

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

(Direktor: Prof. Dr. med. Joachim Neumann)

**Metabolismus von Serotonin und kontraktile Wirkung an  
5-HT<sub>4a</sub>-Rezeptoren in  
Vorhöfen von Herzen transgener Mäuse**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Franziska Jung

geboren am 25.09.1991 in Chemnitz

Gutachter:

Prof. Dr. med. Joachim Neumann, Halle/Saale

Prof. Dr. med. Frank-Ulrich Müller, Münster

Prof. Dr. med. Wolfram-Hubertus Zimmermann, Göttingen

26.06.2018

27.03.2019

## Referat

Um den Metabolismus von Serotonin (5-HT) in Kardiomyozyten genauer untersuchen zu können, wurden verschiedene Versuche mit transgenen Mäusen durchgeführt, die den humanen 5-HT<sub>4a</sub>-Rezeptor kardial überexprimieren. Von genauerem Interesse war hierbei, ob Serotonin in Kardiomyozyten hergestellt und abgebaut werden kann.

Es zeigte sich, dass die Serotonin-Vorstufe 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) auch positiv inotrope und chronotrope Effekte bei transgenen Mausvorhofpräparaten hervorrufen kann, die allerdings schwächer waren, als die Effekte durch direkte Zugabe von 5-HT. Bei Wildtyp-Präparaten zeigte sich keine Reaktion auf 5-HTP. Ähnliche Ergebnisse konnten in vivo an Wildtyp- und transgenen Mäusen echokardiografisch nachgewiesen werden. Auch an menschlichem Herzgewebe zeigte sich eine positiv inotrope Reaktion auf 5-HTP. Die Effekte von 5-HTP sind durch den Decarboxylase-Hemmstoff NSD1015 aufhebbar.

Weiterhin können die Enzyme für den Serotonin-Abbau durch Hemmstoffe beeinflusst werden, so zeigte sich ein positiv inotroper und chonotroper Effekt durch den Monoaminoxidase-Hemmstoff Tranylcypromin. Allopurinol und Disulfiram als Hemmstoffe der Aldehyd-Dehydrogenase/Aldehyd-Reduktase erhöhten die Effizienz von appliziertem Serotonin.

Es ist zudem möglich Serotonin durch Tyramin und Compound 48/80 aus Zellen freizusetzen und im Falle von Compound 48/80 ist dieser Effekt durch einen spezifischen 5-HT<sub>4a</sub>-Rezeptorantagonisten (GR 113808) aufhebbar.

Serotonin kann auch über verschiedene Transportsysteme, wie z.B. SERT und OCT, aus und in die Zellen gelangen, hier zeigten sich vor allem positiv inotrope und chronotrope Effekte durch Fluoxetin. Cortison und Decynium22 zeigten bisher eher unspezifische Effekte und reduzierten die inotropen Effekte von Serotonin.

Wahrscheinlich ist also eine Synthese von Serotonin und auch ein Abbau in Kardiomyozyten möglich, was eine klinische Relevanz für unerklärbare Tachykardien oder Arrhythmien haben kann.

Jung, Franziska; Metabolismus von Serotonin und kontraktile Wirkung an 5-HT<sub>4a</sub>-Rezeptoren in Vorhöfen von Herzen transgener Mäuse, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2018

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. SEROTONIN .....</b>	<b>1</b>
1.1.1. ALLGEMEINES.....	1
1.1.2. SEROTONIN-METABOLISMUS .....	1
1.1.3. WIRKUNGEN VON SEROTONIN .....	4
1.1.4. SEROTONIN-REZEPTOREN .....	5
<b>1.2. DER 5-HT<sub>4</sub>-REZEPTOR.....</b>	<b>6</b>
<b>2. ZIELSETZUNG UND KLINISCHE RELEVANZ .....</b>	<b>9</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>12</b>
<b>3.1. VERSUCHSTIERE UND TIERHALTUNG .....</b>	<b>12</b>
<b>3.2. GENERIERUNG DER TRANSGENEN MÄUSE .....</b>	<b>12</b>
<b>3.3. GENOTYPISIERUNG DER MÄUSE .....</b>	<b>13</b>
3.3.1. EXTRAKTION UND ISOLATION DER DNA .....	13
3.3.2. KONZENTRATIONSMESSUNG DER DNA .....	13
3.3.3. PCR-AMPLIFIKATION DER DNA.....	14
<b>3.4. WESTERNBLOT, HISTOLOGIE UND IMMUNHISTOCHEMIE .....</b>	<b>14</b>
<b>3.5. KONTRAKTIONSVERSUCHE.....</b>	<b>15</b>
3.5.1. VORBEREITUNG DES ORGANBADES.....	15
3.5.2. VORBEREITUNG UND KALIBRIERUNG DER MESSANLAGE .....	16
3.5.3. ORGANENTNAHME DER MÄUSE.....	17
3.5.4. PRÄPARATION DER MAUSERZEN .....	18
3.5.5. MENSCHLICHE VORHOFPRÄPARATE.....	19
3.5.6. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG .....	19
Versuchsdurchführung bei der Maus .....	19
Versuchsdurchführung beim Menschen.....	26
<b>3.6. ECHOKARDIOGRAFISCHE VERSUCHE.....</b>	<b>27</b>
<b>3.7. STATISTISCHE AUSWERTUNG .....</b>	<b>28</b>
<b>4. ERGEBNISSE.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1. WESTERNBLOT, HISTOLOGIE, IMMUNHISTOCHEMIE .....</b>	<b>29</b>
<b>MAUSVERSUCHE.....</b>	<b>32</b>
4.1.1. GENOTYPISIERUNG DER VERSUCHSTIERE .....	32

4.1.2. KONTRAKTIONSVERSUCHE MIT TRYPTOPHAN, 5-HYDROXYTRYPTOPHAN UND NSD1015.....	33
Linke Vorhöfe.....	33
Rechte Vorhöfe.....	34
Abbildungen.....	35
4.1.3. KONTRAKTIONSVERSUCHE MIT TRANLYCYPROMIN, ALLOPURINOL UND DISULFIRAM .....	37
Linke Vorhöfe.....	37
Rechte Vorhöfe .....	38
Abbildungen.....	40
4.1.4. KONTRAKTIONSVERSUCHE MIT COMPOUND 48/80 UND TYRAMIN.....	42
Linke Vorhöfe.....	42
Rechte Vorhöfe .....	43
Abbildungen.....	44
4.1.5. KONTRAKTIONSVERSUCHE MIT FLUOXETIN.....	45
Linke Vorhöfe.....	45
Rechte Vorhöfe .....	45
Abbildungen.....	47
4.1.6. KONTRAKTIONSVERSUCHE MIT DECYNIUM 22 UND CORTISON .....	48
Linke Vorhöfe.....	48
Rechte Vorhöfe .....	49
Abbildungen.....	50
4.1.7. ECHOKARDIOGRAFISCHE VERSUCHE AN DER MAUS .....	51
Abbildungen.....	52
<b>4.2. VERSUCHE AN MENSCHLICHEN VORHOFPRÄPARATEN .....</b>	<b>53</b>
Abbildungen.....	53
<b>5. DISKUSSION.....</b>	<b>55</b>
<b>5.1. DISKUSSION DER ANGEWANDTEN METHODEN .....</b>	<b>56</b>
<b>5.2. WIRKUNG VON TRYPTOPHAN, 5-HYDROXYTRYPTOPHAN UND NSD1015.....</b>	<b>56</b>
<b>5.3. WIRKUNG VON TRANLYCYPROMIN, ALLOPURINOL UND DISULFIRAM.....</b>	<b>58</b>
<b>5.4. WIRKUNG VON COMPOUND 48/80 UND TYRAMIN .....</b>	<b>59</b>
<b>5.5. WIRKUNG VON FLUOXETIN .....</b>	<b>60</b>
<b>5.6. WIRKUNG VON DECYNIUM 22 UND CORTISON .....</b>	<b>61</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>63</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>65</b>

<b>8. THESEN.....</b>	<b>74</b>
<b>9. ANHANG.....</b>	<b>75</b>
<b>9.1. PUFFER UND LÖSUNGEN .....</b>	<b>75</b>
<b>9.2. GENOTYPISIERUNG DER VERSUCHSTIERE.....</b>	<b>75</b>
<b>9.3. HOMOGENISIERUNG/ SDS-POLYACRYLAMIDGEL/ WESTERNBLOT.....</b>	<b>75</b>
<b>9.4. KONTRAKTIONSKRAFT- UND FREQUENZMESSUNGEN AN MAUSVORHÖFEN.....</b>	<b>76</b>
<b>9.5. VERWENDETE SUBSTANZEN .....</b>	<b>76</b>
<b>9.6. GERÄTE UND BEZUGSQUELLEN .....</b>	<b>79</b>
<b>9.7. PRIMER.....</b>	<b>79</b>
<b>9.8. PCR-PROGRAMM .....</b>	<b>79</b>
<b>9.9. DATEN ZU DEN VERWENDETEN HUMANEN TRABEKELPRÄPARATEN .....</b>	<b>80</b>
Selbstständigkeitserklärung.....	VII
Lebenslauf.....	VIII
Danksagung.....	IX

## Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
5-HTP	5-Hydroxytryptophan
Abb.	Abbildung
AC	Adenylylcyclase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
bpm	beats per minute (Herzschläge pro Minute)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Calcium <sup>2+</sup> -Ionen
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EC <sub>50</sub>	Effective concentration 50 (mittlere effektive Konzentration)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GR	GR 113808
GRK	G-Protein-Rezeptor-Kinase
GTP	Guanosintriphosphat
HCN- Kanal	hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel
Hz	Hertz
IBMX	3-Isobutyl-1-methyl-xanthin
IE	Internationale Einheit
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
Iso	Isoprenalin
kg	Kilogramm
KI	Konfidenzintervall
Ktr	Kontrolle
KWK	Konzentrations-Wirkungs-Kurve
Log	Logarithmus
LTCC	L-Typ-Kalziumkanal
M	molar (Mol/Liter)
mA	Milliampère
MAO	Monoaminoxidase
MAP-Kinase	Mitogen-activated Protein-Kinase
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
MHC	schwere Kette des Myosins
min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µM	Mikromolar
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
mN	Millinewton
ms	Millisekunden
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
mV	Millivolt

n	Stichprobenumfang
NAT	Noradrenalin-Transporter
n.b.	nicht berechenbar
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OCT	organischer Kationen-Transporter
OD	optische Dichte
P	Phosphor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pEC <sub>50</sub>	negativer dekadischer Logarithmus der EC <sub>50</sub>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PDE	Phosphodiesterase
PMAT	Plasma-Membran-Monoamin-Transporter
PLB	Phospholamban
Primer	Oligonukleotid für die Polymerase-Kettenreaktion
Prop	Propranolol
RNA	Ribonukleinsäure
RyR	Ryanodin- Rezeptor (Ca <sup>2+</sup> -Freisetzungskanal)
s	Sekunde
s.	siehe
s.c.	subkutan
SDS	Natriumlaurylsulfat
SEM	Standardabweichung des arithmetischen Mittels
SERCA	Ca <sup>2+</sup> -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
SERT	Serotonin- Transporter
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
SSRI	selektiver Serotonin-Reuptake-Inhibitor (Wiederaufnahmehemmer)
TE	Tris-EDTA-Puffer
TG	transgene Maus mit herzspezifischer Überexpression humaner 5-HT <sub>4a</sub> - Rezeptoren
TnC	Ca <sup>2+</sup> -bindendes Troponin
TnI	Troponin I (Troponin-Inhibitor)
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
u.a.	unter anderem
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	1. Volt 2. Volumen
v. a.	vor allem
VMAT	Vesikulärer Monoamin-Transporter
vs.	im Vergleich zu
WT	Wildtypmaus
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

## Abbildungsverzeichnis

ABB. 1 : METABOLISMUS VON SEROTONIN .....	3
ABB. 2: SCHEMA DES 5-HT-METABOLISMUS MIT SIGNALTRANSDUKTION .....	8
ABB. 3: SCHEMA ZUR DARSTELLUNG DER EXPRESSIONSKASSETTE DES A-MHC-5-HT <sub>4A</sub> -REZEPTORS .....	13
ABB. 4: VERSUCHSAPPARATUR FÜR ISOMETRISCHE KONTRAKTIONSMESSUNGEN IM SCHEMA.....	17
ABB. 5: DIE EINZELNEN VERSUCHE AN DEN MAUSVORHOFPRÄPARATEN IM SCHEMA .....	21
ABB. 6: SCHEMA DER VERSUCHE MIT MENSCHLICHEN TRABEKELN .....	26
ABB. 7: WESTERNBLOT.....	29
ABB. 8: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON ENZYMEN DES SEROTONINMETABOLISMUS IN GEWEBEPROBEN VON MAUS UND MENSCH .....	30
ABB. 9: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS DER TRANSPORTSYSTEME FÜR SEROTONIN IN GEWEBEPROBEN DER MAUS..	31
ABB. 10: ERGEBNIS DER AGAROSEGEL-ELEKTROPHORESE .....	32
ABB. 11: INOTROPE UND CHRONOTROPE EFFEKTE VON TRYPTOPHAN UND 5-HYDROXYTRYPTOPHAN .....	35
ABB. 12: REPRÄSENTATIVE MECHANOGRAMME DER WIRKUNG VON NSD1015 BEI WT UND TG .....	35
ABB. 13: INOTROPE UND CHRONOTROPE EFFEKTE VON 5-HYDROXYTRYPTOPHAN MIT NSD 1015 .....	36
ABB. 14: INOTROPE UND CHRONOTROPE EFFEKTE VON TRANILCYPROMIN.....	40
ABB. 15: INOTROPE UND CHRONOTROPE EFFEKTE VON ALLOPURINOL UND DISULFIRAM .....	41
ABB. 16: INOTROPER EFFEKT VON COMPOUND 48/80.....	44
ABB. 17: INOTROPE UND CHRONOTROPE EFFEKTE VON TYRAMIN.....	44
ABB. 18: INOTROPE WIRKUNG VON FLUOXETIN .....	47
ABB. 19: INOTROPE UND CHRONOTROPE WIRKUNG VON DECYNIUM 22 .....	50
ABB. 20: INOTROPE UND CHRONOTROPE WIRKUNG VON CORTISON.....	51
ABB. 21: INOTROPE UND CHRONOTROPE WIRKUNG VON 5-HTP, 5-HT UND ISOPRENALIN.....	52
ABB. 22: INOTROPE EFFEKTE VON 5-HTP UND GR 113808 BEIM MENSCHEN .....	53
ABB. 23: INOTROPE EFFEKTE VON 5-HT UND GR 113808 BEIM MENSCHEN .....	54
ABB. 24: MODIFIZIERTE SIGNALTRANSDUKTION ÜBER DEN 5-HT <sub>4A</sub> -REZEPTOR .....	55

## 1. Einleitung

### 1.1. Serotonin

#### 1.1.1. Allgemeines

Serotonin ist einer der ältesten bekannten Botenstoffe der Natur und kommt in allen Organismen vor, von Einzellern, wie Hefen und Amöben, über Pflanzen bis ins Tierreich und auch beim Menschen (Feldman und Lee 1985; Peroutka und Howell 1994). Vittorio Erspamer isolierte in den 1930er Jahren als Erster eine Substanz, die er in den enterochromaffinen Zellen des Magens entdeckt hatte und nannte sie „Enteramin“ (Übersicht: Erspamer und Asero 1953). Der Name „Serotonin“ wurde erst einige Jahre später geprägt, als Irvine Page im Blutserum einen vasokonstriktorisch wirkenden (tonussteigernden) Stoff entdeckte (Rapport et al. 1947).

Die größte Menge an Serotonin, mit über 90 %, befindet sich im Gastrointestinaltrakt (Erspamer und Testini 1959; Kim und Camilleri 2000). Schon 1896 wurden die enterochromaffinen Zellen in der Darmmukosa entdeckt, zu einer Zeit, in der ihr Inhalt noch nicht geklärt war (Kultschitzky 1897). Im Blut findet man Serotonin in hohen Konzentrationen in Thrombozyten (Flachaire et al. 1990), aus denen es zur Steigerung der Thrombozytenaggregation freigesetzt werden kann (Takano 1995). Im ZNS wurde Serotonin in Neuronen der Raphe-Kerne und in der Zirbeldrüse entdeckt (Ishiwata et al. 2004).

#### 1.1.2. Serotonin-Metabolismus

Der Ausgangsstoff der Serotonin-Synthese (siehe Abb. 1) ist die Aminosäure Tryptophan (TRP) (Übersicht: Tyce 1990), welche durch die Tryptophan-Hydroxylase in 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) umgewandelt wird. Durch die Hydroxytryptophan-Decarboxylase (auch aromatische L-Aminosäure-Decarboxylase genannt) entsteht dann aus dem 5-Hydroxytryptophan das 5-Hydroxytryptamin (5-HT) (Übersicht: Walther und Bader 2003). Zur Synthese des Serotonins sind neben den enterochromaffinen Zellen und Neuronen (Übersicht: Walther und Bader 2003) wahrscheinlich auch Stomazellen, wie Kardiomyozyten (Pönicke et al. 2012) fähig. Thrombozyten sind, soweit man bisher weiß, nicht in der Lage Serotonin selbst herzustellen; nehmen hingegen das von den enterochromaffinen Zellen ins Blut abgegebene Serotonin auf (Champier et al. 1997). Gespeichert wird das aufgenommene Serotonin in intrazellulären Vesikeln, in die es durch den VMAT gepumpt wird (Erickson und Eiden 1993).

Eines der am Abbau von Serotonin beteiligten Enzyme ist MAO A (weniger MAO B), welche Serotonin in 5-Hydroxyindolacetaldehyd umwandelt (Molinoff und Axelrod 1971). Das entstandene 5-Hydroxyindolacetaldehyd kann dann über verschiedene Reaktionen weiter verstoffwechselt werden. Zum einen über die Aldehyd-Dehydrogenase zu 5-Hydroxyindolessigsäure, welche dann über den Urin ausgeschieden wird (Jonnakuty und Gragnoli 2008). Zum anderen gibt es eine Reaktion über die Aldehyd-Reduktase zu 5-Hydroxytryptophol (Squires et al. 2010). Weitere mögliche Abbaumöglichkeiten ergeben sich durch die N-Acetyltransferase, die Serotonin zu N-Acetylserotonin umsetzt, welches durch eine Hydroxyindol-O-Methyltransferase zu Melatonin verstoffwechselt wird (Übersicht: Squires et al. 2010). Diese Schritte sollen in dieser Arbeit aber nicht weiter vertieft werden.

In Abb. 1 sind neben dem untersuchten Serotonin-Metabolismus auch die Angriffspunkte der verwendeten Substanzen dargestellt. In den Experimenten wurde versucht die Serotonin-Synthese zu beeinflussen. Es sollte zum einen durch Zugabe von Tryptophan und 5-Hydroxytryptophan die Serotonin-Produktion gesteigert werden, oder durch die Hemmung der 5-Hydroxytryptophan-Decarboxylase mit NSD1015 eine Serotonin-Produktion ausbleiben. Der Abbau des Serotonins sollte durch den unspezifischen MAO-Hemmer Tranylcypromin vermindert werden. Disulfiram und Allopurinol sollten über Hemmung der weiteren Redoxreaktionen den Serotonin-Abbau verlangsamen (Fukumori et al. 1980; Beck et al. 1995).

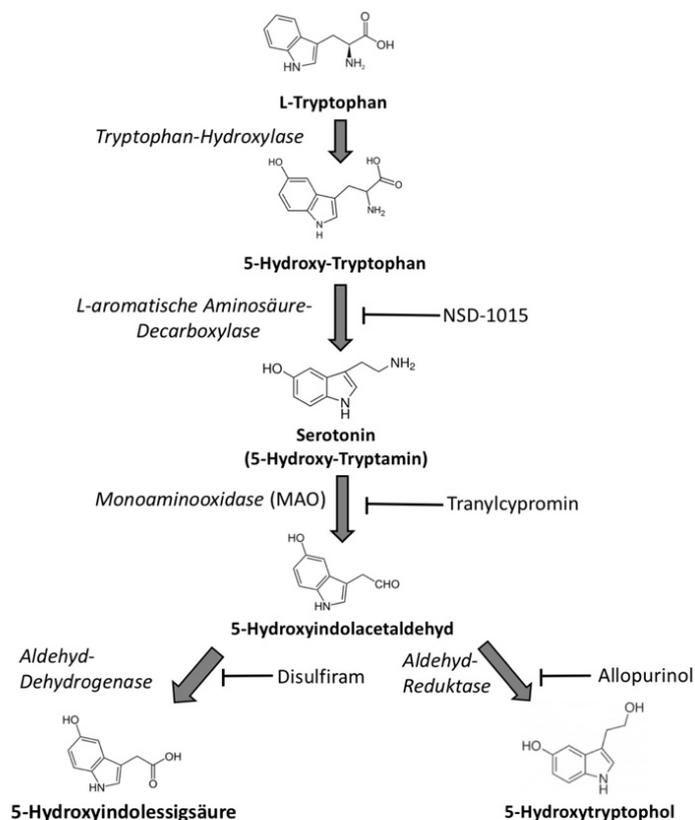


Abb. 1 : Metabolismus von Serotonin

Das in Vesikeln gespeicherte Serotonin kann über Exozytose ausgeschüttet werden, was durch Tyramin, als indirektes Sympathomimetikum, und Compound 48/80 verstärkt werden kann (Siehe Abb. 2) (Wagner et al. 1973; Übersicht: Sakai 1979). Über verschiedene Transporter ist auch eine Wiederaufnahme von Serotonin in die Zelle möglich (Übersicht: Baganz und Blakely 2013), beispielsweise mit SERT, dem Serotonin-Transporter. Andere Transporter, die Serotonin in die Zelle bringen sind OCT (organic cation transporter), ein transmembranständiger Transporter für organische Kationen, sowie auch NAT (noradrenalin transporter) und PMAT (plasma membrane monoamine transporter) als transmembranständige Monoamin-Transporter. Alle letztgenannten Transporter sind unspezifische Serotonin-Transporter. Ein selektiver Antagonist für SERT ist Fluoxetin, als SSRI (selektiver Serotonin-Transporter-Wiederaufnahme-Hemmer) (Bertrand et al. 2010). Hemmer für den OCT sind Cortison und Decynium 22 (Hayer-Zillgen et al. 2002; Hill et al. 2011).

