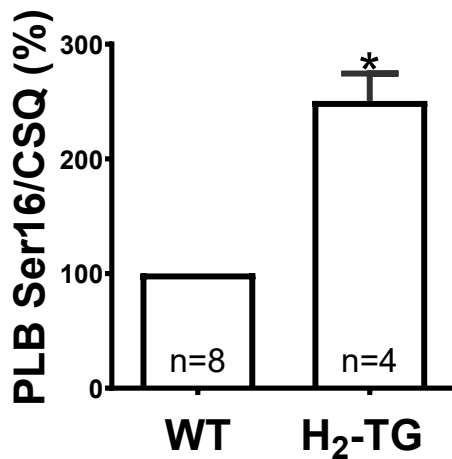


Abbildung 83: Graphische Darstellung des relativen Quotienten der gemessenen Bandenintensitäten von Plb16 gegenüber CSQ für hH<sub>2</sub>-Rezeptor-transgene Präparate gegenüber dem von WT-Präparaten. Abszisse: Genotyp, Ordinate: relative Werte der Quotienten aus PLB16 und CSQ, n=Anzahl der analysierten Proben, \*=p<0,05 gegenüber WT

#### 4.4.8 KONTRAKTIONSVERSUCHE MENSCHLICHER PRÄPARATE

Ergometrin führte an isolierten Präparaten aus menschlichen rechten Vorhöfen zu keinem positiv inotropen Effekt, wie das Mechanogramm in Abbildung 84 beispielhaft zeigt. Daten aus allen Versuchen unter diesen Bedingungen wurden zusammengefasst und in Abbildung 85 dargestellt.

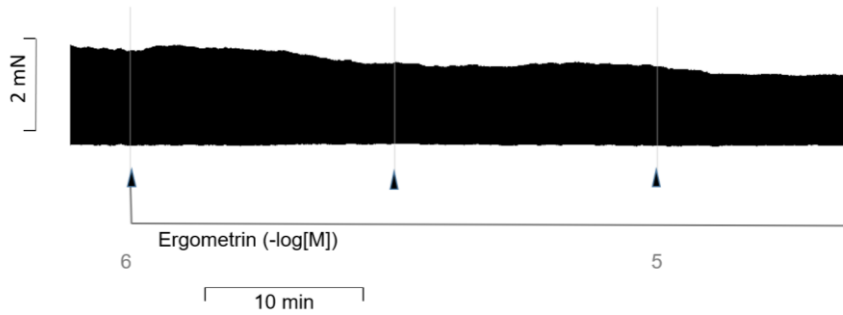


Abbildung 84: Mechanogramm: Effekt von 1 bis 10  $\mu\text{M}$  Ergometrin auf die Kontraktionskraft eines menschlichen rechten Vorhofpräparates. Waagrecht: Zeit, negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergometrin, senkrecht: Durch das Präparat entwickelte Kontraktionskraft

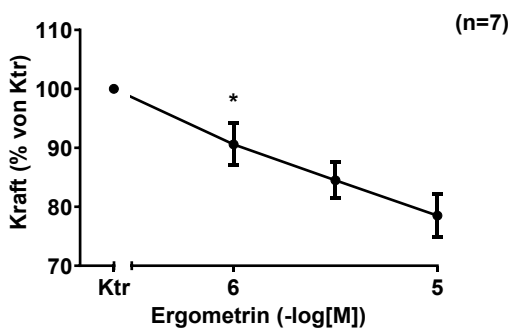


Abbildung 85: Effekt von Ergometrin auf die Kontraktionskraft von menschlichen rechten Vorhofpräparaten. Ktr=nach Einstellung des initialen Gleichgewichts gemessene Kontraktionskraft, Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergometrin, Ordinate: Wert der gemessenen Kontraktionskraft mit SEM in mN, n=Anzahl der Experimente, \*=erster signifikanter Unterschied gegenüber Ktr

Tatsächlich ließ sich sogar ein negativ inotroper Effekt von Ergometrin erkennen. Analog zu LSD erwägten wie die Hypothese, daß Ergometrin antagonistisch am menschlichen  $\beta$ -Adrenozeptor wirken könnte. Dazu wurden Versuche an menschlichen rechten Vorhofpräparaten durchgeführt, in denen nach vorheriger Gabe von 10 nM des  $\beta$ -Adrenozeptoragonisten Isoprenalin Ergometrin bis zu einer Maximalkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  hinzugegeben wurde. Ein beispielhaftes Mechanogramm ist in Abbildung 86 nachfolgend dargestellt. Daten aus allen Versuchen unter diesen Bedingungen wurden zusammengefasst und in Abbildung 87 dargestellt.

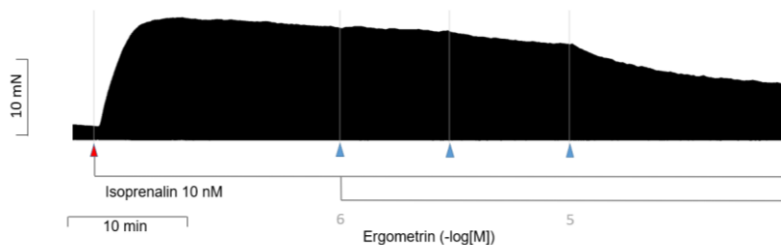


Abbildung 86: Mechanogramm: Effekt von 10 nM Isoprenalin und nachfolgend zusätzlich 1  $\mu\text{M}$  bis 10  $\mu\text{M}$  Ergometrin auf ein menschliches Vorhofpräparat. Waagrecht: Zeit, Zugabe von Isoprenalin und negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergometrin, senkrecht: Durch das Präparat entwickelte Kontraktionskraft

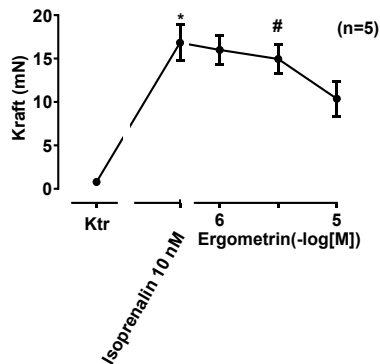


Abbildung 87: Effekt von Isoprenalin und nachfolgend zusätzlich Ergometrin auf die Kontraktionskraft von menschlichen Vorhofpräparaten. Ktr=nach Einstellung des initialen Gleichgewichts gemessene Kontraktionskraft, Abszisse: Zugabe von Isoprenalin und negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration von Ergometrin, Ordinate: Wert der gemessenen Kontraktionskraft mit SEM in mN, n=Anzahl der Experimente, \*=erster signifikanter Unterschied gegenüber Ktr, #=erster signifikanter Unterschied gegenüber 10 nM Isoprenalin

Isoprenalin bewirkte einen positiv inotropen Effekt. Zusätzlich hinzugegebenes Ergometrin schwächte diesen positiv inotropen Effekt ab. Diese Daten lassen eine  $\beta$ -antagonistische Wirkung von Ergometrin an menschlichen und möglicherweise auch an Präparaten der Maus zumindest plausibel erscheinen und könnten durch Ergometrin bedingte negativ inotrope Effekte erklären. Diese Hypothese sollte weiter untersucht werden.

Um mögliche geringgradige bzw. durch z.B.  $\beta$ -antagonistische Wirkungen überlagerte Effekte von Ergometrin auf menschliche Kardiomyozyten zu demaskieren, wurden analog zu Versuchen mit LSD und Ergotamin Versuche durchgeführt, in denen die Proben vor Zugabe von 10  $\mu$ M Ergometrin mit 1  $\mu$ M Cilostamid behandelt wurden, um mögliche Wirkungen über die den untersuchten  $hH_2$ -Rezeptoren bzw.  $h5-HT_4$ -Rezeptoren nachgeschalteten Signalkaskaden mit einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels zu verstärken und somit sichtbar zu machen. Die dermaßen durchgeführten Experimente ließen neben dem positiv inotropen Effekt des Cilostamids einen darüberhinausgehenden zusätzlichen positiv inotropen Effekt von 10  $\mu$ M Ergometrin erkennen.

Dieser Effekt zeigte sich als durch Zugabe von Antagonisten am  $hH_2$ -Rezeptor zumindest teilweise reversibel, was auf eine Wirkung von Ergometrin an in menschlichen Kardiomyozyten vorkommenden Rezeptoren dieses Typs schließen lässt. Dafür wurden 10  $\mu$ M Cimetidin verwendet. Die gleiche Menge des Serotoninrezeptorantagonisten Tropisetron hingegen führte zu keinem vergleichbaren Effekt. Im Folgenden sei ein exemplarisches Mechanogramm in Abbildung 88 dargestellt:

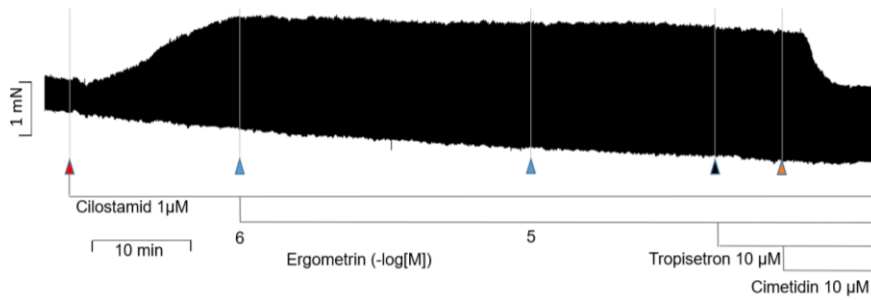
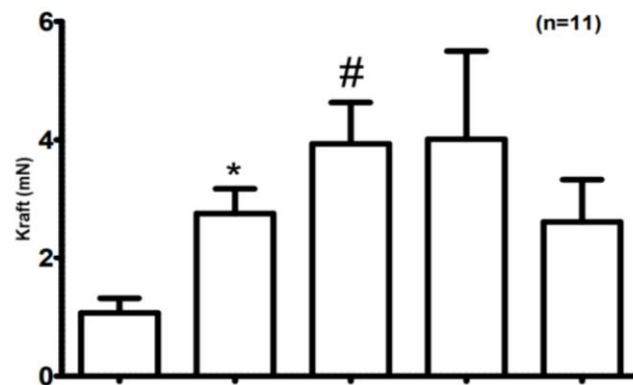


Abbildung 88: Mechanogramm: Effekt von 1 µM Cilostamid, sowie nachfolgend zusätzlich 10 µM Ergometrin sowie 10 µM Tropisetron und 10 µM Cimetidin auf die Kontraktionskraft eines menschlichen rechten Vorhofpräparates. Waagrecht: Zeit, senkrecht: Durch das Präparat entwickelte Kontraktionskraft.

Die inotropen Effekte von Cilostamid, Ergometrin, Tropisetron und Cimetidin aus allen unter diesen Bedingungen durchgeführten Versuchen wurden quantifiziert und in Abbildung 89 dargestellt:



Cilostamid 1 µM		+	+	+	+
Ergometrin 10 µM			+	+	+
Tropisetron 10 µM				+	+
Cimetidin 10 µM					+

Abbildung 89: Darstellung der Kontraktionskraft menschlicher rechter Vorhofpräparate in Anwesenheit von Cilostamid sowie zusätzlich 10 µM Ergometrin, 10 µM Tropisetron bzw. 10 µM Cimetidin. Die zum jeweiligen Zeitpunkt zugegebenen Substanzen bzw. deren Kombination sind der Tabelle zu entnehmen. Ordinate: Kontraktionskraft in mN, n=Anzahl der Versuche, \*=signifikanter Unterschied gegenüber Kontrolle( $p < 0,05$ ), #=signifikanter Unterschied gegenüber 1 µM Cilostamid( $p < 0,05$ )

## 5. Diskussion

### 5.5. Kontraktionsversuche an isolierten Vorhofpräparaten der Maus

#### 5.5.1 VORHOFPRÄPARATE DER WT-MAUS

Weder LSD, Ergotamin noch Ergometrin bewirkten an linken Vorhofpräparaten von WT-Mäusen einen positiv inotropen Effekt. Dies ist insofern plausibel, als WT-Mauskardiomyozyten weder funktionell relevante  $H_2$ - noch  $5-HT_4$ -Rezeptoren enthalten (Dai 1976; Gergs et al. 2010; Gergs et al. 2013; Laher and McNeill 1980a, 1980b; Werner Flacke et al. 1967). Kontraktionsversuche mit LSD und Ergometrin an menschlichen Präparaten legen nahe, daß LSD (Dolphin et al. 1978) und Ergometrin, jedoch nicht Ergotamin eine  $\beta$ -antagonistische Wirkung haben könnten: 10 µM LSD

oder Ergometrin hoben den positiv inotropen Effekt von zuvor gegebenem Isoprenalin auf, 10  $\mu$ M Ergotamin jedoch nicht. Diese Daten lassen eine  $\beta$ -antagonistische Wirkung von LSD und Ergotamin an menschlichen Präparaten zumindest plausibel erscheinen und könnten durch diese beiden Substanzen bedingte negativ inotrope Effekte erklären (Neumann et al. 2024). Diese Hypothese sollte weiter untersucht werden. Übertrüge man diesen Gedanken auf die Versuche an Maus-Präparaten, könnte dies den über die normale Abschaffung der Präparate hinausgehenden negativ inotropen Effekt mindestens teilweise erklären. Positiv inotrope Effekte waren nicht zu beobachten (Gergs et al. 2024; Jacob et al. 2023a; Jacob et al. 2023b). Es bestätigten sich weiterhin die Befunde von Gergs et al. 2010 und Neumann et al. 2021, nach denen Serotonin bzw. Histamin zu keinem positiv inotropen Effekt an linken WT Vorhofpräparaten führten: Unter Zugabe der beiden Substanzen ließ sich am WT-Präparat in keinem Fall eine Steigerung der Kontraktionskraft messen (Gergs et al. 2024; Jacob et al. 2023a; Jacob et al. 2023b).

#### 5.5.2 $H_2$ -REZEPTOR-TRANSGENE VORHOFPRÄPARATE

Anders verhält es sich am  $hH_2$ -Rezeptor-transgenen linken Vorhofpräparat: An diesen bewirkten sowohl LSD, als auch Ergotamin und Ergometrin einen positiv inotropen Effekt (Angus and Black 1980; Bongrani et al. 1979; Gergs et al. 2024; Jacob et al. 2023a; Jacob et al. 2023b). Ähnliches konnte für das Maximum der ersten Ableitung der Kontraktionsentwicklung gezeigt werden (Gergs et al. 2024; Jacob et al. 2023a; Jacob et al. 2023b). Auch die Dauer von Kontraktion und Relaxation (positiv lusitroper Effekt) verringerten sich unter LSD, Ergotamin und Ergometrin, nicht jedoch unter zusätzlich gegebenem Histamin (Gergs et al. 2024; Jacob et al. 2023a; Jacob et al. 2023b). Der Vergleich mit der bei WT-Präparaten fehlenden Veränderung unter Gabe von LSD, Ergotamin bzw. Ergometrin lässt schließen, daß diese Effekte auf den transgenen menschlichen  $H_2$ -Rezeptoren beruhen müssen. Diese These wird noch dadurch unterstützt, daß der selektive  $H_2$ -Rezeptor-Antagonist Cimetidin den positiv inotropen Effekt aufheben konnte (Gergs et al. 2024; Jacob et al. 2023a; Jacob et al. 2023b). Die Tatsache, daß nach Gabe der drei Substanzen gegebenes Histamin keinen zusätzlichen Effekt bewirken konnte, legt nahe, daß die maximale Aktivität der  $hH_2$ -Rezeptoren bereits erreicht worden war. Somit wären LSD, Ergotamin und Ergometrin mindestens im transgenen Mausmodell volle Agonisten am menschlichen  $H_2$ -Rezeptor (Gergs et al. 2024; Jacob et al. 2023a; Jacob et al. 2023b).

Für LSD und Ergometrin lässt sich außerdem der Effekt unter der ersten mit der Wiederholung der Substanzgabe nach dem Auswaschen vergleichen: Bei wiederholter Gabe wurden höhere

Konzentrationen von LSD bzw. Ergometrin benötigt, um das halbe Maximum des erzielten Gesamteffektes zu erreichen, es fand also eine Rechtsverschiebung der Kurve statt (es wurde nicht immer sicher ein Plateau des Effektes erreicht, daher ist die Angabe von EC<sub>50</sub>-Werten nicht möglich). Dies ließe sich durch eine Desensitivierung der Rezeptoren auf den Kardiomyozyten erklären, bedingt durch die wiederholte Gabe von Agonisten, wodurch höhere Konzentrationen des Agonisten benötigt werden, um eine vergleichbare Reaktion auszulösen. Eine Desensitivierung des hH<sub>2</sub>-Rezeptors durch wiederholte Gabe von Histamin oder dem selektiven H<sub>2</sub>-Agonisten Dimaprit wurde in diesem Mausmodell bereits gezeigt (Gergs et al. 2020) und konnte auch in Zellkultur an transfizierten Rezeptoren beobachtet werden (Übersicht: Neumann et al. 2021e).

Ähnliches ließ sich auch bei Betrachtung der Frequenzen der spontan schlagenden rechten Vorhofpräparate (hH<sub>2</sub>-Rezeptor-transgen) beobachten: LSD, Ergotamin und Ergometrin in einer Konzentration von jeweils 10 µM führten zu einer Erhöhung der Frequenz (Cortell et al. 2010; Gergs et al. 2024; Jacob et al. 2023a; Jacob et al. 2023b; Song et al. 2018). Zusätzlich gegebenes Histamin führte allenfalls zu einer geringen weiteren Steigerung dieses positiv chronotropen Effektes. Dagegen reduzierte 10 µM Cimetidin die positiv chronotrope Wirkung von zuvor appliziertem LSD, Ergotamin bzw. Ergometrin, was erneut für die Vermittlung des Effekts durch H<sub>2</sub>-Rezeptoren spricht (Angus and Black 1980; Bongrani et al. 1979; Gergs et al. 2024; Jacob et al. 2023a; Jacob et al. 2023b).