### 1.1.3. Wirkungen von Serotonin

Serotonin ist für viele physiologische Funktionen und Abläufe wichtig. So spielt Serotonin als Neurotransmitter im zentralen Nervensystem eine große Rolle für die Organogenese in der Embryonalperiode (Lauder et al. 1988), besonders für die Herzentwicklung (Sari und Zhou 2003). Serotonin beeinflusst Wachheit und Schlaf (Millson et al. 1991), wie auch die Atem- (Richter et al. 2003) und Thermoregulation (Wilkinson et al. 1991), den Appetit und die Schmerzregulation (Ishiwata et al. 2004). Serotonin ist wichtig für Gedächtnis- und Lernprozesse (Woolley und Shaw 1957) und auch für psychische Veränderungen, wie Stimmung und Aggression (Übersicht: Popova 2006). Folglich wird angenommen, dass Serotonin mitverantwortlich bei der Entwicklung psychischer Erkrankungen ist (Naughton et al. 2000). Die Zusammensetzung der intestinalen Bakterienflora beeinflusst die Serotoninproduktion und so auch den Serotonin-Spiegel im ZNS, und dadurch die Psyche und das Verhalten (Übersicht: Cryan und Dinan 2012). Bekannt ist bereits der Zusammenhang zu depressiven und bipolaren Störungen, sowie Essstörungen, Angststörungen (Übersicht: Naughton et al. 2000) und auch Autismus (Übersicht: Muller et al. 2016). Die aktuelle Forschung widmet sich insbesondere einem putativen Zusammenhang von Serotonin und Morbus Parkinson (Huot et al. 2011). Serotonin hat weiterhin Einfluss auf den Gastrointestinaltrakt, die Harnblase und auf den Blutdruck (Übersicht: Erspamer und Asero 1953). In der Nebennierenrinde bewirkt es eine Aldosteron-Freisetzung und dadurch ebenfalls eine Blutdruckerhöhung (Lefebvre et al. 2001).

Durch seine hauptsächlich vasokonstriktorisches Eigenschaften an glatten Muskelzellen sind auch zahlreiche kardiovaskuläre Effekte des Serotonins bekannt. So bewirkt Serotonin eine Gefäßverengung der Koronargefäße (Übersicht: Hoyer et al. 1994). Bei länger andauernder Ischämie kann Serotonin aus aktivierten Thrombozyten nach der Reperfusion auch Apoptosen und Nekrosen bedingen. Verursacht wird der Zellzerfall durch den Abbau von Serotonin durch die MAO A in den Kardiomyozyten, bei dem zytotoxische Peroxide entstehen (Bianchi et al. 2005). Bei niedrigen Serotoninkonzentrationen  $< 1 \mu\text{M}$  wirkt das Serotonin über seine Rezeptoren antiapoptotisch (Nebigil et al. 2003). An gesunden menschlichen Koronargefäßen zeigt Serotonin einen vasodilatatorischen Effekt. Der vasokonstriktorisches Effekt von Serotonin zeigt sich beim Menschen nur an Gefäßen, die kein Endothel oder funktionell inaktives Endothel besitzen (Golino et al. 1991). Diese Wirkung von Serotonin kann durch Thromboxan  $A_2$ , einen weiteren von aktivierten Thrombozyten sezernierten Stoff, verstärkt werden (Übersicht: Chester et al. 1993).

Am Herzvorhof wirkt Serotonin zum Teil positiv inotrop: Greenberg erforschte den positiv inotropen Effekt an Mollusken (Greenberg 1960) und Kaumann an Katzen, Schweinen und auch am Menschen (Kaumann 1985; Kaumann 1990; Kaumann et al. 1991). Schweine und Menschen besitzen auch am Ventrikelmyokard funktionelle Serotoninrezeptoren (Brattelid et al. 2004b). Bisher konnte am Schweineherz-Ventrikel aber nur ein positiv inotroper Effekt nach vorheriger Behandlung mit einem Phosphodiesterase-Hemmer (IBMX) gezeigt werden, durch den der Abbau von intrazellulär gebildetem cAMP verhindert wird (De Maeyer et al. 2006).

Am gesunden menschlichen Herzventrikel zeigt sich kein positiv inotroper Effekt von Serotonin (Jahnel et al. 1992), wohl aber an herzinsuffizienten Ventrikeln, an denen sich der positiv inotrope Effekt durch den Phosphodiesterase-Hemmer IBMX verstärken lässt (Brattelid et al. 2004b; Afzal et al. 2008).

Serotonin bewirkt auch einen positiv chronotropen Effekt am Sinusknoten. Bisher wurde eine durch Serotonin ausgelöste Tachykardie an isolierten Vorhofpräparaten von Ratten (Docherty 1988), Katzen (Saxena et al. 1985), Schweinen (Bom et al. 1988) und auch in vivo beim Menschen (LeMessurier et al. 1959) gezeigt. Bei lebenden Ratten konnte aber auch eine, durch den Bezold-Jarisch-Reflex bedingte, Bradykardie durch Serotonin ausgelöst werden (Paintal 1973).

#### **1.1.4. Serotonin-Rezeptoren**

Die diversen Wirkungen von Serotonin werden durch vielfältige Rezeptoren verursacht. Der erste Serotonin-Rezeptor ist vermutlich vor 700-800 Mio. Jahren entstanden und in den letzten 90 Millionen Jahren entwickelten sich daraus die verschiedenen weiteren 5-HT-Rezeptoren (Peroutka und Howell 1994). Aktuell unterscheidet man zwischen sieben verschiedenen membranständigen 5-HT-Rezeptoren, von 5-HT<sub>1</sub>- bis 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptoren. Jeder Rezeptor besitzt eine unterschiedliche Anzahl weiterer Subtypen (Hoyer et al. 1994). Es erfolgte die Zusammenfassung in vier Klassen nach ihrer weiteren Signaltransduktion. 5-HT<sub>1</sub>- und 5-HT<sub>5</sub>-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, führen über G<sub>i</sub> zu einer Hemmung der Adenylatzyklase-Aktivität und kommen beide hauptsächlich im ZNS und an glatter Muskulatur von ZNS-Gefäßen vor (Hoyer et al. 1994). 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren sind G<sub>q</sub>-Protein-gekoppelt, aktivieren die Phospholipase C und können wohl auch an den MAP-Kinase-Weg koppeln (Xu et al. 2002) und kommen vor allem an glatten Muskelzellen, auf Thrombozyten und im Gastrointestinaltrakt vor (Hoyer et al. 1994). 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren sind Ligandengesteuerte Ionenkanäle in peripheren und zentralen Neuronen und 5-HT<sub>4</sub>-, 5-HT<sub>6</sub>- und

5-HT<sub>7</sub>-Rezeptoren stimulieren über G<sub>s</sub> die Adenylatzyklase-Aktivität (Bard et al. 1993; Hoyer et al. 1994). 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren gibt es im Gastrointestinaltrakt, am Herzen, im ZNS und in der Harnblase, 5-HT<sub>6</sub>- und 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptoren finden sich vorrangig im ZNS (Hoyer et al. 1994).

## 1.2. Der 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor

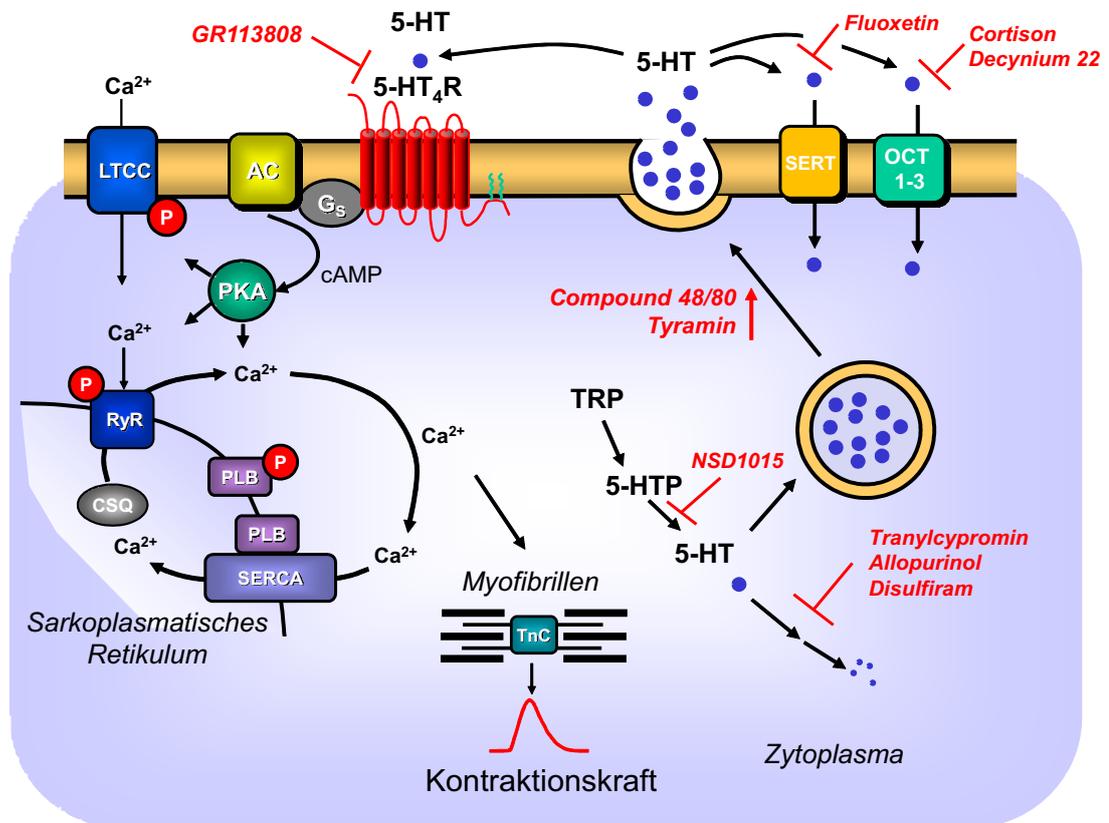
Ursprünglich pharmakologisch definiert wurde der 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor von Dumuis et. al (Dumuis et al. 1988b; Kaumann et al. 1990; Bockaert et al. 1992) und erstmals kloniert von Lucas und Hen (Lucas und Hen 1995). Das Gen für den humanen 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor befindet sich auf dem langen Arm des menschlichen Chromosoms 5 und enthält mindestens 38 Exons, wobei die Translation erst in Exon 26 beginnt (Hiroi et al. 2001). Der Rezeptor besteht aus 387 Aminosäuren, die Kristallstruktur ist bisher aber noch unbekannt. Es gibt spezie-spezifische Isoformen und jeweils unterschiedliche Subtypen, die durch alternatives Spleißen des 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptorgens entstehen (Blondel et al. 1998). Man kennt bisher 9 Subtypen: den 5-HT<sub>4a</sub>-Rezeptor, den 5-HT<sub>4b</sub>-Rezeptor (Bach et al. 2001), den 5-HT<sub>4c</sub>- und den 5-HT<sub>4d</sub>-Rezeptor (Jacobsen et al. 1995), den 5-HT<sub>4e</sub>-Rezeptor (Curtet et al. 2000), den 5-HT<sub>4f</sub>, den 5-HT<sub>4h</sub>- und den 5-HT<sub>4g</sub>-Rezeptor (Bender et al. 2000) und den 5-HT<sub>4i</sub>-Rezeptor (Brattelid et al. 2004a).

Interessant machen den 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor die über Serotonin vermittelten inotropen und chronotropen Effekte am menschlichen Herzen (Kaumann et al. 1990). Man findet ihn im Körper des weiteren im ZNS, in Darm und Harnblase, in Leber und Niere und in der Nebennierenrinde (Bach et al. 2001; Lefebvre et al. 2001; Richter et al. 2003), auch in der Plazenta, in Lunge und Pankreas und in Leukozyten (Hiroi et al. 2001; Brattelid et al. 2004b).

Die Signaltransduktion für den 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor an Kardiomyozyten wird im Folgenden näher erläutert (siehe Abb. 2). Bindet Serotonin an den 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor, so kommt es nach einer Konformationsänderung des Rezeptors zu einer Aktivierung des G<sub>s</sub>-Proteins und die α-Untereinheit mit GDP spaltet sich von der β- und γ-Einheit ab. Dadurch gibt die α-Untereinheit ihr GDP ab, nimmt GTP auf und aktiviert so die Adenylatzyklase (AC), die aus ATP das cAMP bildet (Dumuis et al. 1988a; Langlois und Fischmeister 2003; Afzal et al. 2008). Das cAMP aktiviert seinerseits die Proteinkinase A (PKA) (Kaumann et al. 1991). Durch die Aktivierung der regulatorischen Untereinheit der PKA wird die katalytische Untereinheit freigegeben und kann verschiedene Proteine phosphorylieren, z.B. den L-Typ-Kalzium-Kanal (LTCC) (Oquadid et al. 1992). Der phosphorylierte LTCC hat eine höhere

Offenwahrscheinlichkeit wodurch mehr  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Zelle einströmen und an das Troponin C binden können, was die Kontraktionskraft steigert (Pau et al. 2003; Brattelid et al. 2004a). Des Weiteren kann die PKA auch den Ryanodin-Rezeptor (RyR) und Phospholamban (PLB) phosphorylieren, beide sitzen in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) (Kaumann 1990). Über den phosphorylierten RyR wird die intraplasmatische Konzentration der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ebenfalls erhöht. Das phosphorylierte Phospholamban hingegen bewirkt eine vermehrte Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in das SR, da es durch die Phosphorylierung die Bindung und damit Inhibition von SERCA (SR-Kalzium-ATPase) verliert. Durch die aktive SERCA kommt es zu einem Transport von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in das SR und damit zu einer schnelleren Relaxation der Kardiomyozyten und dem positiv lusitropen Effekt (Übersicht: Kaumann 1990; MacLennan 2000).

Aktuell ist noch nicht vollständig geklärt, ob der positiv chronotrope Effekt von Serotonin am menschlichen Sinusknoten auch durch den  $5\text{-HT}_4$ -Rezeptor vermittelt wird, wie es beim Schwein der Fall ist (Kaumann 1990; De Maeyer et al. 2006). Es wird angenommen, dass der positiv chronotrope Effekt durch Aktivierung der HCN-Kanäle von dem entstehenden cAMP erzeugt wird Übersicht (Ludwig et al. 1999). Dadurch wird beim Menschen der  $\text{K}^+$ -Einstrom durch den  $\text{I}_f$ -Kanal (HCN- Kanal) erhöht (Pino et al. 1998; Workman und Rankin 1998). Die Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeiten für den  $\text{I}_f$ -Kanal und den LTCC können auch Vorhofarrhythmien triggern (Kaumann 1994; Workman und Rankin 1998; Pau et al. 2003).



5-HT Metabolismus und Signaltransduktion via 5-HT<sub>4a</sub> Rezeptoren in Kardiomyozyten.

Abb. 2: Schema des 5-HT-Metabolismus mit Signaltransduktion

Darstellung der Signaltransduktion über den 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor

- AC, Adenylatzyklase;
- CSQ, Calsequestrin;
- G<sub>s</sub>, stimulatorisches G-Protein;
- LTCC, L-Typ-Kalzium-Kanal;
- P, Phosphorylierung;
- PKA, Proteinkinase A;
- PLB, Phospholamban;
- RyR, Ryanodin-Rezeptor;
- SERCA, SR Kalzium ATPase;
- SERT, Serotonintransporter;
- TnC, Troponin C;
- TRP, L-Tryptophan
- 5-HT, Serotonin;
- 5-HTP, 5-Hydroxytryptophan;

## 2. Zielsetzung und klinische Relevanz

Klinisch besonders interessant und relevant sind die Wirkungen von Serotonin im kardiologischen Kontext. Über den 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor können durch endogenes Serotonin (Hollander et al. 1957) und auch 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten, wie Cisaprid, Tachykardien und Arrhythmien ausgelöst werden (Olsson und Edwards 1992). Der intrazelluläre Einstrom von Ca<sup>2+</sup>-Ionen durch den L-Typ-Kalziumkanal, wie auch die Steigerung des Einstroms von Kationen durch den I<sub>f</sub>-Kanal, sowie eine mögliche Serotonin-bedingte Erhöhung des Kaliumstromes durch den I<sub>K</sub>-Kanal, verursachen wahrscheinlich zum Teil supraventrikulären Arrhythmien (Pino et al. 1998; Rahme et al. 1999). Mit speziellen 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptorantagonisten konnte ein antiarrhythmischer Effekt gezeigt werden (Rahme et al. 1999).

Bedingt durch arrhythmische supraventrikuläre Tachykardien erhöht sich auch die Thrombogenität des Blutes und eine Embolie oder ein Schlaganfall können die potentiellen Folgen sein. Die Arrhythmogenität scheint durch die längere Medikation mit β-Adrenorezeptor-Blockern noch verstärkt zu werden (Kaumann und Sanders 1994). Bei Vorhofflimmern kommt es zudem durch eine Endothelschädigung zu einer leichteren Serotonin-Freisetzung aus Thrombozyten und auch die hemmende Wirkung von Adenosin auf die Thrombozytenaggregation kann vermindert werden. Als dritter Aspekt kommt die mechanische Destabilisierung der Thrombozyten durch die Flimmerbewegung hinzu (Baumgartner 1973; Minamino et al. 1997; Minamino et al. 1999). Durch diese Schädigung wird letztlich die Serotonin-Konzentration erhöht, was zum Perpetuieren einer bestehenden Herzrhythmusstörung führen kann (Yusuf et al. 2003). Aber auch durch eine Antikörperbildung gegen die 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren können Störungen und Veränderungen des Herzrhythmus ausgelöst werden. In einer Blutserum-Analyse von Patientinnen mit Lupus erythematoses konnten Antikörper gegen den humanen 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor entdeckt werden. Viele der Patientinnen hatten Kinder mit einem kongenitalen AV-Block, weswegen die Antikörper gegen den 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor im Verdacht stehen, die kardialen Symptome des neonatalen Lupus erythematoses zu bewirken (Eftekhari et al. 2000). Nach dieser Entdeckung erfolgte ein Maus-Versuch, bei dem weibliche Mäuse gegen den 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor immunisiert und nach erfolgreicher Immunisierung verpaart wurden. Bei den neugeborenen Mäusen kam es zum Auftreten eines kongenitalen AV-Blockes, verlängerten QT-Zeiten und Bradykardie (Eftekhari et al. 2001).

Bei chronischem Vorhofflimmern wurde bisher eine Abnahme der Expression des 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptors gefunden, was durch eine abnehmende Stimulation des L-Typ-Calciumkanals die Arrhythmie dennoch fördert (Grammer et al. 2001).

Am menschlichen Herzvorhof sind die Serotonin-bedingten Effekte bei Herzinsuffizienz vermindert, das zeigt sich in einer geringeren Aktivität der Adenylatzyklase und einem verringerten Strom durch den LTCC (Ouadid et al. 1995). Unter einer therapeutischen Behandlung mit  $\beta$ -Adrenorezeptorblockern kann Serotonin aber einen positiv inotropen Effekt am Vorhof hervorrufen (Wangemann et al. 2003). Im Ventrikel dagegen kommt es möglicherweise zu einer vermehrten Expression von 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren und dadurch zu einem verstärkten positiv inotropen Effekt. Diese Schlussfolgerung ergibt sich aus einem Tiermodell mit chronisch herzinsuffizienten Ratten (Qvigstad et al. 2005). Hierbei kam es zu einem fast vierfachen Anstieg der mRNA für den 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor. Ein messbar positiv inotroper Effekt von Serotonin war genau so stark, wie der maximale Effekt durch Stimulation der  $\beta$ -Adreno-Rezeptoren und aufhebbar durch GR113808, einen spezifischen 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptorantagonist. Durch Carbachol war der Effekt antagonisierbar (Qvigstad et al. 2005). Bei isolierten menschlichen Ventrikelpräparaten von Patienten mit Herzinsuffizienz zeigten sich bisher positiv inotrope Effekte von Serotonin, vor allem auch nach vorheriger Applikation von IBMX, die in ihrem Effekt immer geringer ausgeprägt waren als maximale  $\beta$ -Adreno-Rezeptor-Stimulation (Brattelid et al. 2004a; Brattelid et al. 2004b). Ein Erklärungsansatz hierfür liegt in der geringeren Protein-Expression der 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren im Vergleich zu den  $\beta$ -Rezeptoren. Allerdings zeigte sich auch hier bei Präparaten von Herzinsuffizienz-Patienten die mRNA für den 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor um etwa das Vierfache erhöht, im Vergleich zu Gesunden. In Abhängigkeit von der klinischen Ausprägung der Herzinsuffizienz, gemessen an den Stadien der New York Heart Association (NYHA), nimmt der positiv inotrope Effekt von Serotonin über 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren mit stärkerer Krankheitsausprägung zu (Brattelid et al. 2004a; Brattelid et al. 2004b). Da mit dem NYHA-Stadium aber auch durch eine Abnahme der  $\beta$ -Adreno-Rezeptor-Dichte (Übersicht: Bristow 2000) die therapeutische Wirkung der  $\beta$ -Adreno-Rezeptor-Blocker nachlassen kann, könnte durch 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-Antagonisten eine weitere Entlastung des Herzens, durch Verhinderung von Arrhythmien und positiver inotroper Effekte, möglich sein.

Ziel dieser Arbeit war, zu klären, ob es einen aktiven Metabolismus von Serotonin in Kardiomyozyten gibt. Damit einhergehend stellte sich die Frage, ob man in den Metabolismus eingreifen und ihn mit Medikamenten beeinflussen kann. Diese Informationen sind essenziell um grundlegende Pathomechanismen der chronischen

Herzinssuffizienz und Arrhythmien zu verstehen. Dazu wurden Versuche mit verschiedenen Substanzen sowohl im Vergleich zwischen Wildtyp- und 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgener Maus, wie auch nur zwischen 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-transgenen Mäusen, durchgeführt.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Versuchstiere und Tierhaltung

Die Versuchstiere für die Experimente waren Mäuse des Auszuchtstammes CD1, die durchschnittlich  $190 \pm 75$  Tage alt waren und im Mittel  $36,65 \pm 4,98$  Gramm wogen. Es wurden 78 für den 5-HT<sub>4a</sub>-Rezeptor transgene Mäuse, davon 38 männliche und 41 weibliche Tiere, und 48 Wildtyp-Vergleichstiere, davon 15 männliche und 32 weibliche Tiere, verwendet. Die ungleiche Geschlechterverteilung war einem Engpass in der Tiernachzucht geschuldet. Durch die unterschiedlichen Versuchsanordnungen, teilweise wurden Wildtyp-, manchmal auch transgene Mäuse zur Kontrolle verwendet, erklärt sich die verschiedene Anzahl von transgenen und Wildtyp-Mäusen.

Die Mäuse bekamen handelsübliches Labortierfutter und Wasser ad libitum. Sie wurden geschlechtsspezifisch getrennt gehalten und nur zur Verpaarung zusammengesetzt. Die Haltung und der Umgang mit den Mäusen entsprachen dem deutschen Tierschutzgesetz und wurden von der Tierschutz-Kommission der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg genehmigt (Az.: 42502-2-1078-MLU, 28.11.2011-28.11.2016).