Analog zu Auswertung des positiv inotropen Effektes ließ sich auch bei der Frequenz eine Rechtsverschiebung der Kurve, also eine mutmaßliche Desensitivierung des Rezeptors (Freedman and Lefkowitz 1996), bei der wiederholten gegenüber der initialen Gabe von LSD bzw. Ergometrin beobachten, welche für Histaminrezeptoren prinzipiell bereits beschrieben wurde (Smit et al. 1994).

### 5.5.3 h5-HT<sub>4</sub>-REZEPTOR TRANSGENE VORHOFPRÄPARATE

LSD bewirkte an h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen linken Mausvorhöfen einen positiv inotropen Effekt, welcher sich allerdings durch zusätzliche Gabe von Serotonin weiter deutlich steigern ließ (Gergs et al. 2024). LSD konnte die maximale Anstiegssteilheit der Kraftentwicklung und der Relaxation steigern, sowie die Dauer von Kontraktion und Relaxation verkürzen (Gergs et al. 2024). All diese Effekte konnten durch Serotonin weiter gesteigert werden (Gergs et al. 2024).



Das Gleiche gilt für Ergotamin: Auch dieses führte zu einem positiv inotropen Effekt, welcher sich durch zusätzliche Gabe von Serotonin weiter steigern ließ (Jacob et al. 2023b).

Der Vergleich mit der bei WT-Präparaten fehlenden Veränderung unter Gabe von LSD bzw. Ergotamin lässt schließen, daß diese Effekte auf den transgenen menschlichen 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren beruhen müssen (Gergs et al. 2024; Jacob et al. 2023b). Diese These wird noch dadurch unterstützt, daß der 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-Antagonist Tropicam eben jenen positiv inotropen Effekt umkehren konnte (Gergs et al. 2024; Jacob et al. 2023b). Die Tatsache jedoch, daß der physiologische (vollständige) Agonist Serotonin eine weitere Steigerung aller beschriebenen Effekte bewirken konnte, spricht dafür, daß durch Bindung von LSD bzw. Ergotamin die h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren nicht ihre maximale Aktivität erreicht hatten. Daraus lässt sich folgern, daß LSD und Ergotamin partielle Agonisten am menschlichen 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor sind (Gergs et al. 2024; Jacob et al. 2023b).

Ergometrin hingegen führte an h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen linken Vorhofpräparaten der Maus zu keinem inotropen Effekt (Jacob et al. 2023a).

LSD und Ergotamin bewirkten an h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen rechten Vorhofpräparaten der Maus einen positiv chronotropen Effekt, wobei sich die Frequenzen durch 10 µM Serotonin weiter steigern ließen (Gergs et al. 2024; Jacob et al. 2023b).

Diese Effekte waren durch 10 µM des Serotoninrezeptorantagonisten Tropicam reversibel, was für die Vermittlung über diese Rezeptoren spricht (Kaumann et al. 1990). Wie auch die zuvor beschriebenen inotropen Effekte, ließen sich auch diese chronotropen Effekte durch zusätzlich gegebenes Serotonin weiter deutlich steigern, was die Hypothese eines Partialagonismus unterstützt (Gergs et al. 2024; Jacob et al. 2023b; Khonsary 2023).

Erstaunlicherweise bewirkte Ergometrin zwar an linken Vorhofpräparaten keinen positiv inotropen, jedoch an rechten Vorhofpräparaten einen leichten positiv chronotropen Effekt, welcher sich durch 10 µM Serotonin weiter steigern ließ (Jacob et al. 2023a).

Dies könnte für einen doch vorhandenen und im linken Vorhofpräparat durch Überlagerung nicht sichtbaren sehr schwachen Partialagonismus des Ergometrins am h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor sprechen, oder aber auf der Stimulation von Maus-WT H<sub>2</sub>-Rezeptoren in Sinusknotenzellen beruhen (Jacob et al. 2023a).

#### 5.5.4 LIMITIERUNGEN

Die hier behandelten Versuche wurden an isolierten rechten und linken Vorhofpräparaten von Mäusen durchgeführt. Im Arbeitsmyokard der Wildtyp Maus findet man funktionell weder H<sub>2</sub>- noch 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren (Bartlet 1963; Dai 1976; Laher and McNeill 1980a; Wellner-Kienitz et al. 2003; Werner Flacke et al. 1967), sodass weder für Histamin und Serotonin, noch für andere Liganden dieser Rezeptoren ein direkter rezeptorvermittelter Effekt zu erwarten war (Gergs et al. 2024; Jacob et al. 2023a; Jacob et al. 2023b). Eine mögliche Ausnahme könnten Sinusknotenzellen des rechten Vorhofs darstellen, welche möglicherweise über funktionell aktive H<sub>2</sub>-Rezeptoren der WT-Maus verfügen (Jacob et al. 2023a). Die Dichte der Rezeptoren im Sinusknoten könnte also höher als im Arbeitsmyokard sein. Ein Präzedenzfall liegt bei Ratten im Sinusknoten für Glucagon-Rezeptoren vor (Merino et al. 2015). Somit ist ein positiv chronotroper Effekt, vermittelt über Agonisten des Maus-H<sub>2</sub>-Rezeptors, denkbar. Auch die Sinusknotenzellen aller transgenen rechten Vorhofpräparate sollten über diese Rezeptoren verfügen, zusätzlich zu den transgenen menschlichen Histamin-bzw. Serotoninrezeptoren. Jedenfalls gibt es keinen Grund zu der Annahme, daß die Expression endogener Mausrezeptoren in den transgenen Tieren verändert ist. Dies mag im Falle hH<sub>2</sub>-Rezeptor-transgener Präparate von wenig Bedeutung sein, da die H<sub>2</sub>-Rezeptoren der WT-Maus funktionell den menschlichen ähneln. Jedoch verfügen auch die h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor transgenen rechten Vorhofpräparate über H<sub>2</sub>-Rezeptoren im Sinusknoten (Jacob et al. 2023a). Dies könnte positiv chronotrope Effekte des (potentiellen) H<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten Ergometrin an h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen rechten Vorhofpräparaten erklären, welche ansonsten dem als nicht vorhanden anzunehmenden Agonismus des Ergometrins an 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren widersprechen würden (Jacob et al. 2023a). Es muss jedoch angenommen werden, daß sich bei der Untersuchung chronotroper Effekte aller drei untersuchten Substanzen die Wirkung über den interessierenden transgenen menschlichen Rezeptor nicht vollständig von der einer möglichen Wirkung über Maus-WT H<sub>2</sub>-Rezeptoren trennen lässt.

Weiterhin könnten Wirkungen über weitere physiologische Rezeptoren der WT-Maus, beispielsweise  $\beta$ -Adrenozeptoren, die Wirkungen von LSD, Ergotamin bzw. Ergometrin verzerren, beispielsweise im Sinne eines negativ inotropen Effektes durch einen  $\beta$ -Antagonismus, welcher negativ inotrope Effekte aller drei Substanzen an WT linken Vorhofpräparaten erklären könnte (Neumann et al. 2024). Im Falle eines Agonismus am hH<sub>2</sub>-oder h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor würde dieser Effekt durch über andere Rezeptoren vermittelte positiv inotrope Effekte sozusagen überkompensiert, sodass dadurch der ermittelte positiv inotrope Effekt über die transgenen Rezeptoren allenfalls unterschätzt würde.

Der Vergleich transgener Vorhofpräparate mit WT-Präparaten unter ansonsten gleichen Bedingungen erlaubte dennoch eine Aussage über die Wirkung von LSD, Ergotamin bzw. Ergometrin gegenüber dem  $hH_2$ - bzw.  $h5-HT_4$ -Rezeptor. Da die Existenz bzw. das Fehlen des transgenen menschlichen Rezeptorproteins idealerweise den einzigen Unterschied zwischen den beiden Armen des Versuchs darstellte, können direkte Unterschiede des Verhaltens der Präparate bei Fehlen anderer Störfaktoren auf die Wirkung des transgenen Rezeptors zurückgeführt und somit auf Grundlage des Verständnisses des Wirkmechanismus' des Rezeptors eine qualitative Aussage über einen Agonismus der verwendeten Substanz am untersuchten Rezeptor getroffen werden (Gergs et al. 2024; Jacob et al. 2023a; Jacob et al. 2023b).

Unter der Annahme, daß Histamin bzw. Serotonin als physiologische endogene Liganden vollständige Agonisten an ihren jeweiligen Rezeptoren seien (Neumann et al. 2023), kann weiterhin der Effekt unter einer deutlich überphysiologischen Konzentration von Histamin bzw. Serotonin als maximaler durch den jeweiligen Rezeptor vermittelbarer Effekt angesehen werden. Kann die gleiche Effektstärke durch eine andere Substanz erreicht werden, so ist diese folglich ebenfalls ein vollständiger Agonist anzusehen. Gelingt das nicht, so ist eher ein Partialagonismus anzunehmen (Khonsary 2023). Eine Aussage über die Affinität der Substanzen zu den Rezeptoren bzw. deren Vergleich kann dadurch nicht erfolgen, dafür bedürfte es der jeweiligen  $EC_{50}$ -Werte. Die Berechnung derselben kann unter den beschriebenen Versuchsbedingungen nicht sinnvollerweise erfolgen, da nicht immer die maximale Effektstärke von LSD, Ergotamin bzw. Ergometrin unter dem Einfluss der verwendeten Konzentrationen erreicht wurde. Dies ist aber Voraussetzung für die Angabe eines  $EC_{50}$ -Wertes, um diesen nicht fälschlicherweise zu niedrig zu errechnen (Jiang and Kopp-Schneider 2015).

Natürlich ist das hier verwendete Modell transgener Mauserzvorhofpräparate keinesfalls vorbehaltlos auf die dazugehörigen Ventrikel (Baumann et al. 1982) oder gar die letztendlich interessierenden Verhältnisse im menschlichen Herzen übertragbar. Jedoch wurden in einer parallelen Dissertation mittels Langendorff-Versuchen an isoliert perfundierten transgenen Mauserzen die Wirkungen von LSD, Ergotamin und Ergometrin auf  $hH_2$ -Rezeptoren und  $h5-HT_4$ -Rezeptoren im Ventrikel der Maus untersucht und publiziert. Diese stimmen mit den hier dargestellten Beobachtungen am Vorhofpräparat der Maus insofern überein, als die drei Substanzen an den Herzen der beiden transgenen Mausstämmen einen positiv inotropen Effekt verursachten, der bei vergleichbaren WT-Hezen fehlte (Gergs et al. 2024; Jacob et al. 2023a; Jacob et al. 2023b). Die physiologische Herzfrequenz sowie die entstehenden Kräfte und deren Dynamik im Herzen von Maus und Mensch sind keineswegs vergleichbar: So ist die Ruhfrequenz

im Mausherzen mit ca. 300 bpm etwa um den Faktor fünf größer als im menschlichen Körper. Dazu kommen methodische Ungenauigkeiten: Das prinzipielle Vorgehen bei der Gewinnung der Vorhofpräparate war zwar standardmäßig gleich, jedoch erfolgte die Präparation letztlich stets individuell an die vorgefundene Anatomie angepasst, wobei natürlich auch unvermeidbare Fehler des Präparators nicht außer Acht gelassen werden dürfen, insbesondere was die Erfahrung und Geschick erfordernde Präparation des Sinusknotens betrifft. Den realen Bedingungen eines unter physiologischen Verhältnissen arbeitenden Herzens in einem lebenden Organismus kann sich mit dieser Methode bestenfalls angenähert werden. Zusammenfassend sind mit den beschriebenen Methoden nur grundlegende Aussagen über das Vorhandensein einer Wirkung am untersuchten Rezeptor sowie eine rudimentäre Charakterisierung desselben möglich.

Es kann auf Grundlage dieser Arbeit keine Aussage darüber getroffen werden, welche chemischen Strukturen der Moleküle von LSD, Ergotamin und Ergometrin mit dem H<sub>2</sub>- bzw. 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor interagieren. Hierzu wären kristallographische Analysen nötig.

## 5.6 Kontraktionsversuche menschlicher Präparate

Menschliche Kardiomyozyten enthalten neben vielen weiteren Rezeptoren sowohl hH<sub>2</sub>- als auch h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren (Baumann et al. 1982; Baumann et al. 1983; Baumann et al. 1984) (Naoyuki Matsuda et al. 2004). Nach Vorbehandlung mit Cilostamid bewirkten LSD, Ergotamin und Ergometrin alle einen positiv inotropen Effekt (Gergs et al. 2024; Jacob et al. 2023a; Jacob et al. 2023b). Dieser war jedoch deutlich schwächer ausgeprägt als bei den Kontraktionsversuchen am Mauspräparat. Da die menschlichen Präparate natürlich beide interessierenden Rezeptoren exprimieren und sich die Rezeptordichten sehr wahrscheinlich deutlich unterscheiden, kann nur aus der vorhandenen oder fehlenden Wirkung der jeweiligen Rezeptorantagonisten auf die Involvierung eines der oder beider Rezeptoren geschlossen werden (Bongrani et al. 1979; Kaumann et al. 1990). Der 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptorantagonist führte nur bei LSD, nicht jedoch bei Ergotamin oder Ergometrin zu einer Umkehr des positiv inotropen Effekts der zuvor applizierten Substanz (Gergs et al. 2024; Jacob et al. 2023a; Jacob et al. 2023b). Ergo scheinen 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren am menschlichen rechten Vorhof eher keine oder nur eine untergeordnete Rolle bei der Vermittlung inotroper Effekte von Ergotamin und Ergometrin zu spielen, was an einer geringeren Rezeptordichte, dem (zuvor in Versuchen an der Maus festgestellten) nur partiellen bzw. fehlenden Agonismus der Substanzen an diesem Rezeptor, oder einer Kombination aus Beidem liegen mag (Jacob et al. 2023b). So weiß man, daß die mRNA für den h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor in

den entsprechenden transgenen Kardiomyozyten der Maus ca. 1000fach überexprimiert wird (Neumann et al. 2021b), sodass potentielle Wirkungen über diesen Rezeptor deutlich übersteigert zum Ausdruck kommen, wohingegen in menschlichen Kardiomyozyten kaum 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren bzw. deren mRNA nachzuweisen sind (Kaumann and Levy 2006). H<sub>2</sub>-Rezeptoren hingegen kommen im menschlichen Herzen in höherer Dichte vor (Baumann et al. 1982; Baumann et al. 1983; Baumann et al. 1984), (Naoyuki Matsuda et al. 2004). Jedoch ist bekannt, daß in erkrankten menschlichen Herzen die Menge an mRNA für den 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor ansteigt (Brattelid et al. 2004). Somit könnten die Ergebnisse bei herzinsuffizienten Patienten anders als bei gesunden Menschen sein. Zumindest bei der Wirkung von LSD scheint der 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor jedoch mindestens teilweise an der Entstehung des positiv inotropen Effektes beteiligt zu sein (Gergs et al. 2024). Zusätzlich appliziertes Cimetidin hingegen bewirkte bei allen drei Substanzen eine Umkehr der vorherigen inotropen Effekte (Bongrani et al. 1979; Brattelid et al. 2004; Gergs et al. 2024; Jacob et al. 2023a; Jacob et al. 2023b). Zusammenfassend kann man sagen, daß in jedem Fall H<sub>2</sub>-Rezeptoren und in einigen Fällen zusätzlich auch 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren an der Vermittlung der Effekte von LSD, Ergotamin und Ergometrin beteiligt sind.

Aufgrund der zuvor beschriebenen begrenzten Übertragbarkeit von Versuchen am Mauserzen bedarf es Versuche am menschlichen Herzen, um sich der Situation im lebenden menschlichen Organismus weiter anzunähern. Ersatzweise konnte nur auf Vorhofgewebe zurückgegriffen werden, das im Rahmen von Bypass-Operationen standardmäßig und somit ohne zusätzliches Risiko für den Spender entnommen wird. Die Rezeptorausstattung der Vorhofkardiomyozyten muss aber nicht unbedingt vergleichbar mit denen des Ventrikels sein, was beim Kaninchen bereits gezeigt wurde (Hattori et al. 1988; Hattori et al. 1990; Hattori et al. 1991).

Mangels erhaltenen Sinusknotens und Reizleitungssystems in den menschlichen Proben konnten nur inotrope Effekte bestimmt werden, eine Aussage über mögliche chronotrope Effekte ist somit per se ausgeschlossen (Jacob et al. 2023b).

Zudem stammen alle untersuchten menschlichen Proben von Patienten mit gestellter Indikation für eine koronare Revaskularisierung, sodass es sich um ein älteres Patientenkollektiv mit multiplen Vorerkrankungen, eingeschränkter kardialer Pumpfunktion und langfristiger Medikamenteneinnahme handelt (Gergs et al. 2024; Jacob et al. 2023a; Jacob et al. 2023b). Es kann daher nicht davon ausgegangen werden, daß sich die gewonnenen Erkenntnisse ohne Weiteres auf die gesunde Grundgesamtheit übertragen lassen.

Ohne Vorbehandlung mit Cilostamid ließen sich weder mit LSD, Ergotamin noch mit Ergometrin positiv chronotrope Effekte erkennen (Gergs et al. 2024; Jacob et al. 2023a; Jacob et al. 2023b).

Dies mag an einer im Vergleich zu transgenen Mauspräparaten deutlich geringeren Rezeptordichte liegen. Die Vorbehandlung mit Cilostamid entspricht natürlich nicht der Realität im lebenden menschlichen Organismus, sodass die hier beobachteten Effekte als deutlich übersteigert anzusehen sind. Jedenfalls unterstützt die Steigerung des Effekts durch Inhibition der Phosphodiesterase 3 die These, daß cAMP die Vermittlung des Effektes von LSD, Ergotamin und Ergometrin bewirke (Brattelid et al. 2004).

Natürlich unterlagen auch die menschlichen Präparate dem Vorgang der Präparation mit allen dazugehörigen zuvor beschriebenen möglichen Fehlerquellen: So unterschieden sich die menschlichen Vorhofpräparate teilweise erheblich in ihrer initialen Kontraktionskraft und einige Versuche konnten aufgrund Versagens der Präparate nicht oder nur teilweise ausgewertet werden.