#### 3.2. Generierung der transgenen Mäuse

Die für die Versuche verwendete transgene Mauslinie zeigt eine herzspezifische Überexpression des humanen 5-HT<sub>4a</sub>-Rezeptors (Gergs et al. 2013). Dafür wurde mittels RT-PCR ein 1.206 bp langes DNA-Produkt, das die kodierende Sequenz des menschlichen 5-HT<sub>4a</sub>-Rezeptors enthielt, aus menschlichem Herzgewebe isoliert und durch die Restriktionsendonukleasen KpnI und SacI aus dem PCR-Produkt herausgeschnitten (Abb. 3). Die so gewonnene cDNA wurde anschließend in eine Expressionskassette eingefügt. Diese enthielt den Promotor der Maus für die  $\alpha$ -Isoform der schweren Kette des Myosins ( $\alpha$ -MHC). Dadurch war eine gewebsspezifische Promotorkontrolle der Sequenz des Rezeptors möglich. Die Expressionskassette enthielt auch eine Simian-Virus 40 (SV40)-Poly-A-Signalsequenz, die die Transkription terminiert (Gergs et al., 2010).

Es folgte eine Mikroinjektion der Expressionskassette in befruchtete Eizellen von FVB/N-Mäusen. Im Folgenden wurden sie in einen CD1-Hintergrund eingekreuzt. Die so erzeugten transgenen Tiere zeigten eine herzspezifische Expression des 5-HT<sub>4a</sub>-Rezeptors im Southernblot und in der PCR. (Gergs et al., 2010).

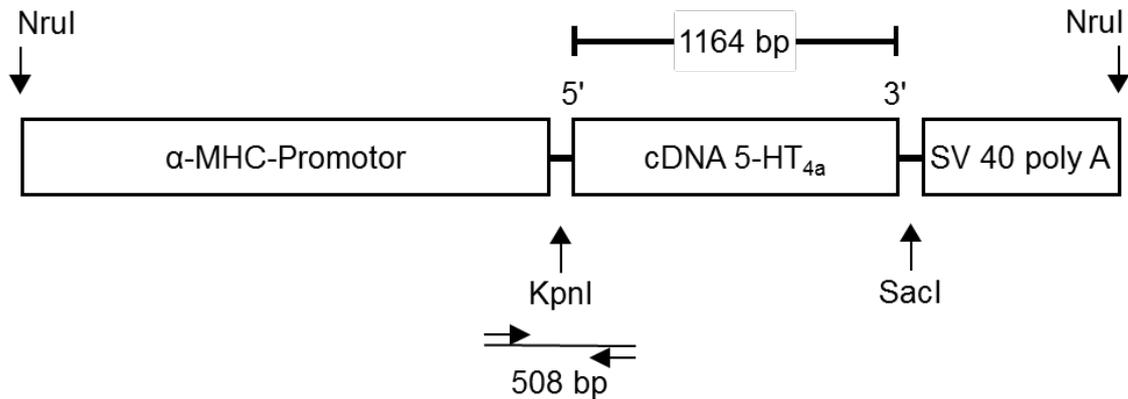


Abb. 3: Schema zur Darstellung der Expressionskassette des  $\alpha$ -MHC-5-HT<sub>4a</sub>-Rezeptors

Zur Generierung transgener Mäuse, die herzspezifisch den humanen 5-HT<sub>4a</sub>-Rezeptor überexprimieren, wurde die  $\alpha$ -MHC-Expressionskassette in befruchtete Eizellen von Mäusen injiziert. Die kodierende Sequenz wurde vorher durch die Restriktionsendonukleasen KpnI und SacI ausgeschnitten und in die Expressionskassette eingefügt. Die kodierende Sequenz war 1164 Basenpaare (bp) lang. Die Transkription erfolgte unter gewebsspezifischer Kontrolle des  $\alpha$ -MHC-Promotors der Maus. Terminiert wurde sie von einer SV 40 poly-A-Signalsequenz. Über spezifische Primer (siehe Anhang) konnte man das Transgen in der Maus-DNA nachweisen. Das PCR-Produkt war 508 bp lang.

### 3.3. Genotypisierung der Mäuse

#### 3.3.1. Extraktion und Isolation der DNA

Zur Genotyp-Bestimmung der Mäuse wurde ihnen im Alter von unter vier Wochen mit dem Skalpell ein ca. 5 mm langes Schwanzstück abgetrennt. Für die eindeutige Zuordnung erhielten die Mäuse eine Ohrlochmarkierung. Die Gewebestücke wurden in ein Reaktionsgefäß, gefüllt mit 700  $\mu$ l TE/SDS-Puffer, gegeben, anschließend erfolgte der enzymatische Verdau mit Proteinase K und die Isolation der DNA über eine Phenol-Chloroform-Extraktion.

#### 3.3.2. Konzentrationsmessung der DNA

Die Konzentration der DNA-Lösung wurde über die optische Dichte (OD) mit einem Photometer von Eppendorf ermittelt. Als erstes fand eine Leerwertmessung (keine DNA) als Kontrollwert statt. Anschließend wurde die OD einer Probe bei einer Extinktion von 260 nm ( $E_{260}$ ) bzw. bei 280 nm ( $E_{280}$ ) vermessen und der DNA-Gehalt berechnet. Es ergibt sich für die DNA-Lösung, die 50  $\mu$ g/ml doppelsträngige DNA enthält (bei einer Schichtdicke der Messküvette von 1 cm) ein  $OD_{260}$ -Messwert von 1,0.

Daher ist es mit der Formel  $OD_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor} = X \mu\text{g/ml}$  möglich, den DNA-Gehalt zu berechnen.

Zusätzlich wurde auch der  $OD_{280}$ -Wert (Extinktion bei 280 nm) gemessen, hier haben Proteine ein Absorptionsmaximum. Bildet man den Quotienten aus der  $OD_{260}$  zur  $OD_{280}$  ist eine Aussage zur Probenqualität möglich. Liegt der Wert des Quotienten zwischen 1,8 und 2,0, ist von relativ reiner DNA auszugehen.

### 3.3.3. PCR-Amplifikation der DNA

Durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde ein Fragment aus der 5-HT<sub>4a</sub>-Rezeptor-DNA vervielfältigt. Dazu wurden 0,1-1  $\mu\text{g}$  extrahierte DNA in einem Eppendorfgefäß mit einem speziellen Reaktionsansatz, bestehend aus einem Reaktionspuffer mit 1,5 mM Magnesiumchlorid, 200  $\mu\text{M}$  dNTP-Mix, 1  $\mu\text{M}$  Forward-Primer, 1  $\mu\text{M}$  Reverse-Primer und 2,5 U einer thermostabilen Taq-DNA-Polymerase (siehe Anhang), versetzt. Anschließend wurde mit DEPC-Wasser bis zu einer Gesamtmenge von 50  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Das nachzuweisende PCR-Produkt war 508 Basenpaare lang.

## 3.4. Westernblot, Histologie und Immunhistochemie

Mit verschiedenen Methoden wurden die Enzyme und Transportsysteme im Herzgewebe der Maus, sowie des Menschen nachgewiesen. Zum einen erfolgte eine Westernblot-Analyse für die Enzyme Tryptophan-Hydroxylase (TPH), die aromatische Aminosäure-Decarboxylase (5-HTP-DC, entspricht AADC) und die Monoaminoxidase A (MAO-A). Die Westernblot-Analyse wurde durchgeführt wie bei Gergs et al. (2010) beschrieben. Es erfolgte eine Pulverisierung der Herzgewebeproben mit einem Mikrodismembrator (2100 rpm) unter flüssigem Stickstoff. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  SDS-Homogenisationspuffer zu einer Spatelspitze des Pulvers (10-20 mg) und gründliches Vermischen mit dem Schüttelmixer. Die Homogenisation erfolgte mit einem Ultraschall-Homogenisator (3 x 15 Sek. auf Eis). Unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert. Die Auftrennung nach der Proteingröße erfolgte mittels Elektrophorese in SDS-Polyacrylamidgelen (Porzio und Pearson 1977) in einer Hoefer SE600 Elektrophorese-Einheit. Pro Spur wurden 50  $\mu\text{g}$  Protein geladen. Als Beladungskontrolle diente Calsequestrin (CSQ, 55 kDa). Im Anschluss erfolgte die Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Protran, 0,45  $\mu\text{m}$  Porengröße, Schleicher und Schuell, Dassel, Germany) mittels Elektrotransfer (Towbin et al. 1979). Dadurch wurden die Proteine immobilisiert und nach blockieren der freien Bindungsstellen mit Milchpulver in TBST konnten mit den verschiedenen Antikörpern, Anti-Mao-A (Verdünnung 1:2000 in Blockierungspuffer), Anti-5-HTP-DC (entspricht Anti-DDC, Verdünnung 1:2000 in

Blockierungspuffer) bzw. Anti-TPH (Verdünnung 1:1000 in Blockierungspuffer) die Zielproteine detektiert werden. Sichtbar gemacht wurden die Banden mit Hilfe eines Sekundär-Antikörpers (Verdünnung 1:1000 in Blockierungspuffer) gekoppelt an eine alkalische Phosphatase und dem Chemofluoreszenz-Substrat ECF (in AP-Puffer). Die Signalerfassung und Datenverarbeitung erfolgte mit einem TYPHOON PhosphorImager und der ImageQuant-Software (GE Healthcare, München, Germany). (Puffer und Lösungen siehe Anhang)

Um die morphologischen Besonderheiten des Myokards der transgenen Mäuse untersuchen zu können, wurden eine Histo- und Immunhistochemie von Gewebeproben, welche von Wildtyp- (n = 4) und transgenen (n = 4) Herzen stammten, angefertigt. Zum Vergleich wurden auch menschliche Herzgewebeproben herangezogen.

Die Färbungen erfolgten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Buchwalow im Institut für Hämatopathologie in Hamburg (Buchwalow und Böcker 2010; Buchwalow et al. 2011; Buchwalow et al. 2013).

Die Proben wurden einer Hämatoxylin-Eosin- und einer Masson-Goldner-Trichrom-Färbung unterzogen und die Schnitte dann im Hinblick auf Fibrosezeichen untersucht.

Die jeweiligen immunhistochemischen Färbungen erfolgten in drei unabhängigen Experimenten. Es wurden folgende Primär-Antikörper verwendet: Kaninchen-Anti-MAO-A (Verdünnung 1:20) (Shiels et al. 2008), Kaninchen-Anti-5-HTP-DC (entspricht Anti-AADC, Verdünnungen 1:100 und 1:500) (Ma et al. 2005), Kaninchen-Anti-OCT2 (Verdünnung 1:50) (Shao et al. 2014), Kaninchen-Anti-OCT3 (Verdünnung 1:200), Kaninchen-Anti-Plasma-Membran-Monoamin-Transporter (PMAT; Verdünnung 1:100) (Dong et al. 2013), alle von antikoerper-online (Aachen, Germany). Dazu Schaf-Anti-TPH (Verdünnung 1:100, gegen TPH1) (Haycock et al. 2002) von Bio-Rad Laboratories (München, Germany).

### **3.5. Kontraktionsversuche**

Die Kontraktionsversuche wurden entsprechend den etablierten und vielfach publizierten Methoden des Institutes durchgeführt.

#### **3.5.1. Vorbereitung des Organbades**

Zu Versuchsbeginn wurde eine Tyrode-Lösung aus vorher vorbereiteten Stammlösungen hergestellt. Die Lösung enthält Elektrolyte, Wasser und Glukose für ein möglichst physiologisches Milieu im Organbad.

Sie besteht aus 40 ml Stammlösung I, 38 ml Stammlösung II und 20 ml Stammlösung III (siehe Anhang). Danach wurde die Lösung im Messzylinder mit Reinstwasser auf 1 Liter aufgefüllt und 30 min. mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub>) begast. Anschließend fügt man noch 0,8 ml Kalziumchlorid-Lösung (33,2 g CaCl<sub>2</sub>/100 ml H<sub>2</sub>O), 1 g Glucose, 49,3 mg Ascorbinsäure und 19 mg Na<sub>2</sub>EDTA hinzu. Im Organbad hatte das CaCl<sub>2</sub> somit eine Endkonzentration von 1,8 mM (Endkonzentrationen der Tyrode s. Anhang). Die Lösung wurde vor und während des Versuches auf 37 °C erwärmt und zur Stabilisierung des pH-Wertes kontinuierlich mit Carbogen begast.

### **3.5.2. Vorbereitung und Kalibrierung der Messanlage**

Die Messanlage für isometrische Kontraktionen bildeten doppelwandige Organbäder mit je 10 ml Volumen (Abb. 4). Das innere Gefäß wurde mit Tyrode-Lösung befüllt und bot Platz für jeweils ein Vorhofpräparat. Unten am Badrand gab es einen Anschluss für die Carbogenzufuhr. Der äußere Teil des Doppelwandgefäßes diente der indirekten Beheizung der Tyrode-Lösung, über einen Zu- und Abfluss für einen Wasserkreislauf wurde so das Gefäß mit 37 °C warmen Wasser aus einem Umwälzthermostat erwärmt.

Die Präparate konnten über zwei starre Metalldrähte befestigt und in das Organbad eingehängt werden. Der obere Metalldraht war verbunden mit einem Kraftaufnehmer, dieser leitete die Kontraktionskraft über einen Brückenverstärker an den Schreiber bzw. den Digitalisierer und den Computer weiter. Zu Beginn des Versuches wurde die Vorschubgeschwindigkeit auf 5 mm pro Minute eingestellt. Zeitweise wurde die Geschwindigkeit des Schreibers in den Versuchen auf 100 mm pro Sekunde erhöht, um die Einzelkontraktionen besser beurteilen zu können.

Parallel zur Schreiberaufzeichnung wurden die Signale der Brückenverstärker auch digitalisiert und auf einem Computer mit entsprechender Software (IOX Vers. 1.593 - April 16th, 2002 © EMKA TECHNOLOGIES, Paris) aufgezeichnet.

In jedem Organbad gab es zwei Reizelektroden für die elektrische Reizung der linken Vorhöfe. Sie befanden sich neben den Vorhöfen ohne direkten Kontakt und stimulierten die linke Vorhöfe mit einer Frequenz von 1 Hz und Rechteckimpulsen von 5 ms Dauer. Die gewählte Spannung lag ca. 10-20 % über der Reizschwelle der Präparate. Die linken Vorhöfe dienten der Kraftmessung.

Die rechten Vorhöfe kontrahierten, bei intaktem Sinusknoten und unbeschädigtem Reizleitungssystem, spontan ohne elektrische Reizung. Sie dienten der Messung der Schlagfrequenz.

Um den Schreiber zu kalibrieren wurde zuerst ein Nullpunkt festgelegt. Danach wurde ein Gewicht angehängt, der eine Kraft von 5 mN erzeugt, und dabei der Schreiberausschlag für verschiedene Empfindlichkeitsstufen dokumentiert. Dadurch konnte später die Zugkraft der Präparate mit der Kalibrierung auf das Gewicht korreliert werden.

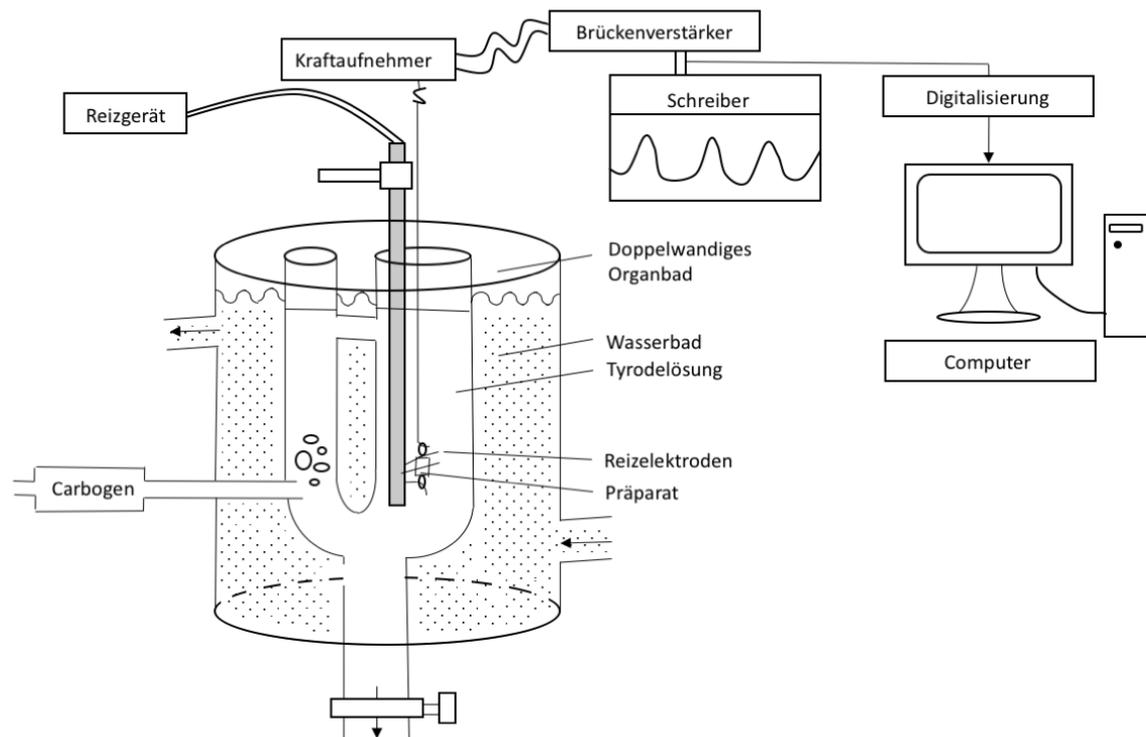


Abb. 4: Versuchsanordnung für isometrische Kontraktionsmessungen im Schema

Doppelwandiges Organbad mit einem aufgehängten Präparat, das sich zwischen den Reizelektroden befindet, das Reizgerät, der Kraftaufnehmer, der Brückenverstärker und der Schreiber, der die Muskelkontraktionen als Mechanogramm aufzeichnet. Die Tyrodelösung wird im Organbad mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) begast und auf 37 °C, durch den in der Organbaddoppelwand befindlichen Wassermantel, temperiert.

### 3.5.3. Organentnahme der Mäuse

Direkt zu Beginn des Versuches wurde jede Maus gewogen. Für die Experimente mussten sie nicht nüchtern sein und konnten bis zur Präparation Wasser trinken und fressen (Standarddiät-Trockenfutter von Altromin®). Um bei der Präparation eine Thrombusbildung im Herzen zu vermeiden, spritzte man den Tieren kurz vor Versuchsbeginn 500 IE Heparin intraperitoneal.

Die Mäuse wurden mittels intraperitonealer Injektion von Pentobarbital (50-75 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert. Diese Art Anästhesie hatte folgende Vorteile: es kam zu einer tiefen Bewusstlosigkeit, eine schmerzbedingte Katecholaminausschüttung durch die Präparation konnte so vermieden werden, und sie führte nicht unmittelbar zum Atemstillstand, was die Sauerstoffversorgung der Herzmuskelzellen gefährdet hätte.

War die Bewusstlosigkeit eingetreten, erfolgte die Fixation der Maus an den Extremitäten in einer Silikon-beschichteten Petrischale. Dann wurde ventral am Abdomen mit der Schere über einen Längsschnitt das Fell und Oberhaut entfernt, bis das Manubrium sterni und die unteren Rippenbögen sichtbar waren. Unterhalb des Sternums und der Rippenbögen wurde nun mit zwei Schnitten das Peritoneum eröffnet und man sah das Zwerchfell von unten, welches ebenfalls mit zwei Schnitten eröffnet wurde. Danach wurde jeweils mit einem Schnitt am seitlichen linken und rechten unteren Rippenbogen das Präparationsfeld vergrößert und übersichtlicher gemacht. Jetzt konnte man mit einer Klemme das Manubrium sterni fixieren und es mit den vorderen Rippenbögen nach oben umschlagen und man hatte freie Sicht auf den Thorax-Situs mit Herz und Lungen. Nun durchtrennte man die Vena cava und den Aortenbogen und konnte das Herz-Lungen-Paket entnehmen und sofort in ein mit raumtemperierter Tyrode-Lösung gefülltes Gefäß überführen.

Zur Entfernung letzter Blutreste aus dem schlagenden Herzen erfolgte eine vorsichtige Kompression zwischen den Fingern.

#### **3.5.4. Präparation der Mausherzen**

Unmittelbar nach dem Herauspräparieren der Herz-Lungen-Pakete wurden sie in eine mit ca. 20°C temperierter Tyrode-Lösung gefüllte und mit Carbogen begaste Präparierschale überführt. Das Herz wurde mit einer Nadel fixiert und die Lungenflügel entfernt. Dann wurde das Herz so fixiert, dass der linke Vorhof gut sichtbar war und trennte ihn anschließend ab. Für die Aufhängung im Organbad wurden am oberen und unteren Pol des Vorhofpräparates Metallhaken durch das Muskelgewebe gestochen, längs zur Muskelfiederung. Nun konnte das Präparat in die Aufhängung eingehängt und mit dieser in das mit Tyrode-Lösung befüllte Wasserbad eingetaucht werden. Da, wie in 3.4.2 beschrieben, die linken Vorhöfe elektrisch stimuliert werden mussten, erfolgte nun die Einschaltung des Reizgerätes für dieses Organbad und die Aufzeichnung der Kontraktionskraft begann.

In den ersten 30 min. erfolgte ein dreimaliger Wechsel der Tyrode-Lösung, bis sich ein Gleichgewicht der Kontraktionskraft einstellte. Es war auch möglich, die Präparate in

dieser Zeit noch nachzuspannen. Die Präparate wurden auf die muskelspezifische Maximalkraft vorgespannt.

Für die Präparation der rechten Vorhöfe war ein sehr vorsichtiges und sorgfältiges Vorgehen wichtig, um den Sinusknoten im Bereich der Einmündung der Vena cava superior nicht durch zu viel Zug am Präparat zu schädigen. So wurde hier, im Gegensatz zur Präparation des linken Vorhofs, das restliche Herz schrittweise vom rechten Vorhof abgetrennt. Anschließend wurden auch in den rechten Vorhof zwei Häkchen längs zur Muskelfiederung gestochen und das Präparat vorsichtig in das Organbad eingehängt.

### **3.5.5. Menschliche Vorhofpräparate**

Durch Kooperation mit der Herz-Thorax-Chirurgie des Universitätsklinikums Halle (Saale) war es uns möglich, einige Versuche an Präparaten des menschlichen rechten Vorhofes durchzuführen. Ein kleines Gewebestück von meist 1 cm<sup>2</sup> Fläche wurde zum Anschluss der Herz-Lungen-Maschine bei Bypass-Operationen vom menschlichen rechten Herzohr entfernt und in das Institut für Pharmakologie gebracht. Eine tabellarische Darstellung wichtiger Patientendaten befindet sich im Anhang.

Von dem Gewebestück wurden in einer Tyrode-Lösung-gefüllten Präparierschale einzelne Trabekel von ca. 5 mm Länge isoliert abpräpariert, mit Metallhäkchen versehen und in das Organbad eingehängt. Alle anderen Vorbereitungsschritte erfolgten wie vorher schon für die Maus-Versuche beschrieben, mit dem Unterschied, dass im Organbad alle Präparate elektrisch mit einer Frequenz von 1 Hz und Rechteckimpulsen von 5 ms Dauer (Reizspannung 5 V) stimuliert werden mussten, da sie keinen intakten Sinusknoten oder andere Schrittmacherzellen enthielten.

### **3.5.6. Versuchsdurchführung**

#### **Versuchsdurchführung bei der Maus**

Nachdem die Vorhofpräparate ins Organbad eingehängt und vorgespannt worden waren, fand etwa alle zehn Minuten ein Badwechsel mit frischer Tyrodelösung statt. Dadurch konnte bei den Vorhöfen eine stabile Ausgangslage für die Kraft (linker Vorhof) und für die Schlagfrequenz (rechter Vorhof) erreicht werden, welche mit einem „schnellen Vorlauf“, das heißt einer Erhöhung der Schreibergeschwindigkeit auf 100 mm pro Sekunde, aufgezeichnet wurde. Der „schnelle Vorlauf“ diente der besseren Darstellung der Einzelkontraktion und zeigt auch genauer, ob und welche Arrhythmien auftreten. Nun konnte mit der Substanz-Zugabe und somit dem eigentlichen Experiment begonnen werden. Da die volle Entwicklung der inotropen und chronotropen Effekte etwas Zeit in Anspruch nimmt, wurde nach der Zugabe einer

Substanz immer mindestens fünf Minuten abgewartet und wieder mit einem „schnellen Vorlauf“ die Wirkung der Substanz dokumentiert.

Nach Beenden des Versuches für eine Substanz erfolgte, wenn noch eine andere Substanz am selben Präparat getestet werden sollte, ein dreimaliger Badwechsel mit 10 ml frischer Tyrode pro Organbad über mindestens 30 Minuten. Dieses Vorgehen wird im Folgenden Badwechsel der Substanz genannt, sowohl die Kraft, als auch die Schlagfrequenz sollen sich durch das Ausspülen applizierter Substanzen wieder auf Ausgangslage normalisieren.

Um die vielen verschiedene Versuche mit unterschiedlichen Versuchsbedingungen besser zu veranschaulichen, ist die Durchführung in Abbildung 5 schematisch genauer dargestellt und anschließend erläutert.

Am Ende jedes Experimentes folgte eine Kontrolle durch Zugabe einer Endkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  Serotonin, entweder durch Einzelgabe oder durch eine im Experiment enthaltene kumulative Zugabe von Serotonin im Sinne einer Kraft-Wirkungs-Kurve (KWK), und von 1  $\mu\text{M}$  Isoprenalin. Nur transgene Mäuse zeigten eine Reaktion auf Serotonin. Eine Reaktion auf Isoprenalin zeigte an, ob die Vorhöfe überhaupt noch zu einem Kontraktionskraft- und Schlagfrequenzanstieg in der Lage waren.

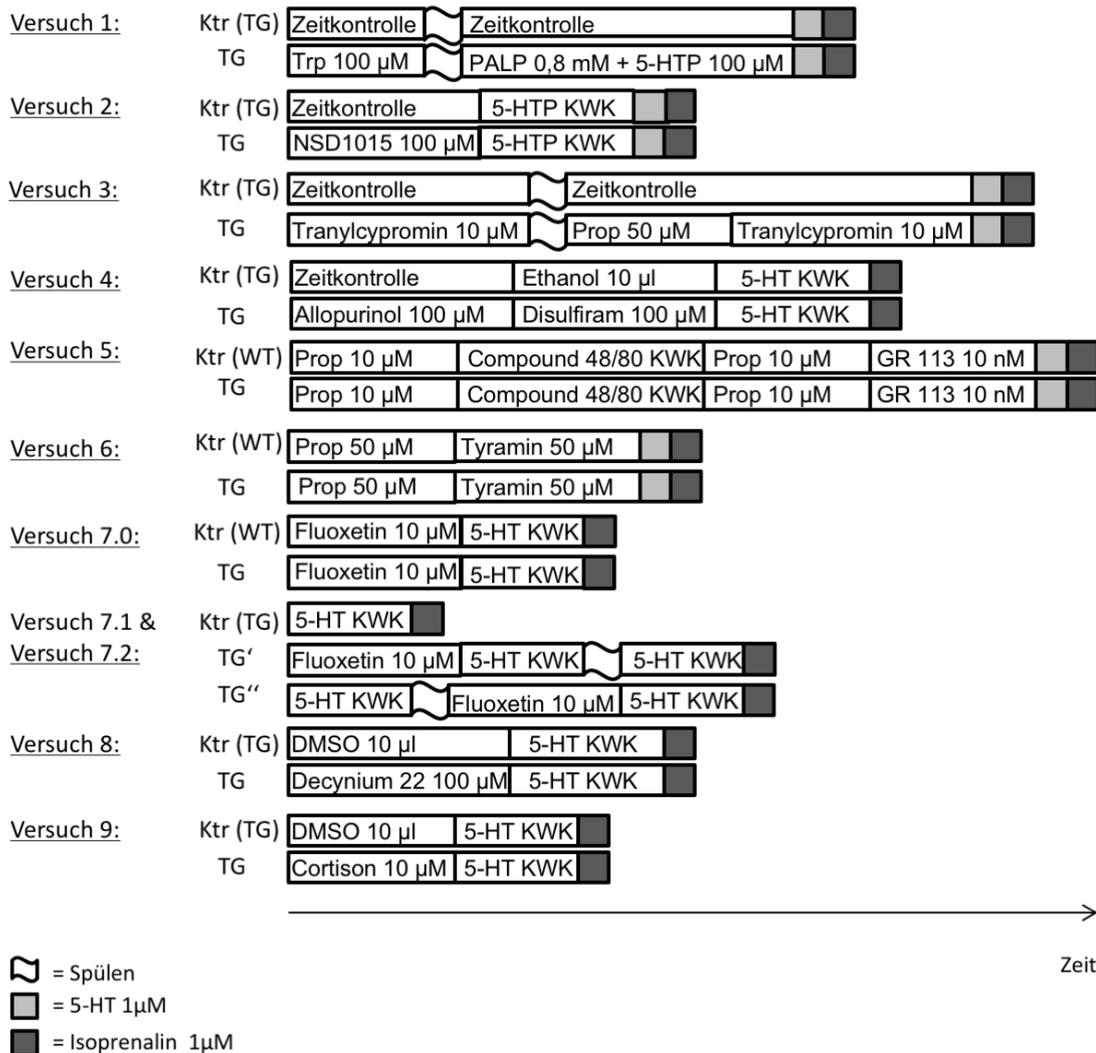


Abb. 5: Die einzelnen Versuche an den Mausvorhofpräparaten im Schema

Jeder Versuch wurde durch die Zugabe von 1  $\mu$ M Isoprenalin beendet. Für die Zeitkontrolle dienten sowohl Wildtyp-Mäuse als auch transgene Tiere.

Die Balkenlänge entspricht nicht dem realen Zeitintervall, sondern ist so gewählt, dass die Substanznamen und Abkürzungen lesbar sind.

Ktr, Kontrolle; Trp, Tryptophan; PALP, Pyridoxal-5-Phosphat; 5-HT, Serotonin; 5-HTP, 5-Hydroxytryptophan; Prop, Propranolol; GR, GR 113808; DMSO, Dimethylsulfoxid

**Ktr:** Dieser Versuchsteil wurde jeweils entweder mit Wildtyp-Mäusen oder mit transgenen Tieren durchgeführt und diente der Verdeutlichung von Unterschieden der getesteten Substanzen. Abschließend erfolgte, wenn der Versuch keine KWK beinhaltete, immer eine Zugabe von 1  $\mu$ M Serotonin, zum Testen, ob ein 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor vorliegt, und eine Zugabe von 1  $\mu$ M Isoprenalin, was eine maximale Kraft- und Frequenzsteigerung bei Wildtyp- und transgenen Mäusen hervorrufen sollte.

### Experimente mit Tryptophan, 5-Hydroxytryptophan und NSD1015

Bei diesen Experimenten wurde versucht, in die Synthese des Serotonins einzugreifen. Wie in Abb.1 gezeigt, wird Tryptophan über die Tryptophan-Hydroxylase zu 5-Hydroxytryptophan umgesetzt Übersicht (Côté et al. 2003). Dieses wird dann durch die 5-Hydroxytryptophan-Decarboxylase zu Serotonin verstoffwechselt und dieser Schritt wird durch NSD1015 gehemmt werden (Pandey et al. 1983; Hunter et al. 1993).

**Versuch 1:** Für den Versuch wurden nur transgene Präparate verwendet. Jeweils ein linker und rechter Vorhof diente als Zeitkontrolle, die Vorhofpräparate des anderen Versuchstieres wurden mit 100 µM Tryptophan über 30 Minuten behandelt. Dann wurden alle Präparate dreimal gespült um das Tryptophan zu entfernen. Anschließend erhielten dieselben Vorhöfe, bei denen die Tryptophan-Applikation erfolgt war, 0,8 mM Pyridoxal-5-Phosphat (Synthese-Co-Faktor) und 100 µM 5-Hydroxytryptophan für 30 Minuten, auch hier dienten der andere linke und rechte Vorhof als Zeitkontrolle. Zum Abschluss erfolgte die Zugabe von 1 µM Serotonin bei allen Vorhöfen um das Vorhandensein des 5-HT<sub>4a</sub>-Rezeptors physiologisch nachzuweisen. Die nachträgliche Gabe von 1 µM Isoprenalin zeigte, ob die Vorhöfe bereits maximal stimuliert oder noch eine weitere Steigerung möglich war.

**Versuch 2:** Dieser Versuch wurde ebenfalls nur mit transgenen Präparaten durchgeführt. Ein linker und rechter Vorhof dienten als Zeitkontrolle und zu dem anderen linken und rechten Vorhof wurden für 30 Minuten 100 µM NSD1015 zugegeben. Dann folgte eine 5-Hydroxytryptophan-KWK (von 100 pM bis 100 µM, in 7 Schritten) bei allen Präparaten. Das Versuchsende bildeten wieder die Serotonin-(1 µM) und Isoprenalin-(1 µM) Gabe.

### Experimente mit Tranylcypromin, Allopurinol und Disulfiram

Tranylcypromin ist ein unspezifischer Monoaminoxidase-Hemmer (Baker et al. 1992). Um den Effekt von Adrenalin und Noradrenalin zu hemmen, wurde diese Versuchsreihe zuerst ohne und anschließend nach Auswaschen mit 50 µM Propranolol durchgeführt, welches eventuelle Nebeneffekte von Adrenalin und Noradrenalin, deren Abbau ebenfalls durch Tranylcypromin gehemmt wird, unterdrücken soll. Im Anschluss sind weitere Enzyme mit Redoxreaktionen am Abbau beteiligt, wie in Abb. 1 dargestellt ist. Die Aldehyd-Dehydrogenase (Aldehyd-Oxidase, Aldehyd-Reduktase) ist ein Enzym, was je nach angebotenen Substraten verschiedene Reaktionen katalysieren kann, und von Disulfiram und Allopurinol gehemmt werden soll (Fukumori et al. 1980;

Sharkawi 1980; Moriwaki et al. 1993; Beck et al. 1995). Allopurinol, klassischerweise als Xanthin-Oxidase-Hemmstoff bekannt, ist auch in der Lage oxidativen Stress durch freie Radikale, die in Redoxreaktionen umgewandelt werden, zu reduzieren (Moriwaki et al. 1993; Lee et al. 2009; Riegersperger et al. 2011). Weiterhin ist Allopurinol ein Hemmstoff der Tryptophan-Pyrrolase. Dieses Enzym kann L-Tryptophan in einem alternativen Stoffwechselweg metabolisieren, wodurch weniger L-Tryptophan für die Synthese von Serotonin zur Verfügung steht. Über diesen Mechanismus kann Allopurinol den Serotonin-Spiegel ebenfalls anheben (Übersicht: Green und Curzon 1970).

**Versuch 3:** Für diesen Versuch wurden nur transgene Vorhofpräparate verwendet. Wieder benötigte man einen linken und rechten Vorhof als Zeitkontrolle und der andere linke und rechte Vorhof erhielt je 10  $\mu\text{M}$  Tranylcypromin für 30 Minuten. Danach wurden alle Vorhöfe mit Tyrode-Lösung gespült und es folgte bei den Vorhöfen, die vor dem Ausspülen mit Tranylcypromin behandelt wurden, die Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  Propranolol. Nach 10 Minuten wurde dann erneut 10  $\mu\text{M}$  Tranylcypromin zu diesen Präparaten zugegeben. Zum Versuchsende wurden abermals zu allen Vorhofpräparaten 1  $\mu\text{M}$  Serotonin und 1  $\mu\text{M}$  Isoprenalin zugegeben.

**Versuch 4:** Dieser Versuch wurde wieder nur mit transgenen Vorhofpräparaten durchgeführt. Ein linker und rechter Vorhof dienen der Zeitkontrolle. Zu dem anderen linken und rechten Vorhof wurde zuerst 100  $\mu\text{M}$  Allopurinol für 30 Minuten und anschließend 100  $\mu\text{M}$  Disulfiram, ebenfalls für 30 Minuten, zugegeben. Die Kontroll-Präparate erhielten 10  $\mu\text{l}$  Ethanol zum Zeitpunkt der Disulfiram-Applikation der anderen Vorhöfe, da dieses in Ethanol gelöst war und so der Effekt von Disulfiram von einem Lösungsmittelleffekt abgegrenzt werden konnte. Im Anschluss erfolgte noch an allen Präparaten eine Serotonin-KWK (von 100 pM bis 1  $\mu\text{M}$ , in 9 Schritten) und die abschließende Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  Isoprenalin.

#### Experimente mit Compound und Tyramin

Sowohl Compound 48/80, als auch Tyramin gelten als Substanzen, die eine unspezifische Freisetzung von Katecholaminen und anderen Transmittern bewirken (Wagner et al. 1973; Irman-Florjanc und Erjavec 1983). Über diesen Mechanismus soll die extrazelluläre Konzentration von Serotonin erhöht und dadurch die Kontraktionskraft und Schlagfrequenz der Vorhofpräparate beeinflusst werden. Zur Hemmung der Effekte anderer Katecholamine, wie Adrenalin und Noradrenalin, erfolgte eine Propranolol-Zugabe. Diese ist in den Versuchen unterschiedlich hoch,

weil sich im Verlauf der Experimente die zu Beginn verwendete Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  auf die rechten Vorhofpräparate sehr stark negativ chronotrop auswirkte, was eine Versuchsauswertung stark erschwerte. In den späteren Experimenten wurde deswegen nur noch eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Propranolol zur Unterdrückung anderer katecholaminerger Effekte verwendet.

**Versuch 5:** Für den Versuch wurden Wildtyp- und transgene Vorhofpräparate verwendet. Zu Beginn erfolgte bei allen Präparaten die Applikation von 10  $\mu\text{M}$  Propranolol und nach 10 Minuten schloss sich eine Compound 48/80-KWK an (30 mM, 100 mM, 300 mM). Danach gab man erneut 10  $\mu\text{M}$  Propranolol hinzu und nach 10 Minuten erfolgte die Zugabe von 10 nM GR 113808. Der Versuch wurde mit der Gabe von 1  $\mu\text{M}$  Serotonin und 1  $\mu\text{M}$  Isoprenalin abgeschlossen

**Versuch 6:** Das ist ein Versuch, der mit Wildtyp- und transgenen Präparaten durchgeführt wurde. Alle Präparate erhielten 50  $\mu\text{M}$  Propranolol und nach 10 Minuten 50  $\mu\text{M}$  Tyramin. Der Versuch endete abermals mit der Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  Serotonin und 1  $\mu\text{M}$  Isoprenalin.

#### Experimente mit Fluoxetin

Fluoxetin ist ein selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer, durch dessen Zugabe die Konzentration von Serotonin im Extrazellulärraum erhöht werden soll (Wong et al. 1995).

Als erstes wurde die Wirkung von Fluoxetin allein an den Vorhofpräparaten von Wildtyp- und transgenen Mäusen getestet. Im Anschluss daran erfolgten die Versuche mit Fluoxetin nur noch an den transgenen Mäusen. Hier zeigte sich eine Abhängigkeit der Wirkung von der Versuchsabfolge.

**Versuch 7:** In dieser Versuchsreihe wurden verschiedene zeitliche Abfolgen mit Fluoxetin geprüft.

Unter 7.0 findet sich ein Versuch, bei dem Fluoxetin an der Wildtyp-(Ktr) und an der transgenen Maus getestet wurde. Dazu erfolgte die Applikation von 10  $\mu\text{M}$  Fluoxetin bei allen Vorhöfen für 30 Minuten. Daran schloss sich eine Serotonin-KWK (von 100 pM bis 1  $\mu\text{M}$ , in 9 Schritten) an.

7.1 und 7.2 sind Versuche nur mit transgenen Mäusen. Als Kontrolle dient die Serotonin-KWK. Verglichen wird diese in 7.1 durch die zeitliche Abfolge von 10  $\mu\text{M}$

Fluoxetin für 30 Minuten, daran folgt die Serotonin-KWK (erster Effekt), dann wird mit Tyrodelösung ausgespült und danach eine zweite Serotonin-KWK durchgeführt.

Im Versuch 7.2 ist die zeitliche Abfolge umgedreht: die Präparate erhalten zuerst eine Serotonin-KWK, gefolgt von einem Ausspülen des Serotonins mit Tyrodelösung, danach die Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  Fluoxetin für 30 Minuten mit anschließender Serotonin-KWK (zweiter Effekt).

Beendet wurden die Versuchsreihen jeweils mit der Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  Isoprenalin.

#### Experimente mit Decynium 22 und Cortison

Decynium 22 und Cortison hemmen organische Kationen-Transporter (OCT1-3) und könnten zu einer Erhöhung von Serotonin im Extrazellulärraum führen (Iversen 1965; Hayer-Zillgen et al. 2002; Hill et al. 2011).

Von Cortison erwartet man durch eine Hemmung der OCT 2 und 3 (Hayer-Zillgen et al. 2002; Hill et al. 2011) und die damit verbundene Erhöhung der extrazellulären Konzentration von Serotonin eine Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve bei anschließender kumulativer Zugabe von Serotonin, ähnlich wie durch Fluoxetin.

**Versuch 8:** Für den Versuch wurden nur transgene Präparate verwendet. Ein linker und rechter Vorhof erhielten 10  $\mu\text{l}$  DMSO als Lösungsmittelkontrolle und die anderen beiden Vorhöfe 100  $\mu\text{M}$  Decynium 22, das in 10  $\mu\text{l}$  DMSO gelöst war, für 30 Minuten. Danach erfolgte für alle Präparate eine Serotonin-KWK (von 100 pM bis 1  $\mu\text{M}$ , in 9 Schritten) und der Versuch endete mit der Applikation von 1  $\mu\text{M}$  Isoprenalin.

**Versuch 9:** Dieser Versuch ist ähnlich zu Versuch 8, er wurde auch nur an transgenen Mäusen durchgeführt. Zu jeweils einem linken und rechten Vorhof erfolgte die Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  DMSO als Lösungsmittelkontrolle und zu dem anderen linken und rechten Vorhof wurden 10  $\mu\text{M}$  Cortison für 30 Minuten zugegeben. Im Anschluss erfolgte auch bei diesem Versuch eine Serotonin-KWK (von 100 pM bis 1  $\mu\text{M}$ , in 9 Schritten) und die abschließende Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  Isoprenalin.

### Versuchsdurchführung beim Menschen

Die menschlichen Trabekel wurden wie die Maus-Präparate eingehängt und vorgespannt und es erfolgte ebenfalls analog etwa alle zehn Minuten ein Badwechsel mit frischer Tyrode-Lösung, um eine stabile Ausgangslage der Kontraktionskraft für den Versuchsbeginn zu erreichen.

Zur Aufzeichnung der Ausgangslage diente ein „schneller Vorlauf“, also eine Erhöhung der Schreibgeschwindigkeit auf 100 mm pro Sekunde, zur Darstellung der Einzelkontraktionen und eventueller Arrhythmien. Anschließend konnte mit der Zugabe der Substanzen begonnen werden. Wie bei den Maus-Versuchen wurde auch bei den Versuchen am menschlichen Vorhofpräparat nach jeder Substanzzugabe mindestens fünf Minuten gewartet, um die volle inotrope Effektentwicklung zu ermöglichen und diese dann wieder mit einem „Vorlauf“ dokumentiert.

Die Versuchsbedingungen sind schematisch in Abbildung 6 genauer dargestellt und anschließend erläutert.

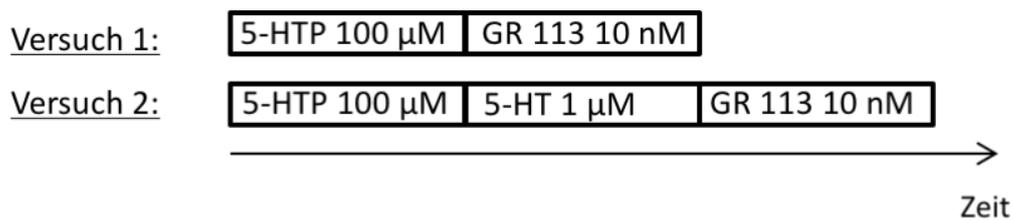


Abb. 6: Schema der Versuche mit menschlichen Trabekeln

5-HTP, 5-Hydroxytryptophan; 5-HT, Serotonin; GR, GR 113808

**Versuch 1:** Bei diesem Versuch erhielten die Trabekelpräparate 100 µM 5-Hydroxytryptophan für 10-15 Minuten. Anschließend wurde versucht, den Effekt durch die Zugabe von 10 nM GR 113808 zu antagonisieren.

**Versuch 2:** Bei wenigen Präparaten erfolgte nach der Zugabe von 5-Hydroxytryptophan keine Reaktion. Deshalb erhielten diese Trabekel 1 µM Serotonin, um herauszufinden, ob in den Präparaten nur die Metabolisierung oder vielleicht der 5-HT<sub>4a</sub>-Rezeptor nicht funktionierte. Anschließend erfolgte wie bei Versuch 1 eine orientierende Antagonisierung mit 10 nM GR 113808.

### 3.6. Echokardiografische Versuche

Um die Wirkung von 5-Hydroxytryptophan in vivo zu untersuchen, wurde an einigen Wildtyp- und transgenen Mäusen eine Versuchsreihe unter Ultraschallkontrolle durchgeführt. Die Effekte am Herzen konnten mit dem System Vevo® 2100 von VisualSonics® (Kanada) optisch dargestellt und dokumentiert werden. Dazu wurden die Tiere in einer Narkosekammer inhalativ mit 2 % Isofluran (Abbott, Wiesbaden) und Sauerstoff narkotisiert und anschließend auf den auf 37°C erwärmten Untersuchungstisch gelegt. Zur Aufrechterhaltung der Inhalationsnarkose befand sich am Untersuchungstisch für die Maus eine Maske, die über ein Schlauchsystem mit dem Gasvernebler verbunden war. Die Isofluranzufuhr wurde dann auf 1,5 % reduziert. Anschließend erfolgte die Fixation der Mäusepfoten mit Klebestreifen und Elektrodengel auf den EKG-Elektroden des Untersuchungstisches, die Einführung einer rektalen Sonde zur Temperaturüberwachung und die Enthaarung des Thorax- und oberen Abdominalbereiches mit Veet®-Enthaarungscreme. Nach kurzem Einwirken konnte diese entfernt, ein Kopplungsgel aufgetragen und der Ultraschallkopf auf dem Mausthorax platziert werden. Dann erfolgte die Positionierung des Ultraschallkopfes so, dass von parasternal die lange Achse des Herzens beurteilbar war.