### 5.7 Proteinanalyse

10  $\mu$ M LSD, Ergotamin oder Ergometrin führten in hH<sub>2</sub>-Rezeptor-transgenen Kardiomyozyten zu einem gesteigerten Phosphorylierungsstand von Phospholamban an Serin 16, nicht jedoch in gleich behandelten WT-Proben (Gergs et al. 2024; Jacob et al. 2023a; Jacob et al. 2023b). Dies passt zu der Hypothese, daß LSD, Ergotamin und Ergometrin Agonisten des hH<sub>2</sub>-Rezeptors seien und als solche über eine Aktivierung der Adenylatcyclase und der PKA die Phosphorylierung von Phospholamban an Serin 16 bewirken (Simmerman et al. 1986). Das gleiche gilt für 10  $\mu$ M LSD oder Ergotamin an h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen Proben, jedoch war der Phosphorylierungsstand des Phospholambans hier etwas geringer als in identisch behandelten hH<sub>2</sub>-Rezeptor-transgenen Proben, aber immer noch deutlich höher als in WT-Proben (Gergs et al. 2024; Jacob et al. 2023b). Dies steht in Einklang mit dem Gedanken, daß LSD und Ergotamin partielle Agonisten des h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptors seien und als solche zwar über die Adenylatcyclase und PKA die Phosphorylierung von PLB16 bewirken (Christ et al. 2014), jedoch zu einem geringeren Ausmaß als dies bei vollständiger Aktivierung des h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptors bzw. des hH<sub>2</sub>-Rezeptors der Fall wäre. Phospholamban kann dabei als beispielhaftes Substrat der Proteinkinase A als Teil des dem H<sub>2</sub>- bzw. 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor nachgeschalteten Signalweges angesehen werden (Gergs et al. 2024; H K Simmerman et al. 1986; Jacob et al. 2023a; Jacob et al. 2023b). Dies ist ein Indiz, jedoch natürlich kein Beweis für die Aktivierung dieses Signalweges. Die Untersuchung des Phosphorylierungsstandes weiterer Substrate der PKA könnte diese Hypothese weiter stützen.

Interessant wäre im Rahme weiterer Untersuchungen natürlich darüber hinaus die Proteinanalyse in menschlichen Proben.

## 5.8 Fazit

LSD, Ergotamin und Ergometrin wirken in Vorhofpräparaten der Maus als volle Agonisten an hH<sub>2</sub>-Rezeptoren. Sie bewirken dadurch positiv inotrope und chronotrope Effekte und steigern die Konzentration phosphorylierten Phospholambans.

LSD und Ergotamin, aber nicht Ergometrin wirken in Vorhofpräparaten der Maus als partielle Agonisten an h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren. Sie entfalten dadurch positiv inotrope und chronotrope Effekte, welche aber nicht dem vollständigen Effekt von Serotonin gleichkommen, und steigern die Konzentration phosphorylierten Phospholambans.

LSD, Ergotamin und Ergometrin wirken in menschlichen rechten Vorhofpräparaten als Agonisten an hH<sub>2</sub>-Rezeptoren und teilweise auch an h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren und bewirken dadurch einen positiv inotropen Effekt in mit Cilostamid vorbehandelten menschlichen rechten Vorhofpräparaten.

Tabelle 2: Vereinfachte Übersicht über das agonistische Verhalten von LSD, Ergotamin und Ergometrin an hH<sub>2</sub>-Rezeptoren und h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren im Modell isolierter Vorhofpräparate der entsprechend transgenen Maus (%-HT4-Tg oder H2-TG)

	hH <sub>2</sub> -Rezeptor	h-HT <sub>4</sub> -Rezeptor
LSD	++	+
Ergotamin	++	+
Ergometrin	++	-

++ voller Agonist    + partieller Agonist    - kein oder nur sehr schwacher Agonist

Tabelle 3: Vereinfachte Übersicht über das agonistische Verhalten von LSD, Ergotamin und Ergometrin an hH<sub>2</sub>-Rezeptoren und h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren im Modell isolierter Vorhofpräparate des Menschen

	hH <sub>2</sub> -Rezeptor	h-HT <sub>4</sub> -Rezeptor
LSD	++	+
Ergotamin	++	-
Ergometrin	++	-

++ voller Agonist    + schwacher Agonist    - kein oder nur sehr schwacher Agonist

## 5.9 Klinische Bedeutung und Ausblick

Ein relevantes Ziel der Forschung zur Wirkung von LSD, Ergotamin und Ergometrin sowie den beteiligten Rezeptoren ist es, Komplikationen, die im Rahmen der Behandlung oder natürlich auch missbräuchlichen Konsums dieser Substanzen auftreten können, effektiver behandeln zu können. LSD wird zwar aktuell nicht zu medizinischen Zwecken verwendet, es existieren jedoch Bestrebungen, es als Psychopharmakon zur Behandlung von beispielsweise affektiven Störungen

einzusetzen (Gasser et al. 2015). Ergotamin wird in vielen Ländern noch immer zur Migränetherapie verwendet (Ngo and Tadi 2023; Nguyen et al. 2022). Ergometrin (bzw. sein Derivat Methylergometrin) wird in einigen Ländern zur Diagnostik der Prinzmetal-Angina sowie in der Vergangenheit zur postpartalen Steigerung des Uterotonus im Rahmen der Geburtshilfe (Selva et al., 1989). Weiterhin können alle drei Substanzen missbräuchlich konsumiert werden bzw. kann es unbeabsichtigterweise zu Intoxikationen (Schlag et al. 2022) kommen. Kardiale Symptome hauptsächlich im Sinne von tachykarden Herzrhythmusstörungen sind dabei beschrieben worden (Cortell et al. 2010; Leonard et al. 2018; Passie et al. 2008; Song et al. 2018) und können eine lebensbedrohliche Komplikation darstellen. Es sei jedoch angemerkt, daß die im Rahmen therapeutischen Einsatzes erreichten Plasmaspiegel erheblich geringer sind als die in den Kontraktionversuchen simulierten Konzentrationen: so wurden in Studien zur Pharmakokinetik von Ergotamin maximale therapeutische Plasmakonzentrationen von 0,69 nM erreicht (Sanders et al. 1986), weniger als 0,1% der bei den Versuchen angewandten Maximalkonzentration von 10 µM. Bei Einnahme von 100 µg LSD werden ebenfalls nur Plasmakonzentrationen von 4 nM erreicht, wobei jedoch teilweise bis zu der fünffachen Menge dessen konsumiert werden (Dolder et al. 2018; Holze et al. 2019; Holze et al. 2020; Martin et al. 2013; McCarron et al. 1990). Für Ergometrin sind vergleichbare Plasmaspiegel um 4 nM beschrieben worden (Groot et al. 1993). Im Rahmen von Intoxikationen können aber natürlich wesentlich höhere Plasmaspiegel erreicht werden (Stange et al. 2008). Weiterhin könnten Medikamenteninteraktionen (z.B. durch HIV-Proteasehemmer) über die Hemmung des körpereigenen Metabolismus von Ergot-Derivaten über hepatische Cytochrome zu höheren Plasmaspiegeln führen (Luethi et al. 2019; Mohamedi et al. 2021) ebenso wie genetische Polymorphismen des Cytochrom P450-Systems, sodass das Erreichen funktionell relevanter Konzentrationen im Plasma der untersuchten Substanzen letztlich doch nicht unplausibel erscheint. So wird beispielsweise Ergotamin durch CYP2D6 und Ergometrin durch CYP3A4 metabolisiert (Moubarak et al.). Tatsächlich sind Fälle von Herzrhythmusstörungen und koronaren Durchblutungsstörungen bei Patienten beschrieben, die Ergotamin zur Migränetherapie eingenommen hatten (Okutucu et al. 2012; Velez Roa et al. 1999). Die erhobenen Daten legen nahe, daß dieser Effekt mindestens teilweise über H<sub>2</sub>-Rezeptoren und möglicherweise auch über 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren getragen wird, sodass im Falle von kardialen Symptomen bei Intoxikationen die Gabe von Antagonisten dieser beiden Rezeptoren sinnvoll erscheint. Aufgrund der zuvor beschriebenen Limitationen der Möglichkeiten der hier beschriebenen Versuche ist vorher jedoch die weitere gründliche Untersuchung und ggf. Bestätigung dieser Ergebnisse am klinischen Modell nötig. Dabei sind insbesondere Erkenntnisse