Um die Ausgangswerte zu erfassen, folgte nach optimaler Einstellung immer eine basale Messung der zu untersuchenden Parameter Ejektionsfraktion und Frequenz. Dann erhielten die Mäuse eine intraperitoneale Injektion von 100 µl einer 10 mM 5-Hydroxytryptophan-Lösung und nach 5 Minuten wurden zur Beurteilung des Effektes die Ejektionsfraktion und die Frequenz gemessen. Danach erfolgte eine intraperitoneale Injektion von 100 µl einer 10 mM Serotonin-Lösung, mit erneuter Messung der Ejektionsfraktion und der Frequenz nach 5 Minuten, und eine intraperitoneale Injektion von 100 µl einer 1 mM Isoprenalin-Lösung als Positivkontrolle, mit abschließender Ejektionsfraktions- und Frequenzmessung nach 5 Minuten.

Es wurden neun echokardiografische Untersuchungen an transgenen Mäusen und vier an Wildtyp-Mäusen durchgeführt.

### **3.7. Statistische Auswertung**

Zur Auswertung wurden mit dem Programm Microsoft Excel die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) betrachtet. Für die statistische Analyse wurde ein t-Test für verbundene und unverbundene Stichproben durchgeführt, dabei galten p-Werte kleiner 0,05 als signifikant. Mit dem Programm GraphPad Prism 5.0 für Windows (Prism 5, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) konnten zusätzlich noch die  $EC_{50}$ -Werte der Kraft-Wirkungskurven ermittelt, dabei ist  $pEC_{50}$  der negative dekadische Logarithmus des  $EC_{50}$ -Wertes, und die Graphen dargestellt werden. Im Folgenden wird die Anzahl der Einzelversuche als „n“ bezeichnet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Westernblot, Histologie, Immunhistochemie

In orientierenden Westernblot-Analysen konnte an Herzgewebeproben von Maus und Mensch gezeigt werden, dass die untersuchten Stoffwechsellenzyme Tryptophan-Hydroxylase, 5-Hydroxytryptophan-Decarboxylase und Monoaminoxidase A im Gewebe vorhanden sind (Ausschnitte der Gelelektrophoresen in Abb. 7). Die Banden zeigten sich alle im erwarteten Bereich von 50-60 kDa. CSQ diente als Beladungskontrolle bei 55 kDa.

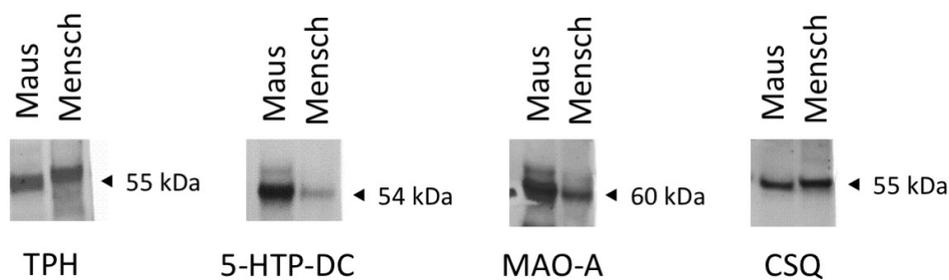


Abb. 7: Westernblot

Nach erfolgter SDS-Gelelektrophorese und Transfer auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen Antikörpern. Die Banden zeigen die positive Immunreaktion an. Getestet wurden Herzgewebeproben von Maus und Mensch.

TPH	Nachweis der Tryptophan-Hydroxylase
5-HTP-DC	Nachweis der 5-Hydroxytryptophan-Decarboxylase (=5-HTP-DC)
MAO-A	Nachweis der Monoaminoxidase A
CSQ	Positiv-Kontrolle mit Calsequestrin

Um zu untersuchen, ob die *in vitro* getesteten Enzyme und Transporter in den Kardiomyozyten vorhanden sind, erfolgten immunhistochemische Färbungen mit den entsprechenden, kommerziell erhältlichen, Antikörpern, die bei beiden Spezies (Maus und Mensch) ähnliche Ergebnisse erbrachten. Es zeigte sich eine positive Immunreaktion für MAO-A, 5-Hydroxytryptophan-Decarboxylase (5-HTP-DC entspricht AADC) und TPH in den Kardiomyozyten des Menschen (Abb. 8a-c) und der Maus (Abb. 8d, e). Es gab keinen Unterschied zwischen den Gewebeproben von Wildtyp- und transgenen Mäusen.

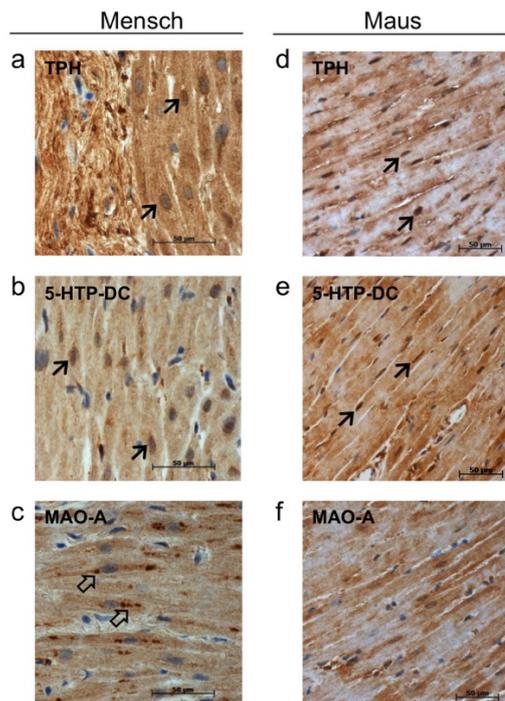


Abb. 8: Immunhistochemischer Nachweis von Enzymen des Serotoninmetabolismus in Gewebeproben von Maus und Mensch

In der linken Spalte sind menschliche Gewebeproben des rechten Vorhofes (a-c) und in der rechten Spalte Herzgewebeproben der Maus (d-f) dargestellt.

**a, d** Protein-Expression der Tryptophan-Hydroxylase (TPH)

**b, e** Protein-Expression der 5-Hydroxytryptophan-Decarboxylase (5-HTP-DC)

**c, f** Protein-Expression der Monoaminoxidase A (MAO-A)

In einigen Zellkernen wurden die AADC und TPH nachgewiesen (Pfeile a-e). In Abb. 8c ist die positive Immunreaktion von MAO-A ist mit Pfeilen markiert.

Weiterhin erfolgten auch immunhistochemische Färbungen für verschiedene Monoamin-Transporter. SERT als Serotonin-Transporter konnte in Herzgewebeproben der Wildtyp-Maus nachgewiesen werden. Die Immunreaktion mit Antikörpern gegen SERT, PMAT, OCT2 und OCT3 führte zu einer homogenen Anfärbung des sarkoplasmatischen Retikulums des Myokards. Auch Zellkerne zeigten eine positive Immunreaktion auf Antikörper gegen SERT und OCT3 (Abb. 9). Es zeigten sich in Bezug auf die untersuchten Transporter keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und transgenen Herzgewebeproben.

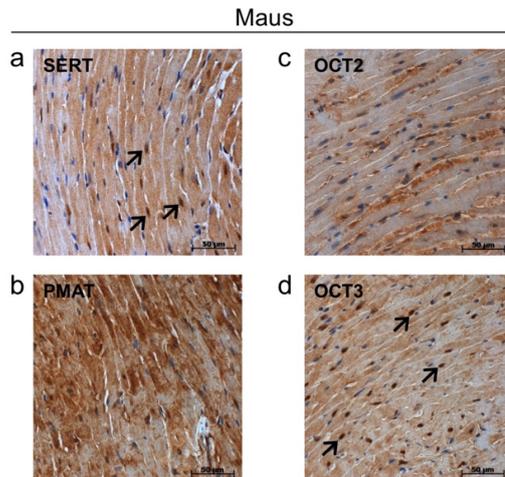


Abb. 9: Immunhistochemischer Nachweis der Transportsysteme für Serotonin in Gewebeproben der Maus

Abgebildet sind Herzgewebeproben der Maus.

- a** Nachweis des Serotonin-Transporters (SERT)
- b** Nachweis des Plasmamembran-Monoamin-Transporters (PMAT)
- c** Nachweis des Organischen Kationen-Transporters 2 (OCT2)
- d** Nachweis des Organischen Kationen-Transporters 3 (OCT3)

Die verschiedenen Transportproteine konnten im Myokard und SERT und OCT3 auch in Zellkernen (Pfeile) immunhistochemisch nachgewiesen werden. Proben vom Herzgewebe transgener Mäuse zeigten das gleiche Färbungsmuster.

## Mausversuche

### 4.1.1. Genotypisierung der Versuchstiere

Zuerst wurde photometrisch die DNA-Konzentration und -Qualität mit Hilfe des Quotienten der optischen Dichte (OD) bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Bei allen Proben lag dieser Quotient zwischen 1,79 und 1,93. Die DNA-Proben waren also von einem ausreichenden Reinheitsgrad.

Wie in 3.3. erläutert, wurde zum Identifizieren der transgenen Tiere aus allen Mausschwanzstücken die genomische DNA extrahiert und die 5-HT<sub>4</sub>-DNA durch eine PCR vervielfacht. Danach schloss sich eine Agarosegel-Elektrophorese an, um zu zeigen, ob die Tiere den humanen 5-HT<sub>4a</sub>-Rezeptor in ihrem Genom aufweisen und damit transgen sind. Das gesuchte PCR-Produkt hatte eine Länge von 508 Basenpaaren (bp), wenn diese Bande also zu sehen war, waren die Mäuse transgen. Fehlte die Bande, handelte es sich um einen Wildtyp. Am linken Rand wurde zusätzlich noch eine 100 bp DNA-Leiter zur Längenbeurteilung der DNA-Fragmente aufgetragen, außerdem wurde immer eine Positiv- und eine Negativ- Kontrolle mitgeführt.

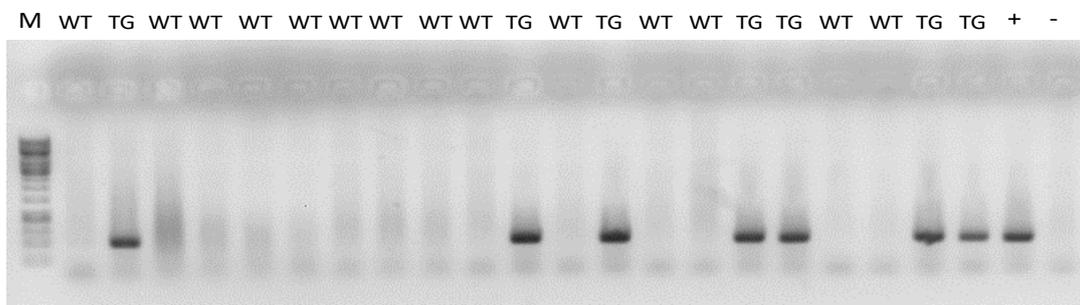


Abb. 10: Ergebnis der Agarosegel-Elektrophorese

Nach erfolgter PCR und Amplifizierung der DNA-Proben, wurden sie auf das Gel aufgetragen und durch eine Elektrophorese getrennt. Die transgene DNA-Sequenz zeigte sich als Bande mit einer Länge von 508 Basenpaaren (bp). Am linken Rand lief zur Längenbeurteilung der DNA-Fragmente eine 100 bp DNA-Leiter. M: Marker; WT: Wildtyp-Maus; TG: transgene Maus; +: Positivkontrolle; -: Negativkontrolle

#### 4.1.2. Kontraktionsversuche mit Tryptophan, 5-Hydroxytryptophan und NSD1015

##### Linke Vorhöfe

Auf die Zugabe von Tryptophan haben weder die Wildtyp-, noch die Vorhöfe der transgenen Mäuse mit einem Kraftanstieg im Vergleich zur Ausgangskraft reagiert. Nach Zugabe von 5-Hydroxytryptophan und Pyridoxal-5-phosphat zeigte sich ein Kraftunterschied ( $p < 0,05$ ). Die transgenen Mäuse zeigten bei einer Ausgangskraft von durchschnittlich  $2,14 \pm 0,48$  mN (100 %) eine fast 4-fache Kontraktionskraftzunahme auf  $7,66 \pm 1,28$  mN (373 %). Die Wildtyp-Vorhöfe hingegen reagierten nicht auf das 5-Hydroxytryptophan. Die Ausgangskraft lag durchschnittlich bei  $1,86 \pm 0,53$  mN (100 %) und nach 5-HTrp bei  $2,21 \pm 0,66$  mN (117,8 %). Einen Überblick über das Verhalten der Kontraktionskraft zeigt Abbildung 11a.

Da die Umsetzung von 5-Hydroxytryptophan zu Serotonin im Vorhofpräparat also möglich ist, wurde im nächsten Versuch getestet, ob dieser Effekt durch Zugabe des 5-Hydroxytryptophan-Decarboxylase-Hemmers NSD1015 aufgehoben werden kann. Als Vorversuch wurde beispielhaft Wildtyp- und transgenen Präparaten jeweils 100  $\mu$ M NSD1015 appliziert und beide Vorhofpräparate zeigten einen Kraftanstieg. Dieser Vorversuch ist in Abbildung 12 als Mechanogramm dargestellt.

Danach folgte der Versuch mit zwei transgenen Präparaten. Zu einem transgenen Präparat wurde 100  $\mu$ M NSD1015 zugegeben, das andere transgene Präparat erhielt 100  $\mu$ l Tyrode-Lösung (Lösungsmittelkontrolle). Hierbei zeigte sich erneut, dass 100  $\mu$ M NSD1015 allein positiv inotrop wirkt, von einer Ausgangskraft von  $2,66 \pm 0,24$  mN (100 %) kam es zu einer Kontraktionskraftzunahme auf  $4,48 \pm 0,34$  mN (174,7 %) ( $p < 0,05$ ). Anschließend erfolgte eine kumulative Zugabe von 5-Hydroxytryptophan von 0,1 nM bis 100  $\mu$ M. Dabei konnte eine konzentrationsabhängige Kraftzunahme bei den transgenen Präparaten, die kein NSD1015 erhalten hatten, registriert werden. Ab einer Konzentration von 1  $\mu$ M zeigte sich ein positiv inotroper Effekt ( $p < 0,05$ ): Die transgenen Präparate, die den Hemmstoff NSD1015 bekommen hatten, zeigten keinen Kraftanstieg durch 5-Hydroxytryptophan im getesteten Konzentrationsbereich. Stattdessen kam es zu einer leichten Abnahme der Kontraktionskraft von  $3,94 \pm 0,3$  mN auf  $2,78 \pm 0,26$  mN bei einer Konzentration von 100  $\mu$ M, welche ab einer Konzentration von 1  $\mu$ M 5-Hydroxytryptophan signifikant ( $p < 0,05$ ) zur Ausgangslage war. Zum Ende des Experimentes stellte sich der erwartete Unterschied zwischen den beiden Präparaten dar, die transgenen Präparate mit NSD1015 wiesen eine Kontraktionskraft von

$2,78 \pm 0,26$  mN auf, im Vergleich dazu die transgenen Präparate ohne NSD1015  $5,2 \pm 0,78$  mN. Dieser Versuch ist in Abbildung 13a und 13b dargestellt.

### **Rechte Vorhöfe**

Bei den Versuchen mit den rechten Vorhöfen zeigten sich weder bei Tryptophan-, noch bei 5-Hydroxytryptophan-Zugabe Unterschiede. Nach der Zugabe von Tryptophan stieg die Schlagfrequenz der transgenen Mäuse zwar von  $264 \pm 61$  bpm (100 %) auf durchschnittlich  $272 \pm 61$  bpm (118 %) an, dieser Unterschied war nicht signifikant. Die Wildtypmäuse zeigten keinen Effekt auf die Schlagfrequenz (Kontrolle:  $360 \pm 34$  bpm vs. Tryptophan:  $340 \pm 40$  bpm). Interessanterweise reagierten die rechten Vorhofpräparate sowohl der Wildtypmäuse, als auch der transgenen Mäuse nicht auf eine Zugabe von 5-Hydroxytryptophan (Abbildung 11b).

Auch mit Präparaten der rechten Vorhöfe wurde die Hemmung der 5-Hydroxytryptophan-Decarboxylase durch NSD1015 (Abbildung 13c) untersucht. NSD1015 zeigte hier eine temporäre positiv chronotrope Wirkung um 21 % im Vergleich zur Ausgangslage (von  $387 \pm 19$  bpm auf  $465 \pm 15$  bpm) ( $p < 0,05$ ). Die anschließende kumulative Zugabe von 5-Hydroxytryptophan von 0,1 nM bis 100  $\mu$ M bewirkte bei den mit NSD1015 behandelten Präparaten keine erneute Frequenzzunahme. Die unbehandelten transgenen Vorhofpräparate zeigten eine konzentrationsabhängige Zunahme der Schlagfrequenz durch 5-Hydroxytryptophan.

## Abbildungen

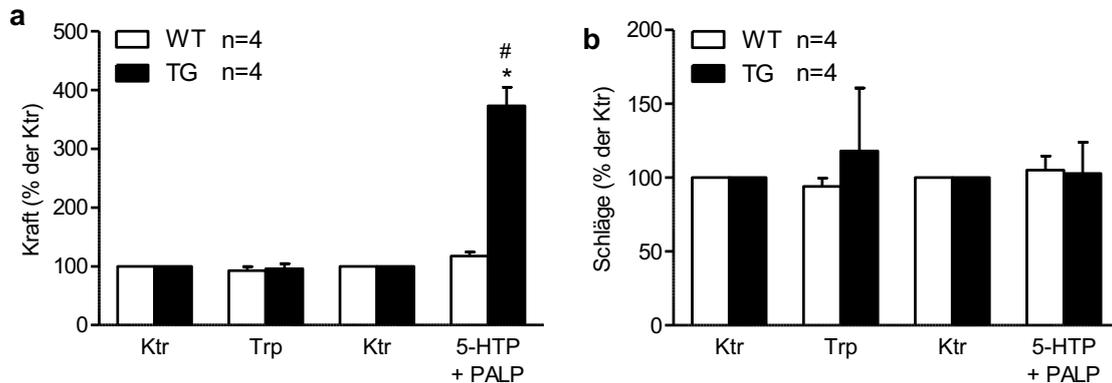


Abb. 11: inotrope und chronotrope Effekte von Tryptophan und 5-Hydroxytryptophan

Dargestellt sind die Kraftentwicklung elektrisch gereizter linker Vorhöfe (a) und die Veränderung der Schlagfrequenz (b) von Wildtyp- und transgenen Mausvorhofpräparaten nach Zugaben von 100  $\mu$ M Tryptophan und 100  $\mu$ M 5-Hydroxytryptophan mit 0,8 nM Pyridoxal-5-Phosphat im Vergleich zum Kontrollwert (Ktr) vor Substanzapplikation.

**a** Kontraktionskraft vor (Ktr) und nach Substanzapplikation;

Ordinate: Kontraktionskraft in %

**b** Schlagfrequenz vor (Ktr) und nach Substanzapplikation: Ordinate: Schläge in %

\*  $p < 0,05$  vs. Ktr; #  $p < 0,05$  vs. WT

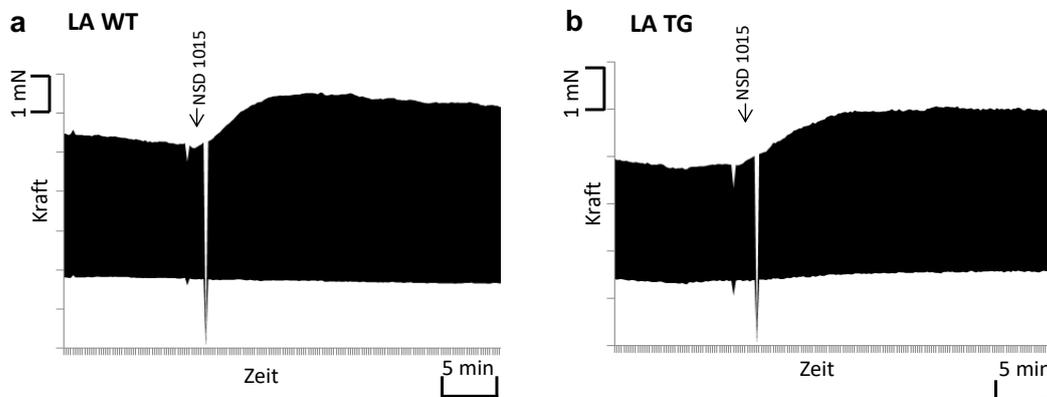


Abb. 12: Repräsentative Mechanogramme der Wirkung von NSD1015 bei WT und TG

Abgebildet sind originale Mechanogramme linker Vorhofpräparate (LA) von Wildtyp-(WT) und transgenen (TG) Mäusen mit der Zugabe von 100  $\mu$ M NSD1015.

**a** Elektrisch gereizter linker Vorhof der WT-Maus.

Abszisse: Zeit in Minuten; Ordinate: Kontraktionskraft in mN

**b** Elektrisch gereizter linker Vorhof der TG-Maus.

Abszisse: Zeit in Minuten; Ordinate: Kontraktionskraft in mN

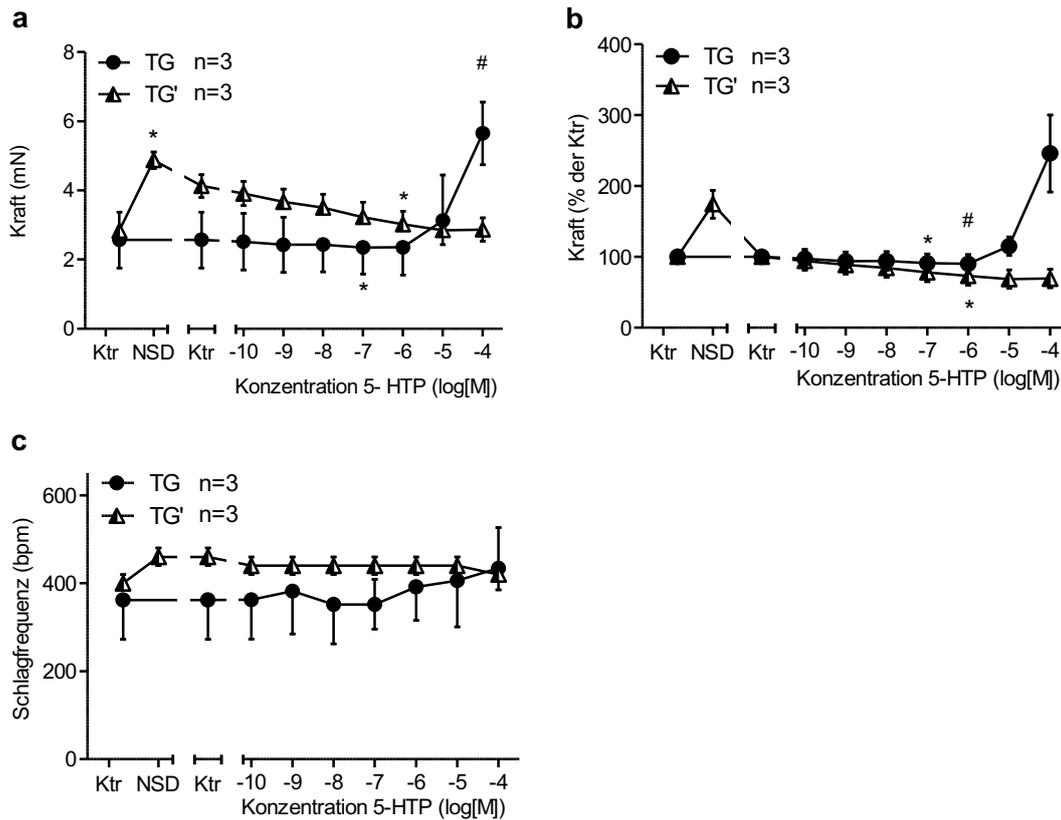


Abb. 13: inotrope und chronotrope Effekte von 5-Hydroxytryptophan mit NSD 1015

Darstellung der Kraftentwicklung elektrisch gereizter linker Vorhöfe (a,b) und der Schlagfrequenz spontan schlagender rechter Vorhöfe (c) von transgenen Mausvorhofpräparaten mit (TG') und ohne (TG) Zugabe von 100  $\mu$ M NSD1015 und anschließender kumulativer Zugabe von 0,1 nM bis 100  $\mu$ M 5-Hydroxytryptophan.

**a** Kontraktionskraft vor (Ktr) und nach Substanzapplikation;

Abszisse: 5-HTP- Konzentration in log(M); Ordinate: Kontraktionskraft in mN

**b** Kontraktionskraft vor (Ktr) und nach Substanzapplikation;

Abszisse: 5-HTP- Konzentration in log(M); Ordinate: Kontraktionskraft in %

**c** Schlagfrequenz vor (Ktr) und nach Substanzapplikation:

Abszisse: 5-HTP- Konzentration in log(M); Ordinate: Schlagfrequenz in bpm

\*  $p < 0,05$  vs. Ktr; #  $p < 0,05$  vs. TG

#### 4.1.3. Kontraktionsversuche mit Tranylcypromin, Allopurinol und Disulfiram

##### Linke Vorhöfe

Die linken Vorhofpräparate sowohl von Wildtyp-, als auch von transgenen Mäusen haben positiv inotrop auf die alleinige Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  Tranylcypromin reagiert ( $p < 0,05$ ), was in Abbildung 14a dargestellt ist. Die Wildtyppräparate zeigten einen Kraftanstieg von  $3,04 \pm 0,27 \text{ mN}$  auf  $5,96 \pm 0,96 \text{ mN}$  (195 %) ( $p < 0,05$ ), die transgenen Präparate von  $2,97 \pm 0,36 \text{ mN}$  auf  $5,70 \pm 0,72 \text{ mN}$  (197 %) ( $p < 0,05$ ). Nach dem Auswaschen erfolgte die Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  Propranolol zu beiden Präparaten. Hier stellte sich ein negativ inotroper Effekt dar. Von der Ausgangslage von  $2,73 \pm 0,35 \text{ mN}$  sank die Kontraktionskraft der Wildtyppräparate auf  $1,74 \pm 0,3 \text{ mN}$  (66 %) ( $p < 0,05$ ) ab und die der transgenen Präparate von  $2,37 \pm 0,4 \text{ mN}$  auf  $1,72 \pm 0,46 \text{ mN}$  (69 %). Anschließend erfolgte eine erneute Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  Tranylcypromin und jetzt stellte sich ein positiv inotroper Effekt nur bei den transgenen Präparaten ein, von  $1,72 \pm 0,4 \text{ mN}$  auf  $2,67 \pm 0,58 \text{ mN}$ .

Bei den Versuchen mit Allopurinol und Disulfiram wurden im Vorfeld Versuche an Wildtyp-Präparaten durchgeführt. Allopurinol zeigte im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle keinen positiv inotropen Effekt hat. Im Versuch von Disulfiram und Ethanol zeigte Ethanol allein einen positiv inotropen Effekt und mit Disulfiram einen negativ inotropen Effekt bewirkt. Die Kontraktionskraftzunahme war bei Ethanol allein deutlich größer als mit Disulfiram, das in Ethanol gelöst war.

Im Vergleich zum Wildtyp-Vorversuch zeigten die transgenen Maus-Vorhofpräparate ähnliche Reaktionen auf Allopurinol und Disulfiram und die jeweiligen Lösungsmittel (Abb. 15a). Aus den Effekten der Substanzen resultierten die unterschiedlichen Ausgangslagen vor dem Beginn der kumulativen Zugabe des Serotonins.

Von einer Ausgangslage, nach Applikation von 100  $\mu\text{l}$  Tyrode-Lösung und 10  $\mu\text{l}$  Ethanol als Lösungsmittelkontrolle, zeigten die transgenen Vorhofpräparate eine Kontraktionskraft von  $4,35 \pm 1,13 \text{ mN}$  (100 %), durch eine kumulative Zugabe von Serotonin konnte die Kontraktionskraft auf  $7,69 \pm 0,4 \text{ mN}$  (210 %) gesteigert werden (Abb. 15b, c).

Die Vorhofpräparate transgener Mäuse, die 100  $\mu\text{M}$  Allopurinol und 100  $\mu\text{M}$  Disulfiram erhalten hatten, wiesen zu Beginn mit  $1,48 \pm 0,23 \text{ mN}$  (100 %) eine geringere Kontraktionskraft als die Kontrollpräparate auf. Es erfolgte eine kumulative Zugabe von 0,1 nM bis 1 mM Serotonin. Ab einer Konzentration von 10 nM Serotonin kam es bei diesen Präparaten zu einem positiv inotropen Effekt, die Kontraktionskraft betrug  $2,16 \pm 0,33 \text{ mN}$  (148 %). Die maximale Kontraktionskrafteerhöhung stellte sich ab

300 nM mit  $5,63 \pm 0,61$  mN (396 %) ein (Abb. 15b, c). Die relative Zunahme der Kontraktionskraft der Vorhofpräparate, welche Allopurinol und Disulfiram appliziert bekamen, ließ sich um ca. das Doppelte steigern im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 15c).

### Rechte Vorhöfe

Nach Zugabe von 10  $\mu$ M Tranylcypromin zeigte sich bei den rechten Vorhofpräparaten von Wildtyp- und transgenen Mäusen ein positiv chronotroper Effekt ( $p < 0,05$ ). Wie in Abbildung 14) gezeigt, stieg die Schlagfrequenz der Wildtyp-Präparate von  $324 \pm 6$  bpm (100 %) auf  $522 \pm 40$  bpm (161 %) an, die der transgenen Präparate von  $357 \pm 54$  bpm (100 %) auf  $504 \pm 50$  bpm (146 %). Anschließend erfolgte das Auswaschen und die Zugabe von 50  $\mu$ M Propranolol, was einen negativ chronotropen Effekt auf alle rechten Vorhofpräparate hatte. Die Schlagfrequenz sank bei den Wildtyp-Präparaten von  $462 \pm 70$  bpm (100 %) auf  $151 \pm 41$  bpm (38 %) und bei den transgenen Präparaten von  $425 \pm 53$  bpm (100 %) auf  $251 \pm 58$  bpm (64 %). Durch erneute Zugabe von 10  $\mu$ M Tranylcypromin war dann weder bei Wildtyp- noch bei den transgenen Vorhofpräparaten ein Anstieg der Schlagfrequenz zu erzielen, sondern sie sank weiter ab. Bei den Wildtyp-Präparaten von einem Kontrollwert von  $151 \pm 41$  bpm (100 %) auf  $101 \pm 24$  bpm (71 %) und bei den transgenen Vorhofpräparaten von einem Kontrollwert von  $251 \pm 58$  bpm (100 %) auf  $176 \pm 89$  bpm (59 %). Unter Propranolol-Zugabe entwickelten sowohl die Wildtyp-, als auch die transgenen Vorhofpräparate starke Arrhythmien, sodass in späteren Versuchen die Konzentration von 50  $\mu$ M auf 10  $\mu$ M Propranolol gesenkt wurde, um die Entstehung von Arrhythmien zu reduzieren.

Wie bereits für die linken Vorhofpräparate beschrieben, wurde zuerst auch an rechten Wildtyp-Vorhofmuskelpreparaten ein Versuch für Allopurinol und Disulfiram allein durchgeführt. Hierbei stellte sich kein Unterschied zwischen Allopurinol oder dem Lösungsmittel Tyrode-Lösung dar. Im Gegensatz dazu konnte ein negativ chronotroper Effekt von Disulfiram beobachtet werden.

Bei den Versuchen mit den transgenen Vorhofpräparaten stellte sich durch Allopurinol und durch Disulfiram kein chronotroper Effekt ein. Nach Allopurinol-Zugabe betrug die Schlagfrequenz  $375 \pm 29$  bpm (Ktr =  $382 \pm 25$  bpm). Nach Zugabe von Tyrode-Lösung allein betrug die Schlagfrequenz  $405 \pm 38$  bpm (Ktr =  $382 \pm 25$  bpm). Die Applikation von Disulfiram zeigte, wie auch in den Vorversuchen an den Wildtyp-Präparaten, einen geringen negativ chronotropen Effekt, es war ein tendenzielles Absinken der Schlagfrequenz von  $375 \pm 29$  bpm (100 %) auf  $330 \pm 17$  bpm (89 %) messbar. Ein geringes Absinken der Schlagfrequenz war auch nach Ethanol-Zugabe zu erkennen, von  $405 \pm 38$  bpm (100 %) auf  $390 \pm 39$  bpm (96 %).

Anschließend erfolgte, wie auch für die linken Vorhofpräparate, die kumulative Zugabe von 0,1 nM bis 1 mM Serotonin. Durch die vorher beschriebenen Effekte von Allopurinol und Disulfiram ergaben sich die unterschiedlichen Ausgangslagen der Präparate in Abb. 15d. Durch die kumulative Zugabe von Serotonin kam es zu einer Zunahme der Schlagfrequenz sowohl bei den Präparaten, die Allopurinol und Disulfiram erhalten hatten, als auch bei den Lösungsmittelkontrollen. Beide Präparatengruppen erreichen bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M Serotonin nahezu die gleiche Schlagfrequenz. Sie erhöhte sich bei den Präparaten mit Allopurinol und Disulfiram von  $315 \pm 29$  bpm (100 %) auf  $465 \pm 51$  bpm (148 %) ( $p < 0,05$ ). Bei den Präparaten, die als Lösungsmittelkontrolle dienten, stieg die Schlagfrequenz von  $375 \pm 29$  bpm (100 %) auf  $465 \pm 57$  bpm (123 %) an. Es zeigt sich kein chronotroper Effekt durch Allopurinol und Disulfiram (Abb. 15d).

## Abbildungen

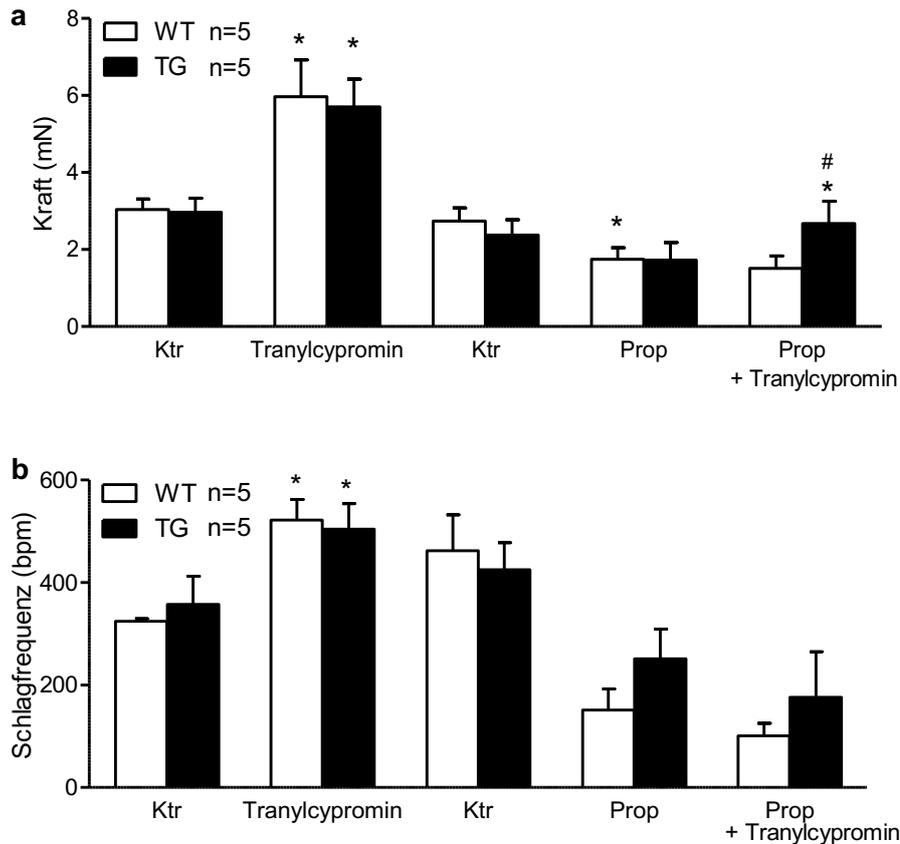


Abb. 14: inotrope und chronotrope Effekte von Tranylcypromin

Abgebildet sind die Kraftentwicklung elektrisch gereizter linker Vorhöfe a und die Veränderung der Schlagfrequenz b von Wildtyp- und transgenen Mausvorhofpräparaten mit Zugabe von 10  $\mu$ M Tranylcypromin mit und ohne Zugabe von 50  $\mu$ M Propranolol.

**a** Kontraktionskraft vor (Ktr) und nach Substanzapplikation;

Ordinate: Kontraktionskraft in mN

**b** Schlagfrequenz vor (Ktr) und nach Substanzapplikation;

Ordinate: Schlagfrequenz in bpm

\*  $p < 0,05$  vs. Ktr; #  $p < 0,05$  vs. WT



Dargestellt ist die Kraftentwicklung elektrisch gereizter linker Vorhöfe a von Wildtyp- und transgenen Mausvorhofpräparaten mit Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Allopurinol und 100  $\mu\text{M}$  Disulfiram (WT'/TG') und die jeweilige Lösungsmittelkontrolle (WT/TG). Anschließend erfolgte bei den elektrisch gereizten linken und rechten transgenen Vorhofpräparaten (TG/TG') eine kumulative Zugabe von 0,1 nM bis 1 mM 5-HT.

**a** Kontraktionskraft vor (Ktr) und nach Substanzapplikation;

Ordinate: Kontraktionskraft in mN

**b** Kontraktionskraft vor (Ktr) und nach Substanzapplikation;

Abszisse: 5-HT- Konzentration in  $\log(\text{M})$ ; Ordinate: Kontraktionskraft in mN

**c** Kontraktionskraft vor (Ktr) und nach Substanzapplikation;

Abszisse: 5-HT- Konzentration in  $\log(\text{M})$ ; Ordinate: Kontraktionskraft in %

**d** Schlagfrequenz vor (Ktr) und nach Substanzapplikation:

Abszisse: 5-HT- Konzentration in  $\log(\text{M})$ ; Ordinate: Schlagfrequenz in bpm

\*  $p < 0,05$  vs. Ktr; #  $p < 0,05$  vs. WT/TG

#### 4.1.4. Kontraktionsversuche mit Compound 48/80 und Tyramin

##### Linke Vorhöfe

Durch die kumulative Zugabe von Compound 48/80 war ein positiv inotroper Effekt an den transgenen Mauspräparaten zu verzeichnen. Da die Substanz möglicherweise auch eine Freisetzung von Noradrenalin und Adrenalin hervorruft, erfolgte vorher die Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  Propranolol zum Organbad, um diese Effekte zu unterdrücken. Bei transgenen linken Vorhofpräparaten erzielte eine Zugabe von 30  $\mu\text{M}$  Compound 48/80 von einer Ausgangskontraktionskraft von  $2,75 \pm 0,25$  mN (76 %) in Anwesenheit von Propranolol bereits einen Anstieg der Kontraktionskraft auf  $4,43 \pm 0,52$  mN (124 %) ( $p < 0,05$ ). Hier zeigt sich auch ein Unterschied im Vergleich zu Wildtyp-Präparaten ( $p < 0,05$ ), bei denen allerdings auch nach Propranolol-Zugabe ein Kontraktionskraft-Anstieg von  $2,14 \pm 0,26$  mN (74 %) auf  $2,49 \pm 0,21$  mN (88 %) messbar war ( $p < 0,05$ ). Diese Kraftzunahme ließ sich durch eine Konzentrationserhöhung auf 100  $\mu\text{M}$  Compound 48/80 bei beiden Präparatetypen noch steigern. Bei den transgenen Präparaten wurde bei dieser Konzentration eine Kontraktionskraft von  $5,86 \pm 0,7$  mN (162 %) und bei den Wildtyp-Präparaten eine Kontraktionskraft von  $3,69 \pm 0,27$  mN (133 %) erreicht ( $p < 0,05$ ) (Vgl. Abb. 16).

Im zweiten Teil dieses Experimentes wurde untersucht, ob die Wirkung von Compound 48/80 antagonisierbar ist. Dazu erfolgte eine erneute Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  Propranolol, um die Effekte von Adrenalin und Noradrenalin herabzusetzen. Dabei zeigte sich eine Kontraktionskraftabnahme bei den transgenen Präparaten von  $5,86 \pm 0,7$  mN (162 %) auf  $2,77 \pm 0,54$  mN (62 %) und bei den Wildtyp-Präparaten von  $3,69 \pm 0,27$  mN (133 %) auf  $1,74 \pm 0,38$  mN (59 %). Anschließend wurde untersucht, ob durch GR 113808, einen spezifischen 5-HT<sub>4a</sub>-Rezeptor-Antagonisten, die

Kontraktionskraft noch weiter gesenkt werden kann. Durch die Zugabe von 10 nM GR 113808 wurde eine Abnahme der Kontraktionskraft bei den transgenen Vorhofpräparaten von  $2,77 \pm 0,54$  mN (62 %) auf  $1,55 \pm 0,28$  mN (35 %) erzielt ( $p < 0,05$ ). Bei den Wildtyp-Präparaten zeigte GR 113808 keine Kontraktionskraftverminderung von  $1,74 \pm 0,38$  mN (59 %) auf  $1,42 \pm 0,22$  mN (49 %).

Eine weitere untersuchte Substanz, die eine unspezifische Katecholaminfreisetzung hervorruft, war Tyramin. Um mögliche Effekte von Adrenalin und Noradrenalin zu vermeiden, erfolgte auch hier zuerst eine Vorinkubation mit 50  $\mu$ M Propranolol. Diese bewirkte bei den Wildtyp-Präparaten eine Kontraktionskraftabnahme von  $1,35 \pm 0,2$  mN (100 %) auf  $1,12 \pm 0,28$  mN (78 %) und bei den transgenen Vorhofpräparaten von  $2,05 \pm 0,46$  mN (100 %) auf  $1,52 \pm 0,31$  mN (77 %). Die anschließende Applikation von 50  $\mu$ M Tyramin erzielte dann bei den transgenen Präparaten einen positiv inotropen Effekt auf  $1,94 \pm 0,44$  mN (98 %), aber nicht bei den Wildtyp-Präparaten ( $1,12 \pm 0,28$  mN (78 %) versus  $0,99 \pm 0,28$  mN (68 %)) (Abb. 17a).

### **Rechte Vorhöfe**

Rechten Vorhofpräparate, sowohl die von transgenen als auch die von Wildtyp-Mäusen, tolerierten die Zugabe von Compound 48/80 in kumulativer Dosierung nur sehr schlecht und reagierten frühzeitig mit Arrhythmien oder Asystolie, wodurch eine Auswertung nicht möglich war und deswegen auf eine Darstellung dieser Ergebnisse verzichtet wird.

Versuche mit Tyramin an den rechten Vorhofpräparaten waren auf Grund der hohen Propranolol-Konzentration und der Versuchsanordnung nur schwer auswertbar. Die Versuche fanden nach dem Tranylcypromin-Versuch statt. Die rechten Vorhöfe waren bereits bradykard, deswegen konnte nur eine relative Schlagfrequenzänderung für die Auswertung verwendet werden. Dennoch zeigte sich hier, ähnlich der Wirkung am linken Vorhof, ein positiv chronotroper Effekt bei den transgenen Präparaten. Von einer Schlagfrequenz von  $109 \pm 27$  bpm (100 %) zu Beginn war nach Zugabe von 50  $\mu$ M Propranolol eine Verminderung der Schlagfrequenz auf  $53 \pm 23$  bpm (44 %) festzustellen. Durch die Applikation von 50  $\mu$ M Tyramin konnte die Schlagfrequenz auf  $93 \pm 36$  bpm (80 %) gesteigert werden. Die Wildtyp-Präparate hingegen zeigten anfangs eine Schlagfrequenz von  $94 \pm 9,6$  bpm (100 %), diese fiel dann nach der Applikation von 50  $\mu$ M Propranolol auf  $54 \pm 7$  bpm (59 %) und war durch die Zugabe von 50  $\mu$ M Tyramin nicht mehr steigerbar, sondern sank weiter auf  $42 \pm 13$  bpm (48 %). Der Effekt von Tyramin nach Propranolol am rechten transgenen Vorhofpräparat war also unterschiedlich ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zum Wildtyp-Präparat (Abb. 17b).

## Abbildungen

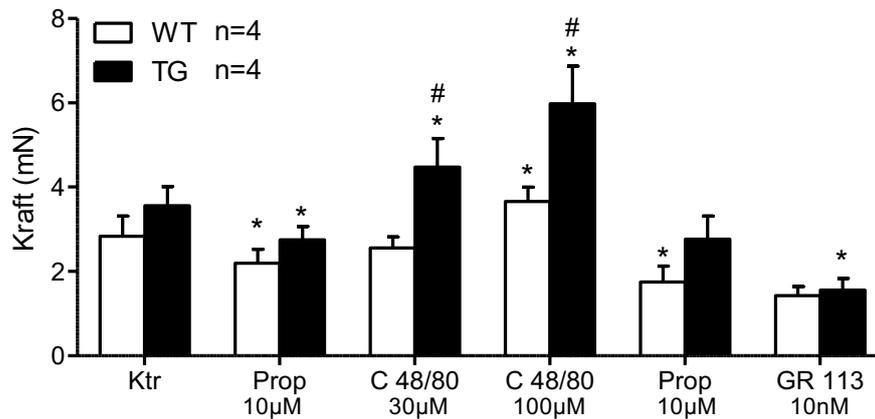


Abb. 16: inotroper Effekt von Compound 48/80

Darstellung der Kraftentwicklung elektrisch gereizter linker Vorhöfe von Wildtyp- und transgenen Mausvorhofpräparaten mit Zugabe von 10 µM Propranolol und kumulativer Zugabe von Compound 48/80.