über ventrikuläre Wirkungen von Interesse. Es ist daher vorzuschlagen, diesen Ansatz im Rahmen klinischer Studien weiter zu verfolgen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Neumann J, Hofmann B, Gergs U (2017) Production and Function of Serotonin in Cardiac Cells
- Angus JA, Black JW (1980) Pharmacological assay of cardiac H<sub>2</sub>-receptor blockade by amitriptyline and lysergic acid diethylamide. *Circ Res* 46:164-9
- Bartlet AI (1963) The action of histamine on the isolated heart. *Br J Pharmacol Chemother* 21:450-461. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1963.tb02013.x>
- Baumann G, Felix SB, Schrader J, Heidecke CD, Riess G, Erhardt WD, Ludwig L, Loher U, Sebening F, Blömer H (1981) Cardiac contractile and metabolic effects mediated via the myocardial H<sub>2</sub>-receptor adenylate cyclase system. Characterization of two new specific H<sub>2</sub>-receptor agonists, impromidine and dimaprit, in the guinea pig and human myocardium. *Res Exp Med (Berl)* 179:81-98. <https://doi.org/10.1007/BF01852128>
- 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 H<sub>2</sub>-agonistic compounds--in the surviving, catecholamine-insensitive myocardium after coronary occlusion. *J Cardiovasc Pharmacol* 4:542-553. <https://doi.org/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 H<sub>2</sub>-receptor agonist impromidine in human myocardium from patients with heart failure due to mitral and aortic valve disease. *J Cardiovasc Pharmacol* 5:618-625. <https://doi.org/10.1097/00005344-198307000-00017>
- Baumann G, Permanetter B, Wirtzfeld A (1984) Possible value of H<sub>2</sub>-receptor agonists for treatment of catecholamine-insensitive congestive heart failure. *Pharmacol Ther* 24:165-177. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(84\)90033-0](https://doi.org/10.1016/0163-7258(84)90033-0)
- Bongrani S, Di Donato M, Visioli O, Mantovani P (1979) Effect of ergometrine on contractile force of guinea-pig isolated heart: antagonism by cimetidine. *Agents Actions* 9:15-17. <https://doi.org/10.1007/BF02024090>
- Brattelid T, Qvigstad E, Lynham JA, Molenaar P, Aass H, Geiran O, Skomedal T, Osnes J-B, Levy FO, Kaumann AJ (2004) Functional serotonin 5-HT<sub>4</sub> receptors in porcine and human ventricular myocardium with increased 5-HT<sub>4</sub> mRNA in heart failure. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 370:157-166. <https://doi.org/10.1007/s00210-004-0963-0>
- Cervellin G, Longobardi U, Lippi G (2020) One holy man, one eponym, three distinct diseases. St. Anthony's fire revisited. *Acta Biomed* 92:e2021008. <https://doi.org/10.23750/abm.v92i1.9015>
- Christ T, Rozmaritsa N, Engel A, Berk E, Knaut M, Metzner K, Canteras M, Ravens U, Kaumann A (2014) Arrhythmias, elicited by catecholamines and serotonin, vanish in human chronic atrial fibrillation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:11193-11198. <https://doi.org/10.1073/pnas.1324132111>
- Cortell A, Marcos-Alberca P, Almería C, Rodrigo JL, Pérez-Isla L, Macaya C, Zamorano JL (2010) Ergonovine stress echocardiography: Recent experience and safety in our centre. *World J Cardiol* 2:437-442. <https://doi.org/10.4330/wjc.v2.i12.437>
- Cortijo J, Martí-Cabrera M, Bernabeu E, Domènech T, Bou J, Fernández AG, Beleta J, Palacios JM, Morcillo EJ (1997) Characterization of 5-HT receptors on human pulmonary artery and vein: functional and binding studies. *Br J Pharmacol* 122:1455-1463. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701509>

- Dai S (1976) A study of the actions of histamine on the isolated rat heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 3:359–367. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1976.tb00612.x>
- Dolder PC, Liechti ME, Rentsch KM (2018) Development and validation of an LC-MS/MS method to quantify lysergic acid diethylamide (LSD), iso-LSD, 2-oxo-3-hydroxy-LSD, and nor-LSD and identify novel metabolites in plasma samples in a controlled clinical trial. *J Clin Lab Anal* 32. <https://doi.org/10.1002/jcla.22265>
- Duan W, Cao D, Wang S, Cheng J (2024) Serotonin 2A Receptor (5-HT<sub>2A</sub>R) Agonists: Psychedelics and Non-Hallucinogenic Analogues as Emerging Antidepressants. *Chem Rev* 124:124–163. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.3c00375>
- Eckel L, Gristwood RW, Nawrath H, Owen DA, Satter P (1982) Inotropic and electrophysiological effects of histamine on human ventricular heart muscle. *J Physiol* 330:111–123. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1982.sp014332>
- Freedman NJ, Lefkowitz RJ (1996) Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent Prog Horm Res* 51:319-51; discussion 352-3
- Gasser P, Kirchner K, Passie T (2015) LSD-assisted psychotherapy for anxiety associated with a life-threatening disease: a qualitative study of acute and sustained subjective effects. *J Psychopharmacol* 29:57–68. <https://doi.org/10.1177/0269881114555249>
- Genovese A, Gross SS, Sakuma I, Levi R (1988) Adenosine promotes histamine H<sub>1</sub>-mediated negative chronotropic and inotropic effects on human atrial myocardium. *J Pharmacol Exp Ther* 247:844–849
- Gergs U, Baumann M, Böckler A, Buchwalow IB, Ebel H, Fabritz L, Hauptmann S, Keller N, Kirchhof P, Klöckner U, Pönicke K, Rueckschloss U, Schmitz W, Werner F, Neumann J (2010) Cardiac overexpression of the human 5-HT<sub>4</sub> receptor in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299:H788-98. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00691.2009>
- Gergs U, Böckler A, Ebel H, Hauptmann S, Keller N, Otto V, Pönicke K, Schmitz W, Neumann J (2013) Human 5-HT<sub>4</sub> receptor stimulation in atria of transgenic mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 386:357–367. <https://doi.org/10.1007/s00210-013-0831-x>
- Gergs U, 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 H<sub>2</sub> Receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 369:129–141. <https://doi.org/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 H<sub>2</sub>-Histamine Receptors in the Heart. *J Pharmacol Exp Ther* 374:479–488
- 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 H<sub>2</sub> Receptor Agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 379:223–234. <https://doi.org/10.1124/jpet.121.000822>
- Gergs U, Jacob H, Braekow P, Hofmann B, Pockes S, Humphrys LJ, Kirchhefer U, Fehse C, Neumann J (2024) Lysergic acid diethylamide stimulates cardiac human H<sub>2</sub> histamine and cardiac human 5-HT<sub>4</sub>-serotonin receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 397:221–236. <https://doi.org/10.1007/s00210-023-02591-6>
- Gregorio D de, Comai S, Posa L, Gobbi G (2016) d-Lysergic Acid Diethylamide (LSD) as a Model of Psychosis: Mechanism of Action and Pharmacology. *Int J Mol Sci* 17. <https://doi.org/10.3390/ijms17111953>

- Groot AN de, Vree TB, Hekster YA, Baars AM, van den Biggelaar-Martea M, van Dongen PW (1993) High-performance liquid chromatography of ergometrine and preliminary pharmacokinetics in plasma of men. *J Chromatogr* 613:158–161. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(93\)80210-u](https://doi.org/10.1016/0378-4347(93)80210-u)
- Gulbranson SH, Mock RE, Wolfrey JD (2002) Possible ergotamine-caffeine-associated delirium. *Pharmacotherapy* 22:126–129. <https://doi.org/10.1592/phco.22.1.126.33500>
- Guo ZG, Levi R, Graver LM, Robertson DA, Gay WA, JR (1984) Inotropic effects of histamine in human myocardium: differentiation between positive and negative components. *J Cardiovasc Pharmacol* 6:1210–1215
- Simmerman H K, Collins J H, Theibert J L, Wegener A D, Jones L R (1986) Sequence analysis of phospholamban. Identification of phosphorylation sites and two major structural domains. *Journal of Biological Chemistry* 261:13333–13341. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)69309-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)69309-3)
- 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. *Eur J Pharmacol* 153:221–229. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(88\)90609-7](https://doi.org/10.1016/0014-2999(88)90609-7)
- Hattori Y, Nakaya H, Endou M, Kanno M (1990) Inotropic, electrophysiological and biochemical responses to histamine in rabbit papillary muscles: evidence for coexistence of H1- and H2-receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 253:250–256
- Hattori Y, Gando S, Endou M, Kanno M (1991) Characterization of histamine receptors modulating inotropic and biochemical activities in rabbit left atria. *Eur J Pharmacol* 196:29–36. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(91\)90405-f](https://doi.org/10.1016/0014-2999(91)90405-f)
- Holze F, Duthaler U, Vizeli P, Müller F, Borgwardt S, Liechti ME (2019) Pharmacokinetics and subjective effects of a novel oral LSD formulation in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 85:1474–1483. <https://doi.org/10.1111/bcp.13918>
- Holze F, Vizeli P, Müller F, Ley L, Duerig R, Varghese N, Eckert A, Borgwardt S, Liechti ME (2020) Distinct acute effects of LSD, MDMA, and D-amphetamine in healthy subjects. *Neuropsychopharmacology* 45:462–471. <https://doi.org/10.1038/s41386-019-0569-3>
- Huybrechts B, Malysheva SV, Masquelier J (2021) A Targeted UHPLC-MS/MS Method Validated for the Quantification of Ergot Alkaloids in Cereal-Based Baby Food from the Belgian Market. *Toxins (Basel)* 13. <https://doi.org/10.3390/toxins13080531>
- Jacob H, Braekow P, Hofmann B, Kirchhefer U, Forster L, Mönnich D, Humphrys LJ, Pockes S, Neumann J, Gergs U (2023a) Ergometrine stimulates histamine H(2) receptors in the isolated human atrium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 396:3809–3822. <https://doi.org/10.1007/s00210-023-02573-8>
- Jacob H, Braekow P, Schwarz R, Höhm C, Kirchhefer U, Hofmann B, Neumann J, Gergs U (2023b) Ergotamine Stimulates Human 5-HT(4)-Serotonin Receptors and Human H(2)-Histamine Receptors in the Heart. *Int J Mol Sci* 24. <https://doi.org/10.3390/ijms24054749>
- Jamieson CS, Misa J, Tang Y, Billingsley JM (2021) Biosynthesis and synthetic biology of psychoactive natural products. *Chem Soc Rev* 50:6950–7008. <https://doi.org/10.1039/d1cs00065a>
- Jiang X, Kopp-Schneider A (2015) Statistical strategies for averaging EC50 from multiple dose-response experiments. *Arch Toxicol* 89:2119–2127. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1350-3>
- Kaumann AJ, Sanders L, Brown AM, Murray KJ, Brown MJ (1990) A 5-hydroxytryptamine receptor in human atrium. *Br J Pharmacol* 100:879–885

- Kaumann AJ, Levy FO (2006) 5-hydroxytryptamine receptors in the human cardiovascular system. *Pharmacol Ther* 111:674–706. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.12.004>
- Khonsary SA (2023) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. *Surg Neurol Int* 14. [https://doi.org/10.25259/SNI\\_184\\_2023](https://doi.org/10.25259/SNI_184_2023)
- Kim J, Washio T, Yamagishi M, Yasumura Y, Nakatani S, Hashimura K, Hanatani A, Komamura K, Miyatake K, Kitamura S, Tomoike H, Kitakaze M (2004) A Novel Data Mining Approach to the Identification of Effective Drugs or Combinations for Targeted Endpoints—Application to Chronic Heart Failure as a New Form of Evidence-based Medicine. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 18:483–489. <https://doi.org/10.1007/s10557-004-6226-y>
- Kirchhefer U, Baba HA, Kobayashi YM, Jones LR, Schmitz W, Neumann J (2002) Altered function in atrium of transgenic mice overexpressing triadin 1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H1334-43. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00937.2001>
- Laher I, McNeill JH (1980a) Effects of histamine in the isolated kitten heart. *Can J Physiol Pharmacol* 58:1256–1261. <https://doi.org/10.1139/y80-192>
- Laher I, McNeill JH (1980b) Effects of histamine on rat isolated atria. *Can J Physiol Pharmacol* 58:1114–1116. <https://doi.org/10.1139/y80-166>
- Leonard JB, Anderson B, Klein-Schwartz W (2018) Does getting high hurt? Characterization of cases of LSD and psilocybin-containing mushroom exposures to national poison centers between 2000 and 2016. *J Psychopharmacol* 32:1286–1294. <https://doi.org/10.1177/0269881118793086>
- Liegl CA, McGrath MA (2016) Ergotism: Case Report and Review of the Literature. *Int J Angiol* 25:e8-e11. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1376397>
- Luethi D, Hoener MC, Krähenbühl S, Liechti ME, Duthaler U (2019) Cytochrome P450 enzymes contribute to the metabolism of LSD to nor-LSD and 2-oxo-3-hydroxy-LSD: Implications for clinical LSD use. *Biochem Pharmacol* 164:129–138. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.04.013>
- Martin R, Schürenkamp J, Gasse A, Pfeiffer H, Köhler H (2013) Determination of psilocin, bufotenine, LSD and its metabolites in serum, plasma and urine by SPE-LC-MS/MS. *Int J Legal Med* 127:593–601. <https://doi.org/10.1007/s00414-012-0796-1>
- McCarron MM, Walberg CB, Baselt RC (1990) Confirmation of LSD intoxication by analysis of serum and urine. *J Anal Toxicol* 14:165–167. <https://doi.org/10.1093/jat/14.3.165>
- McCorvy JD, Roth BL (2015) Structure and function of serotonin G protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 150:129–142. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.01.009>
- Mohamedi N, Mirault T, Durivage A, Di Primio M, Khider L, Detriche G, El Batti S, Sapoval M, Messas E, Goudot G (2021) Ergotism with acute limb ischemia, provoked by HIV protease inhibitors interaction with ergotamine, rescued by multisite transluminal balloon angioplasty. *J Med Vasc* 46:13–21. <https://doi.org/10.1016/j.jdmv.2020.12.002>
- Moubarak AS, Rosenkrans CF, Johnson ZB Modulation of cytochrome P450 metabolism by ergonovine and dihydroergotamine. *Veterinary and human toxicology* 45 1:6–9
- Naoyuki Matsuda, Subrina Jesmin, Yoshika Takahashi, Eiichiro Hatta, Masanobu Kobayashi, Kazuto Matsuyama, Nozomi Kawakami, Ichiro Sakuma, Satoshi Gando, Hiyoyuki Fukui, Yuichi Hattori, Roberto Levi (2004) Histamine H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> Receptor Gene and Protein Levels Are Differentially Expressed in the Hearts of Rodents and Humans. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 309:786. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.063065>

- Neumann J, Boknik P, DePaoli-Roach AA, Field LJ, Rockman HA, Kobayashi YM, Kelley JS, Jones LR (1998) Targeted overexpression of phospholamban to mouse atrium depresses Ca<sup>2+</sup> transport and contractility. *J Mol Cell Cardiol* 30:1991–2002. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1998.0760>
- Neumann J, Käufler B, Gergs U (2019) Which phosphodiesterase can decrease cardiac effects of 5-HT(4) receptor activation in transgenic mice? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 392:991–1004. <https://doi.org/10.1007/s00210-019-01653-y>
- Neumann J, Binter MB, Fehse C, Marušáková M, Büxel ML, Kirchhefer U, Hofmann B, Gergs U (2021a) Amitriptyline functionally antagonizes cardiac H<sub>2</sub> histamine receptors in transgenic mice and human atria. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 394:1251–1262. <https://doi.org/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 H(2)-receptors and 5HT(4)-receptors in atrial tissues isolated from double transgenic mice and from human patients. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 394:2401–2418. <https://doi.org/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. *Front Pharmacol* 12:582916. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.582916>
- Neumann J, Voss R, Laufs U, Werner C, Gergs U (2021d) Phosphodiesterases 2, 3 and 4 can decrease cardiac effects of H(2)-histamine-receptor activation in isolated atria of transgenic mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 394:1215–1229. <https://doi.org/10.1007/s00210-021-02052-y>
- Neumann J, Kirchhefer U, Dhein S, Hofmann B, Gergs U (2021e) The Roles of Cardiovascular H(2)-Histamine Receptors Under Normal and Pathophysiological Conditions. *Front Pharmacol* 12:732842. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.732842>
- Neumann J, Hofmann B, Dhein S, Gergs U (2023) Cardiac Roles of Serotonin (5-HT) and 5-HT-Receptors in Health and Disease. *Int J Mol Sci* 24. <https://doi.org/10.3390/ijms24054765>
- Neumann J, Dhein S, Kirchhefer U, Hofmann B, Gergs U (2024) Effects of hallucinogenic drugs on the human heart. *Front Pharmacol* 15:1334218. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1334218>
- Ngo M, Tadi P (2023) Ergotamine/Caffeine. In: *StatPearls*, Treasure Island (FL)
- Nguyen JL, Munshi K, Peasah SK, Swart ECS, Kohli M, Henderson R, Good CB (2022) Trends in utilization and costs of migraine medications, 2017-2020. *J Headache Pain* 23:111. <https://doi.org/10.1186/s10194-022-01476-y>
- Okutucu S, Karakulak UN, Kabakcı G, Aytemir K (2012) An unusual cause of chest pain: Acute coronary syndrome following administration of ergotamine tartrate. *Exp Clin Cardiol* 17:43–44
- Ott J, Neely P (1980) Entheogenic (hallucinogenic) effects of methylergonovine. *J Psychedelic Drugs* 12:165–166. <https://doi.org/10.1080/02791072.1980.10471568>
- 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. *Pharmacol Rev* 67:601–655. <https://doi.org/10.1124/pr.114.010249>
- Passie T, Halpern JH, Stichtenoth DO, Emrich HM, Hintzen A (2008) The pharmacology of lysergic acid diethylamide: a review. *CNS Neurosci Ther* 14:295–314. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2008.00059.x>
- Preller KH, Herdener M, Pokorny T, Planzer A, Kraehenmann R, Stämpfli P, Liechti ME, Seifritz E, Vollenweider FX (2017) The Fabric of Meaning and Subjective Effects in LSD-Induced States Depend

on Serotonin 2A Receptor Activation. *Curr Biol* 27:451–457. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.12.030>.