Kontraktionskraft vor (Ktr) und nach Substanzapplikation;

Ordinate: Kontraktionskraft in mN

\* p < 0,05 vs. Ktr; # p < 0,05 vs. WT

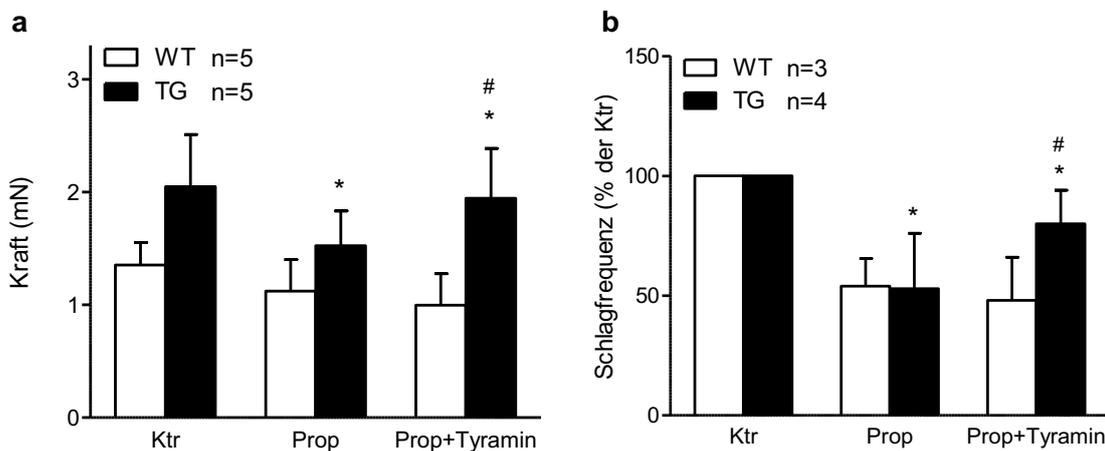


Abb. 17: inotrope und chronotrope Effekte von Tyramin

Dargestellt ist die Kraftentwicklung elektrisch gereizter linker Vorhöfe a und die Veränderung der Schlagfrequenz b von Wildtyp- und transgenen Mausvorhofpräparaten mit Zugabe von 50 µM Propranolol und 50 µM Tyramin.

**a** Kontraktionskraft vor (Ktr) und nach Substanzapplikation;

Ordinate: Kontraktionskraft in mN

**b** Schlagfrequenz vor (Ktr) und nach Substanzapplikation;

Ordinate: Schlagfrequenz in %

\* p < 0,05 vs. Ktr; # p < 0,05 vs. WT

#### 4.1.5. Kontraktionsversuche mit Fluoxetin

##### Linke Vorhöfe

Durch alleinige Zugabe von Fluoxetin ist sowohl bei Wildtyp-, als auch bei transgenen Präparaten ein positiv inotroper Effekt auslösbar ( $p < 0,05$ ). Die Wildtyp-Präparate zeigten einen Kraftanstieg von  $2,45 \pm 0,2$  mN (100 %) auf  $2,73 \pm 0,27$  mN (110 %), bei den transgenen Präparaten konnte die Ausgangskontraktionskraft von  $2,42 \pm 0,35$  mN (100 %) auf  $2,81 \pm 0,37$  mN (122 %) gesteigert werden (Abb. 18a).

Bei den transgenen Präparaten schloss sich dann eine kumulative Zugabe von Serotonin an. Hier zeigte sich eine Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve durch Fluoxetin (TG'). Bereits bei einer Konzentration von 3 nM Serotonin zeigten die Präparate einen deutlichen Anstieg der Kontraktionskraft von  $2,55 \pm 0,36$  mN (100 %) auf  $4,84 \pm 0,5$  mN (196 %) ( $p < 0,05$ ). Hingegen zeigen die transgenen Präparate ohne Fluoxetin erst ab einer Konzentration von 10 nM einen vergleichbaren Kontraktionskraftanstieg von einer Ausgangskraft von  $3,38 \pm 0,55$  mN (100 %) auf  $5,06 \pm 0,61$  mN (169 %) ( $p < 0,05$ ). Den Effekt verdeutlicht auch die Betrachtung der Veränderung der  $pEC_{50}$ -Werte: Mit Fluoxetin lag der  $pEC_{50}$ -Wert bei 8,64 (Konfidenzintervall 9,02 bis 8,26) und ohne Fluoxetin bei 7,77 (Konfidenzintervall 7,96 bis 7,57) ( $p < 0,05$ ) (Abb. 18b & c).

Aufgrund der Versuchsanordnung konnte auch eine vergleichende Darstellung von Fluoxetin als „ersten Effekt“ (TG') und als „zweiten Effekt“ (TG''), nach bereits abgelaufener Zugabe von Serotonin und anschließendem Auswaschen gemacht werden. Hier war eine Abnahme der Ausgangskontraktionskraft nach dem Auswaschen aller vorher applizierter Substanzen messbar. Die transgenen Präparate kontrahierten nur mit einer Kraft von  $0,49 \pm 0,33$  mN (100 %), im Vergleich dazu betrug die Ausgangskontraktionskraft der Präparate, die Fluoxetin als erste Substanz erhielten,  $2,55 \pm 0,36$  mN (100 %). Auf die dann ansteigenden Konzentrationen von Serotonin reagierten beide Präparate positiv inotrop, allerdings blieben die Präparate mit Fluoxetin als „zweitem Effekt“ immer mit der Maximalkraft schwächer als die, die Fluoxetin als ersten Effekt erhielten (Abb. 18d). Wenn man die relative Darstellung in Abb. 15e betrachtet, war die Linksverschiebung nicht mehr nachweisbar, wenn Fluoxetin als „zweite Substanz“ gegeben wurde im Vergleich zu dem Versuch, bei welchem die Präparate Fluoxetin als „erste Substanz“ erhalten haben.

##### Rechte Vorhöfe

Auf die rechten Vorhöfe hatte Fluoxetin einen negativ chronotropen Effekt. Im Versuch mit Wildtyp- und transgenen Präparaten fielen beide mit der Schlagfrequenz ab, die

Wildtyppräparate von  $335 \pm 30$  bpm (100 %) auf  $240 \pm 27$  bpm (76 %) und die transgenen Präparate von  $353 \pm 19$  bpm (100 %) auf  $231 \pm 56$  bpm (63 %). Im Versuch mit der kumulativen Serotonin-Zugabe zeigten dann die transgenen Präparate, die Fluoxetin erhalten hatten ebenfalls eine minimale Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve im Vergleich zu den transgenen Präparaten ohne Fluoxetin, die maximale Schlagfrequenz von  $268 \pm 51$  bpm (120 %) war aber geringer als die maximale Schlagfrequenz der transgenen Präparate ohne Fluoxetin mit  $540 \pm 66$  bpm (143 %). Ein zweiter Effekt war nicht auswertbar, weil nach der Applikation von 1 mM Serotonin aus dem ersten Versuch und anschließendem Auswaschen zahlreiche Arrhythmien auftraten, sodass keine Auswertung erfolgen konnte.

## Abbildungen

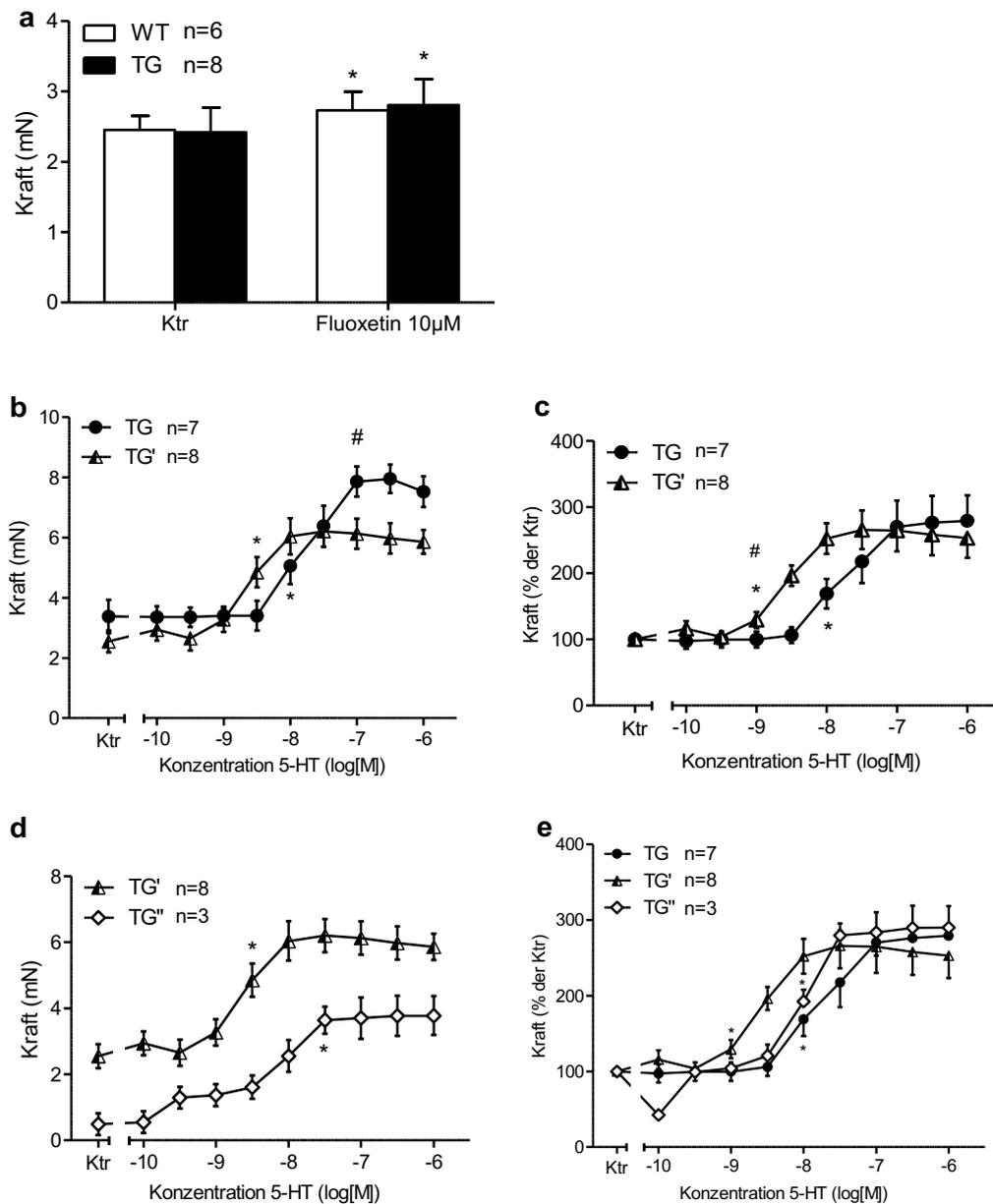


Abb. 18: inotrope Wirkung von Fluoxetin

Abgebildet ist die Kraftentwicklung elektrisch gereizter linker Vorhöfe von Wildtyp- (WT) und transgenen (TG) Mausvorhofpräparaten mit Zugabe von 10 µM Fluoxetin. Im Anschluss erhielten die transgenen Präparate eine kumulative Zugabe von 0,1 nM bis 1 mM 5-HT. TG' 5-HT als „erste Substanz“, TG'' 5-HT als „zweite Substanz“

**a** Kontraktionskraft vor (Ktr) und nach Substanzapplikation;

Ordinate: Kontraktionskraft in mN

**b** Kontraktionskraft vor (Ktr) und nach Substanzapplikation;

Abszisse: 5-HT- Konzentration in log(M); Ordinate: Kontraktionskraft in mN

**c** Kontraktionskraft vor (Ktr) und nach Substanzapplikation;

Abszisse: 5-HT- Konzentration in log(M); Ordinate: Kontraktionskraft in %

**d** Kontraktionskraft vor (Ktr) und nach Substanzapplikation;

Abszisse: 5-HT- Konzentration in log(M); Ordinate: Kontraktionskraft in mN

**e** Kontraktionskraft vor (Ktr) und nach Substanzapplikation;

Abszisse: 5-HT- Konzentration in log(M); Ordinate: Kontraktionskraft in mN

\* p < 0,05 vs. Ktr; # p < 0,05 vs. TG

#### 4.1.6. Kontraktionsversuche mit Decynium 22 und Cortison

##### Linke Vorhöfe

Zunächst fanden Versuche mit Decynium 22 und seinem Lösungsmittel DMSO an Wildtyppräparaten statt, um die Effekte an den transgenen Präparaten besser abschätzen zu können. Hierbei zeigte sich bei den Wildtyppräparaten, die 10  $\mu$ l DMSO als Lösungsmittelkontrolle erhielten, ein leicht negativ inotroper Effekt, die Kontraktionskraft sank von  $3,54 \pm 0,25$  mN (100 %) auf  $3,14 \pm 0,15$  mN (88 %). Die Wildtyppräparate, welchen 10  $\mu$ M Decynium 22 appliziert wurde, stiegen mit ihrer Kontraktionskraft leicht von  $3,11 \pm 0,59$  mN (100 %) auf  $3,65 \pm 0,62$  mN (118 %) an. Dieser Effekt war aber transient und nach 30 Min. nicht mehr vorhanden (Abb. 19a).

Anschließend folgten die Versuche mit 10  $\mu$ M Decynium 22 an transgenen Präparaten und auch diese reagierten mit einem transienten positiv inotropen Effekt mit anschließender Kraftabnahme (Wert nach 30 min). Die Kontraktionskraft stieg zunächst von  $2,08 \pm 0,30$  mN (100 %) auf  $2,63 \pm 0,22$  mN (126 %) nach 10 Minuten an ( $p < 0,05$ ), allerdings kam es dann zu einem verstärkten Abschlaffen der Kontraktionskraft, sodass diese nach 30 Minuten nur noch  $1,75 \pm 0,19$  mN (86 %) betrug (Abb. 19b).

Im Vergleich zeigt sich kein Unterschied in der Effektstärke zwischen transgenen und Wildtyp-Präparaten (Abb. 19b).

Die Zugabe von 10  $\mu$ M Cortison bewirkte bei den transgenen Präparaten eine Kontraktionskraftabnahme von  $4,37 \pm 0,51$  mN (100 %) auf  $3,75 \pm 0,45$  mN (85 %) ( $p < 0,05$ ). Die transgenen Präparate, die 10  $\mu$ l DMSO als Lösungsmittelkontrolle erhielten, sanken mit ihrer Kontraktionskraft von  $4,05 \pm 0,41$  mN (100 %) auf  $3,2 \pm 0,35$  mN (78 %) ( $p < 0,05$ ). Das heißt, der Cortison-Effekt war ein Lösungsmittelleffekt.

Bei der nachfolgenden kumulativen Zugabe von Serotonin von 100 pM bis 1  $\mu$ M war der positiv inotrope Effekt bei den transgenen Präparaten, welche Cortison erhalten hatten, vermindert im Vergleich zu den Präparaten, welche nur DMSO erhalten hatten (Abb. 20a). Während bei diesen der  $pEC_{50}$ -Wert bei  $8,36 \pm 0,29$  lag, betrug er bei den Präparaten mit Cortison-Applikation  $7,98 \pm 0,31$ , was eine Rechtsverschiebung andeutet. Der maximale Effekt von 5-HT war durch Cortison vermindert. Bei den transgenen Präparaten, die 10  $\mu$ l DMSO erhielten, kam es zu einem Kontraktionskraftanstieg von  $3,20 \pm 0,35$  mN (100 %) auf  $10,81 \pm 1,12$  mN (345 %) bei einer maximalen Konzentration von 1  $\mu$ M Serotonin. Die transgenen Präparate, die

Cortison erhalten hatten, zeigten einen Kontraktionskraftanstieg von  $3,76 \pm 0,45$  mN (100 %) auf  $9,76 \pm 0,81$  mN (270 %) (Abb 20a).

### **Rechte Vorhöfe**

Die Versuche an den rechten Vorhofpräparaten der Wildtypen zeigten eine Abnahme der Schlagfrequenz durch 10  $\mu$ M Decynium 22, von  $351 \pm 19$  bpm (100 %) auf  $149 \pm 18$  bpm (43 %) nach 10 Minuten und auf  $82 \pm 2$  bpm (23 %) nach 30 Minuten ( $p < 0,05$ ). DMSO hingegen bewirkte keine Abnahme der Schlagfrequenz ( $360 \pm 34$  bpm (100 %) versus  $340 \pm 20$  bpm (95 %)).

In den folgenden Versuchen mit den transgenen Präparaten zeigten sich ähnliche Ergebnisse, wie bei den Wildtypen. Die Schlagfrequenz sank von  $392 \pm 21$  bpm (100 %) durch Zugabe von 10  $\mu$ M Decynium 22 nach 10 Minuten bereits auf  $253 \pm 53$  bpm (64 %) ab, nach 30 Minuten sogar auf  $234 \pm 57$  bpm (60 %).

Im Vergleich mit den Wildtyp-Präparaten wiesen die transgenen Präparate eine verminderte Abschwächung durch Decynium 22 auf (Abb. 19c).

Sowohl die Zugabe von 10  $\mu$ M Cortison, als auch von 10  $\mu$ l DMSO zur Lösungsmittelkontrolle, bewirkte bei rechten Vorhöfen transgener Mäuse eine Schlagfrequenzabnahme. Hierbei sank die Schlagfrequenz bei den Präparaten, welche DMSO erhielten, von  $360 \pm 24$  bpm (100 %) auf  $320 \pm 20$  bpm (89 %). Eine vergleichbare Abnahme der Schlagfrequenz ergab die Cortison-Zugabe von  $390 \pm 30$  bpm (100 %) auf  $360 \pm 24$  bpm (93 %).

Die anschließende kumulative Zugabe von Serotonin (100 pm bis 1  $\mu$ M) hatte einen positiv chronotropen Effekt und auch hier zeigte sich eine leichte Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve (Abb. 20b). So lag auch der  $pEC_{50}$ -Wert der Kurve mit DMSO-Zugabe bei 8,23 (KI von 8,39 bis 8,07), der  $pEC_{50}$ -Wert der Kurve mit Cortison-Zugabe aber bei 7,67 (KI von 7,87 bis 7,48).

Die relative Schlagfrequenzzunahme war bei beiden Versuchsgruppen gleich. Die transgenen Präparate, welche mit DMSO behandelt worden waren, nahmen von einer Schlagfrequenz von  $320 \pm 20$  bpm (100 %) bis zum Erreichen der Endkonzentration von 1  $\mu$ M Serotonin auf  $460 \pm 20$  bpm (144 %) zu. Die transgenen Präparate, denen Cortison appliziert worden war, zeigten eine Schlagfrequenzerhöhung von  $360 \pm 24$  bpm (100 %) auf  $600 \pm 24$  bpm (168 %) an.

## Abbildungen

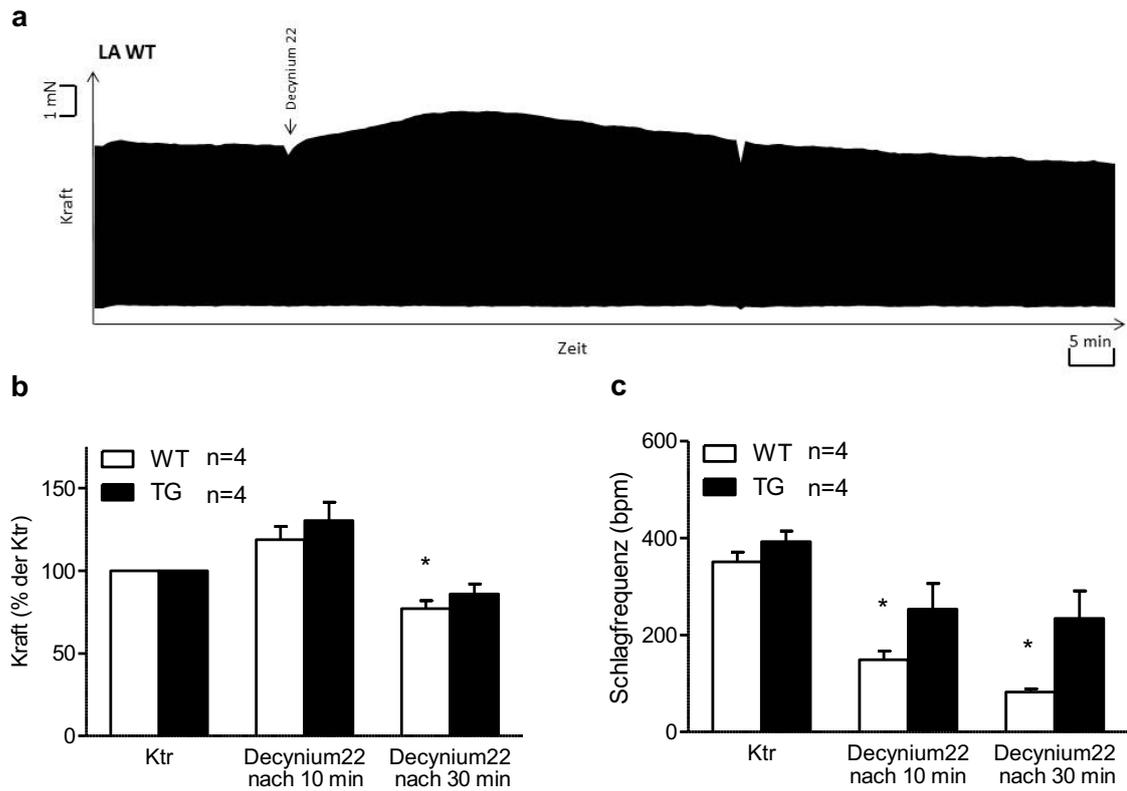


Abb. 19: inotrope und chronotrope Wirkung von Decynium 22

Darstellung der Kraftentwicklung elektrisch gereizter linker Vorhöfe a,b und der Veränderung der Schlagfrequenz c von Wildtyp- und transgenen Mausvorhofpräparaten mit Zugabe von 10  $\mu$ M Decynium 22.