- Rabinowitz B, Chuck L, Kligerman M, Parmley WW (1975) Positive inotropic effects of methoxamine: evidence for alpha-adrenergic receptors in ventricular myocardium. *Am J Physiol* 229:582–585. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1975.229.3.582>
- 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 H(1)-Histamine Receptor on the Heart. *J Pharmacol Exp Ther* 389:174–185. <https://doi.org/10.1124/jpet.123.002060>
- Roth BL, Baner K, Westkaemper R, Siebert D, Rice KC, Steinberg S, Ernsberger P, Rothman RB (2002) Salvinorin A: a potent naturally occurring nonnitrogenous kappa opioid selective agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11934–11939. <https://doi.org/10.1073/pnas.182234399>
- 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 Schmiedebergs Arch Pharmacol* 353:661–670. <https://doi.org/10.1007/BF00167185>
- Sanders SW, Haering N, Mosberg H, Jaeger H (1986) Pharmacokinetics of ergotamine in healthy volunteers following oral and rectal dosing. *European Journal of Clinical Pharmacology* 30:331–334. <https://doi.org/10.1007/BF00541538>
- Schlag AK, Aday J, Salam I, Neill JC, Nutt DJ (2022) Adverse effects of psychedelics: From anecdotes and misinformation to systematic science. *J Psychopharmacol* 36:258–272. <https://doi.org/10.1177/02698811211069100>
- Silberstein SD, McCrory DC (2003a) Ergotamine and dihydroergotamine: history, pharmacology, and efficacy. *Headache* 43:144–166. <https://doi.org/10.1046/j.1526-4610.2003.03034.x>
- Silberstein SD, McCrory DC (2003b) Ergotamine and dihydroergotamine: history, pharmacology, and efficacy. *Headache* 43:144–166. <https://doi.org/10.1046/j.1526-4610.2003.03034.x>
- Smit MJ, Leurs R, Shukrula SR, Bast A, Timmerman H (1994) Rapid desensitization of the histamine H2 receptor on the human monocytic cell line U937. *Eur J Pharmacol* 288:17–25. [https://doi.org/10.1016/0922-4106\(94\)90005-1](https://doi.org/10.1016/0922-4106(94)90005-1)
- Song YJ, Ha SJ, Lee DS, Bang WD, Shin DG, Woo Y, Cheong S, Yoo SY (2018) Ergonovine Stress Echocardiography for the Diagnosis of Vasospastic Angina and Its Prognostic Implications in 3,094 Consecutive Patients. *Korean Circ J* 48:906–916. <https://doi.org/10.4070/kcj.2017.0395>
- Stange K, Pohlmeier H, Lübbesmeyer A, Gumbinger G, Schmitz W, Baumgart P (2008) Vaskulärer Ergotismus durch Getreidestaubinhalation. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 123:1547–1550
- Thoren FB, Aurelius J, Martner A (2011) Antitumor properties of histamine in vivo. *Nat Med* 17:537; author reply 537-8. <https://doi.org/10.1038/nm0511-537a>
- Velez Roa S, Preumont N, Mols P, Stoupel E, Renard M (1999) Ventricular fibrillation secondary to ergotamine in a healthy young woman. *Acta Cardiol* 54:283–286
- Vigorito C, Russo P, Picotti GB, Chiariello M, Poto S, Marone G (1983) Cardiovascular effects of histamine infusion in man. *J Cardiovasc Pharmacol* 5:531–537. <https://doi.org/10.1097/00005344-198307000-00004>
- Wang C, Jiang Y, Ma J, Wu H, Wacker D, Katritch V, Han GW, Liu W, Huang X-P, Vardy E, McCorvy JD, Gao X, Zhou XE, Melcher K, Zhang C, Bai F, Yang H, Yang L, Jiang H, Roth BL, Cherezov V, Stevens RC, Xu HE

(2013) Structural basis for molecular recognition at serotonin receptors. *Science* 340:610–614. <https://doi.org/10.1126/science.1232807>

Wellner-Kienitz MC, Bender K, Meyer T, Pott L (2003) Coupling to Gs and G(q/11) of histamine H2 receptors heterologously expressed in adult rat atrial myocytes. *Biochim Biophys Acta* 1642:67–77. [https://doi.org/10.1016/s0167-4889\(03\)00101-0](https://doi.org/10.1016/s0167-4889(03)00101-0)

Werner Flacke, D. Atanacković, R. A. Gillis, M. H. Alper (1967) THE ACTIONS OF HISTAMINE ON THE MAMMALIAN HEART. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 155:271

Zerkowski H-R, Broede A, Kunde K, Hillemann S, Schäfer E, Vogelsang M, Michel MC, Brodde O-E (1993) Comparison of the positive inotropic effects of serotonin, histamine, angiotensin II, endothelin and isoprenaline in the isolated human right atrium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 347:347–352. <https://doi.org/10.1007/BF00165383>



## 7. Thesen

1. LSD, Ergotamin und Ergometrin wirken an isolierten Vorhofpräparaten transgener Mausmodelle als Agonisten am menschlichen H<sub>2</sub>-Rezeptor und bedingen dadurch positiv inotrope und chronotrope Effekte.
2. Diese Effekte werden durch den H<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten Cimetidin aufgehoben.
3. LSD, Ergotamin und Ergometrin wirken an isolierten Vorhofpräparaten transgener Mausmodellen in unterschiedlicher Stärke als Agonisten am menschlichen 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor und bedingen dadurch positiv inotrope und chronotrope Effekte. LSD und Ergotamin haben dabei einen stärkeren agonistischen Effekt als Ergometrin.
4. Diese Effekte sind reversibel durch den 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptorantagonisten Tropisetron.
5. LSD, Ergotamin und Ergometrin führen in hH<sub>2</sub>-Rezeptor transgenen und h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor transgenen Mausvorhofpräparaten zu einem Anstieg des Phosphorylierungszustandes von Phospholamban.
6. LSD, Ergotamin und Ergometrin führen an menschlichen rechten Vorhofpräparaten zu einem positiv inotropen Effekt.
7. Dieser Effekt lässt sich durch Verwendung von Rezeptorantagonisten auf H<sub>2</sub>-Rezeptoren und/oder 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren rückführen. LSD, Ergotamin und Ergometrin sind in ihrer Wirkung auf hH<sub>2</sub>-Rezeptoren im menschlichen Vorhofpräparat vergleichbar, LSD wirkt möglicherweise stärker auf h5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren im menschlichen Vorhofpräparat als Ergotamin und Ergometrin.

## Anhang

### Bildquellen Abbildung 2:

- [https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:LSD\\_Structure\\_V2.svg](https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:LSD_Structure_V2.svg) (Stand 01.03.2025)
- [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/8f/Ergotamine\\_Structural\\_Formulae\\_V.1.svg/450px-Ergotamine\\_Structural\\_Formulae\\_V.1.svg.png#](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/8f/Ergotamine_Structural_Formulae_V.1.svg/450px-Ergotamine_Structural_Formulae_V.1.svg.png#) (Stand 01.03.2025)
- [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/48/Ergometrine\\_Structural\\_Formula\\_V1.svg/300px-Ergometrine\\_Structural\\_Formula\\_V1.svg.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/48/Ergometrine_Structural_Formula_V1.svg/300px-Ergometrine_Structural_Formula_V1.svg.png) (Stand 01.03.2025)
- [https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Histamin\\_-\\_Histamine.svg](https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Histamin_-_Histamine.svg) (Stand 01.03.2025)
- <https://en.wikipedia.org/wiki/File:Serotonin-2D-skeletal.svg> (stand 15.08.2025)

### Zusammensetzung SDS-haltiger Homogenisationspuffer:

- 10 mM NaHCO<sub>3</sub> = 84,01 mg/100 ml  
+ 21,3 ml einer 20% SDS - Lösung
- autoklaviert
- gelagert bei 4°C

### Lösungen für den quantitativen Proteinnachweis nach Lowry:

- Stammlösung A: 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 0,1N NaOH
- Stammlösung B: 1% K-Na-Tartrat 4H<sub>2</sub>O
- Stammlösung C: 0,5% CuSO<sub>4</sub>
- Lösung D: 24,5 ml Lösung A  
+0,25 ml Lösung B  
+0,25 ml Lösung C
- Lösung E(Folin-Ciocalteu): 1 Teil Folin  
2 Teile dest. Wasser  
(aufgrund Instabilität frisch hergestellt)

### Elektrophoresepuffer

- 6,25g Tris-Base
- 11,25g Glycin
- 1,0g SDS
- aufgefüllt mit destilliertem Wasser auf 1l

### Transferpuffer für Western Blot

- 22,43g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O
- 3,3g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O
- aufgefüllt auf 3l destilliertes Wasser

### Blocking-Puffer

- Milchpulver: TBST + 5% Magermilchpulver
- BSA: TBST + 2% BSA

## 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.

Halle, 01.03.2025

## Danksagung

Mein herzlicher Dank gebührt an erster Stelle an meinem Doktorvater Herrn Professor Joachim Neumann für die engmaschige Betreuung und Förderung meiner Arbeit, ohne die dieses Projekt nicht möglich gewesen wäre.

Ebenso zu Dank verpflichtet bin ich für die Betreuung Herrn PD Ulrich Gergs, ebenfalls vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie, der viele seiner Stunden in diese Promotion und die dazugehörigen Publikationen investiert hat.

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie möchte ich mich bei Pia Willmy und Sonja Reber für die intensive Einarbeitung in die Laborarbeit und die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe bedanken, ebenso wie bei Stephanie Simmrod für die Unterstützung in formalen Angelegenheiten und bei der Recherche.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meinen Kollegen im Institut Rebecca Schwarz, Lina Rayo Abella und Pauline Braekow für die gegenseitige moralische Unterstützung und die hervorragende Zusammenarbeit.