**a** Abgebildet ist ein originales Mechanogramm eines linken Vorhofpräparates (LA) von einer Wildtyp-(WT)-Maus mit der Zugabe von 10  $\mu$ M Decynium 22

**b** Kontraktionskraft vor (Ktr) und nach Substanzapplikation;

Ordinate: Kontraktionskraft in %

**c** Schlagfrequenz vor (Ktr) und nach Substanzapplikation;

Ordinate: Schlagfrequenz in bpm

\*  $p < 0,05$  vs. Ktr

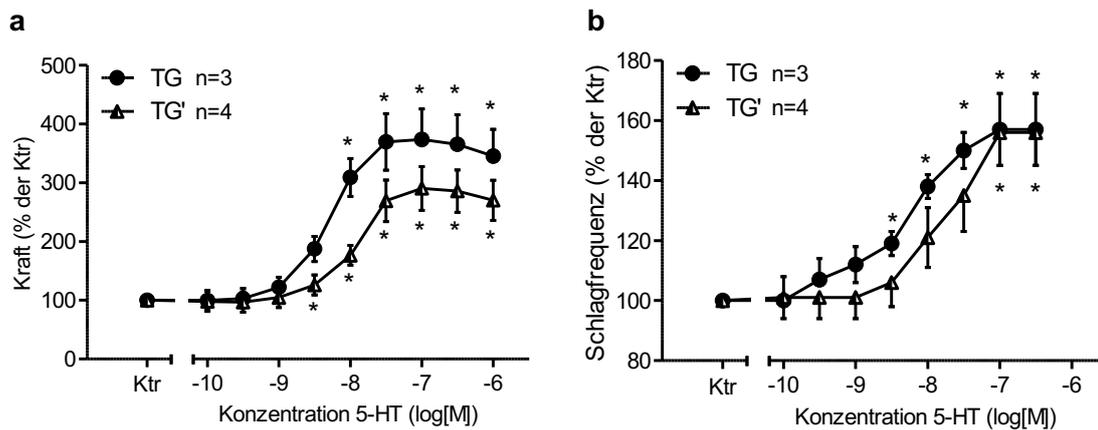


Abb. 20: inotrope und chronotrope Wirkung von Cortison

Abgebildet ist die Kraftentwicklung elektrisch gereizter linker Vorhöfe a und der Veränderung der Schlagfrequenz b von transgenen Mausvorhofpräparaten mit kumulativer Zugabe von 0,1 nM bis 1 mM 5-HT nach Zugabe von 10  $\mu$ M Cortison (TG').

- a** Kontraktionskraft vor (Ktr) und nach Substanzapplikation;  
 Abszisse: 5-HT- Konzentration in log(M); Ordinate: Kontraktionskraft in %
- b** Schlagfrequenz vor (Ktr) und nach Substanzapplikation;  
 Abszisse: 5-HT- Konzentration in log(M); Ordinate: Schlagfrequenz in %
- \*  $p < 0,05$  vs. Ktr

#### 4.1.7. Echokardiografische Versuche an der Maus

Transgene Mäuse reagierten sowohl mit der Schlagfrequenz, als auch mit der Ejektionsfraktion (EF), einem Maß für die Kontraktionskraft des linken Ventrikels, auf die Injektion von 100  $\mu$ l 5-Hydroxytryptophan (5-HTP, 10 mM). Dabei stiegen die Schlagfrequenz von basal  $528 \pm 26$  bpm auf  $605 \pm 35$  bpm und auch die EF von  $74,6 \pm 2,1$  % auf  $84,7 \pm 3,6$  % an ( $p < 0,05$ ) (Abb. 18a, b). Bei den Wildtyp-Mäusen zeigte sich bei der intraperitonealen Injektion von 5-HTP kaum ein Effekt, die Schlagfrequenz nahm sogar leicht von  $506 \pm 18$  bpm auf  $486 \pm 41$  bpm ab, die EF war unverändert ( $65,3 \pm 2,8$  % gegenüber  $69,5 \pm 5,6$  %).

Auf die Injektion von 100  $\mu$ l Serotonin (10 mM) reagierten die Wildtyp-Mäuse mit einer Herzschlagfrequenzzunahme von  $486 \pm 41$  bpm auf  $594 \pm 14$  bpm ( $p < 0,05$ ) und mit einer EF-Zunahme von  $69,5 \pm 5,6$  % auf  $85,1 \pm 0,43$  % ( $p < 0,05$ ). Bei den transgenen Mäusen zeigte sich ebenfalls eine Zunahme der Schlagfrequenz von  $605 \pm 35$  bpm auf  $659 \pm 30$  bpm ( $p < 0,05$ ) und auch der EF von  $84,7 \pm 3,6$  % auf  $93,3 \pm 1,8$  % ( $p < 0,05$ ) (Abb. 21a, b).

Am Ende der Versuche erfolgte immer eine intraperitoneale Injektion von 100  $\mu$ l Isoprenalin (10 mM) als Positivkontrolle. Hier stieg die Schlagfrequenz der Wildtypmäuse auf  $656 \pm 2$  bpm ( $p < 0,05$  vs basal) und die EF auf  $93,5 \pm 1,8$  % ( $p < 0,05$  vs basal). Bei den transgenen Mäusen konnte die Herzschlagfrequenz

ebenfalls noch weiter erhöht werden, auf  $715 \pm 46$  bpm ( $p < 0,05$ ), der maximal mögliche EF-Wert war aber durch die vorherige Serotonin-Injektion schon erreicht und betrug  $93,5 \pm 0,9$  % (Abb. 21a, b).

Bei den EF-Werten bestand bereits unter basalen Bedingungen ein Unterschied zwischen Wildtyp- und transgenen Mäusen, so auch für den EF-Wert mit 5-HTP- und Serotonin-Injektion ( $p < 0,05$ ) (Abb 21a).

## Abbildungen

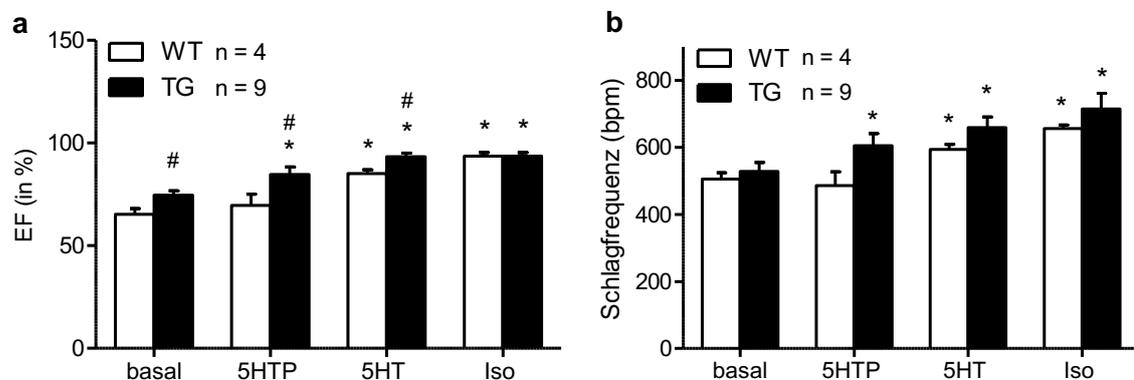


Abb. 21: inotrope und chronotrope Wirkung von 5-HTP, 5-HT und Isoprenalin

Darstellung der Kraftentwicklung a und der Veränderung der Herzschlagfrequenz b von Wildtyp- und transgenen Mäusen mit Zugabe von  $100 \mu\text{M}$  5-HTP,  $100 \mu\text{M}$  5-HT und  $100 \mu\text{M}$  Isoprenalin.

**a** Ejektionsfraktion vor (Ktr) und nach Substanzapplikation;  
Ordinate: EF in %

**b** Schlagfrequenz vor (Ktr) und nach Substanzapplikation;  
Ordinate: Schlagfrequenz in bpm

\*  $p < 0,05$  vs. Ktr; #  $p < 0,05$  vs. WT

## 4.2. Versuche an menschlichen Vorhofpräparaten

Die Applikation von 100  $\mu\text{M}$  5-Hydroxytryptophan zu elektrisch gereizten menschlichen Trabekelmuskeln aus dem rechten Vorhof erhöhte die Kontraktionskraft von  $9,2 \pm 0,55 \text{ mN}$  (100 %) auf  $13,31 \pm 1,48 \text{ mN}$  (148 %) ( $p < 0,05$ ) (Abb. 22a, b).

Durch anschließende Zugabe von GR 113808 war es möglich, den Effekt zu antagonisieren. 10 nM GR 113808 senkten die Kontraktionskraft von  $13,22 \pm 2,9 \text{ mN}$  (100 %) auf  $6,43 \pm 1,53 \text{ mN}$  (56 %) (Abb. 22a, b).

Einige menschliche Trabekelmuskelpräparate reagierten nicht auf 5-Hydroxytryptophan. Diese erhielten im Anschluss 1  $\mu\text{M}$  Serotonin. Dadurch ließ sich bei diesen Präparaten eine Zunahme der Kontraktionskraft von  $6,35 \pm 1,23 \text{ mN}$  (100 %) auf  $9,99 \pm 0,45 \text{ mN}$  (187 %) messen ( $p < 0,05$ ). Auch daran schloss sich ein Antagonisierungsversuch mit GR 113808 an. Durch 10 nM GR 113 war die Kontraktionskraft von  $10,59 \pm 0,97 \text{ mN}$  (113 %) auf  $6,28 \pm 0,35 \text{ mN}$  (68 %) senkbar (Abb. 23a, b).

### Abbildungen

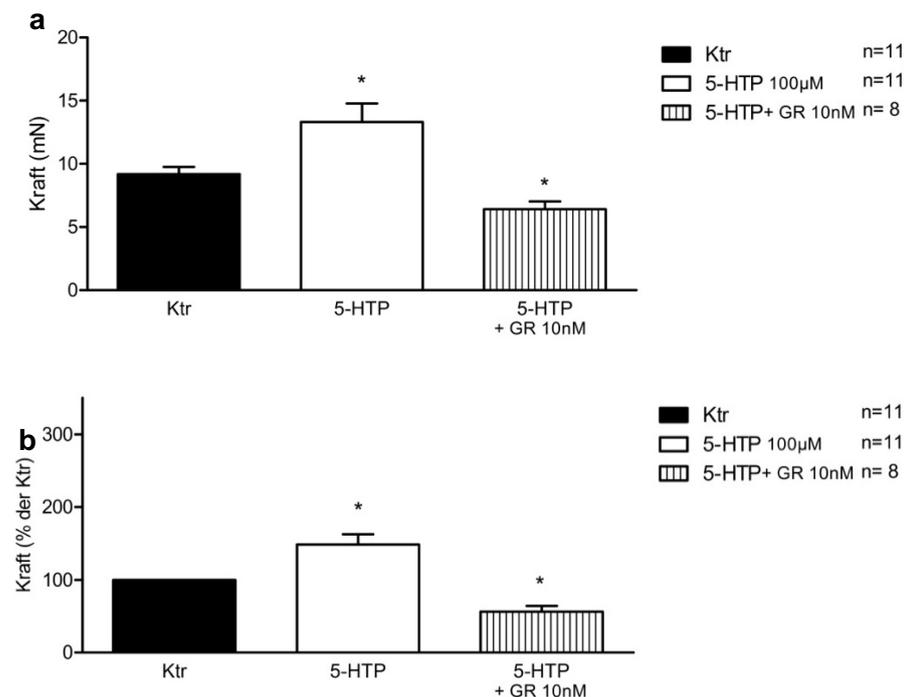


Abb. 22: inotrope Effekte von 5-HTP und GR 113808 beim Menschen

Darstellung der Kraftentwicklung elektrisch gereizter menschlicher Trabekelpräparaten nach Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  5-HTP und 10 nM oder 10  $\mu\text{M}$  GR 113808.

**a** Kontraktionskraft vor (Ktr) und nach Substanzapplikation;

Ordinate: Kontraktionskraft in mN

**b** Kontraktionskraft vor (Ktr) und nach Substanzapplikation;

Ordinate: Kontraktionskraft in %

\*  $p < 0,05$  vs. Ktr

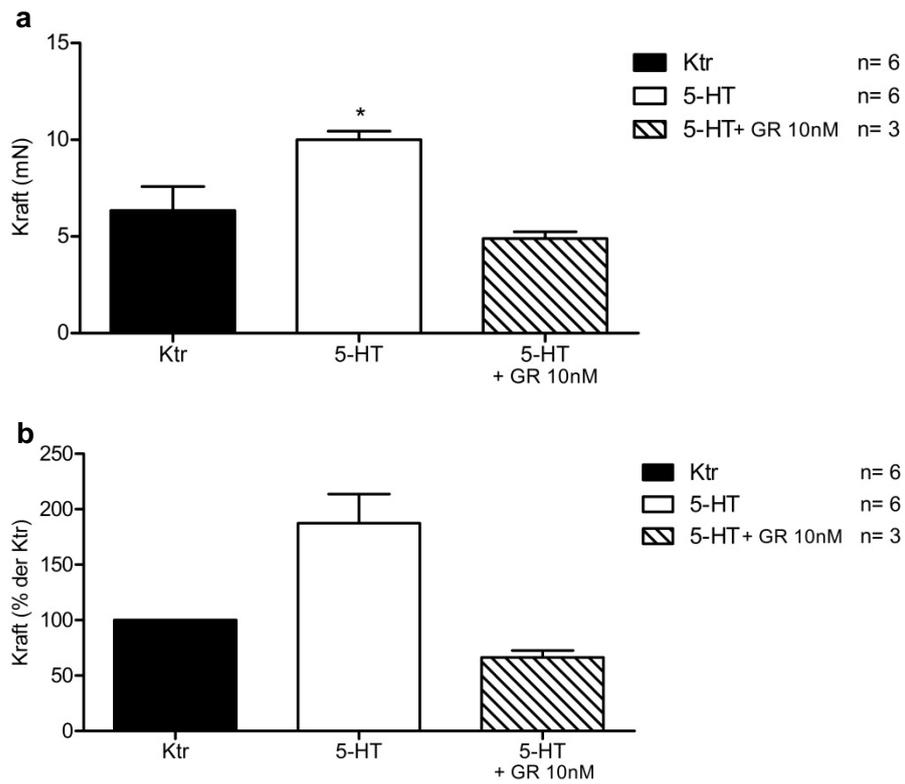


Abb. 23: inotrope Effekte von 5-HT und GR 113808 beim Menschen

Abgebildet ist die Kraftentwicklung elektrisch gereizter Trabekelpräparaten mit Zugabe von 1  $\mu$ M 5-HT und 10 nM GR 113808.

**a** Kontraktionskraft vor (Ktr) und nach Substanzapplikation;

Ordinate: Kontraktionskraft in mN

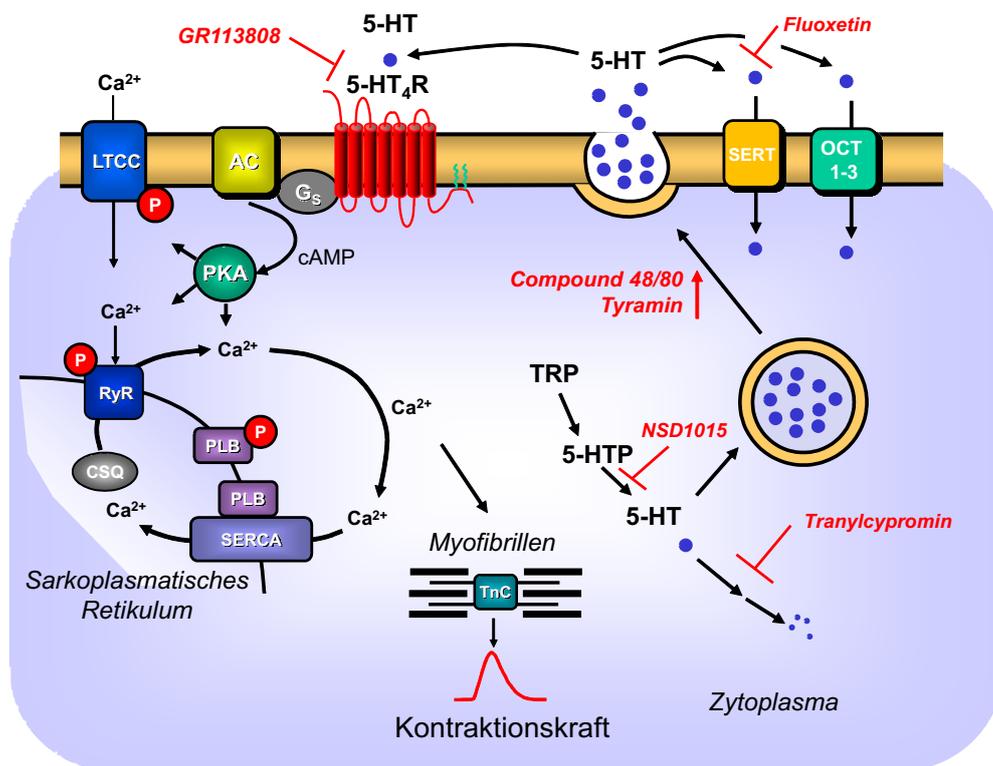
**b** Kontraktionskraft vor (Ktr) und nach Substanzapplikation;

Ordinate: Kontraktionskraft in %

\*  $p < 0,05$  vs. Ktr

## 5. Diskussion

In vorangegangenen Versuchen wurde die Existenz von Serotonin in den Kardiomyozyten und das funktionelle Vorhandensein und die in vitro-Aktivität der für die zur Serotonin-Synthese notwendigen Enzyme Tryptophan-Hydroxylase und 5-Hydroxytryptophan-Decarboxylase bereits nachgewiesen (Pönicke et al. 2012). Darauf aufbauend wurde nun untersucht, ob die Enzyme auch in Organpräparaten und in vivo wirksam sind.



5-HT Metabolismus und Signaltransduktion via 5-HT<sub>4a</sub> Rezeptoren in Kardiomyozyten.

Abb. 24: modifizierte Signaltransduktion über den 5-HT<sub>4a</sub>-Rezeptor

Darstellung der Signaltransduktion über den 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor

- AC, Adenylatzyklase;
- CSQ, Calsequestrin;
- G<sub>s</sub>, stimulatorisches G-Protein;
- LTCC, L-Typ-Kalzium-Kanal;
- P, Phosphorylierung;
- PKA, Proteinkinase A;
- PLB, Phospholamban;
- RyR, Ryanodin-Rezeptor;
- SERCA, SR Kalzium ATPase;
- SERT, Serotonintransporter;
- TnC, Troponin C;
- TRP, L-Tryptophan;
- 5-HT, Serotonin;
- 5-HTP, 5-Hydroxytryptophan

### **5.1. Diskussion der angewandten Methoden**

Da menschliche Herzmuskelpräparate nur selten verfügbar sind und ohne einen intakten Sinusknoten auch keinen Aufschluss über eine mögliche chronotrope Wirkung geben, war für die Untersuchung der Wirkung von Serotonin am Organismus ein geeignetes Tiermodell nötig. Bisher wurde vorwiegend am kardialen 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor des Schweines geforscht, weil dieser dem menschlichen 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor sehr ähnlich ist (Kaumann 1990). Dass der 5-HT<sub>4a</sub>-Rezeptor der Serotonin-Rezeptor am Herzen ist, zeigten auch die Versuche, bei denen die 5-HT-Effekte durch den spezifischen 5-HT<sub>4a</sub>-Rezeptor-Antagonisten GR113808 aufgehoben werden konnten. Um den humanen 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor genauer untersuchen zu können, wurde er, wie im Methodenteil beschrieben, in das Mausgenom eingebracht (Gergs et al. 2010). An den transgenen Mäuseherzen war eine getrennte Messung der inotropen Wirkung von 5-HT durch Kontraktionskraftveränderungen der linken Vorhofpräparate und der chronotropen Wirkung von Serotonin durch Schlagfrequenzveränderungen der rechten Vorhofpräparate möglich. Allerdings wurden bei den Kontraktionsversuchen nur diese isolierten Teile des Mausherzens, nämlich die Herzvorhöfe, untersucht. Die Mausvorhöfe sind klein und man muss sie mit großer Sorgsamkeit und Vorsicht präparieren, um die Präparate und besonders den Sinusknoten nicht zu schädigen, sonst resultieren bereits zu Versuchsbeginn Arrhythmien und eine abgeschwächte Kontraktionskraft. Die Kontraktionsversuche an den Maus-Vorhofpräparaten können die Wirkungsweise von Serotonin am 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor verdeutlichen, aber nicht die Wirkung am gesamten intakten Herzen klären. Deswegen sind teilweise auch zusätzlich echokardiografische Untersuchungen an lebenden, narkotisierten Mäusen durchgeführt worden, um zu untersuchen, wie das Herz in vivo auf 5-HT und 5-HTP reagiert.

Um die Eigenschaften der Rezeptoren und damit die Serotonin-Wirkung am Menschen besser verstehen zu können, wurden auch Versuchsabläufe bei den Mauspräparaten analog mit humanem Trabekeln rechter Vorhöfe durchgeführt.

### **5.2. Wirkung von Tryptophan, 5-Hydroxytryptophan und NSD1015**

Die Zugabe von Tryptophan zeigte keine Effekte bei transgenen oder Wildtyp-Präparaten. Über die Tryptophan-Hydroxylase (TPH1) läuft der geschwindigkeitsbestimmende Syntheseschritt im peripheren Gewebe, wie dem Darm, der Milz, dem Herz oder dem Thymus (Walther und Bader 2003). Die Tryptophan-Hydroxylase war auch in Herzgewebeproben von Mäusen nachweisbar (Pönicke et al. 2012). Weiterhin konnte das Enzym mittels Western-Blot und Immunhistochemie auch im Herzen des

Menschen und der Maus nachgewiesen werden. Eine messbare inotrope oder chronotrope Wirkung zeigte sich während der 30 Minuten Inkubationszeit nicht. Möglicherweise ist die natürlich in den Kardiomyozyten vorhandene Konzentration von Tryptophan bereits so hoch, dass auch durch eine weitere Zugabe keine wesentliche Änderung der Serotonin-Synthese zustande kommt, oder das Tryptophan wurde in der Zeit über andere Stoffwechselreaktionen verbraucht.

Die 5-Hydroxytryptophan-Decarboxylase konnte im Westernblot und immunhistochemisch ebenfalls im Herzgewebe von Mensch und Maus nachgewiesen werden. Anders als bei Tryptophan zeigte sich durch 5-Hydroxytryptophan im Kontraktionsversuch an transgenen Mausherzpräparaten eine positiv inotrope Wirkung, aber bei einmaliger Applikation kein positiv chronotroper Effekt. Bei kumulativer Gabe steigender Konzentrationen von 5-Hydroxytryptophan zeigte sich auch ein geringer positiv chronotroper Effekt, was darauf hinweist, dass auch bei diesem Experiment eine gewisse Zeit, zumindest für eine Reaktion am Sinusknoten, nötig ist. Um die Wirkung noch besser beurteilen zu können, erfolgte bei lebenden, narkotisierten transgenen und Wildtyp-Mäusen die intraperitoneale Injektion von 5-Hydroxytryptophan unter echokardiografischer Kontrolle. Dabei zeigte sich ein kontraktilitätssteigernder und die Schlagfrequenz erhöhender Effekt bei den transgenen Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Die erzielten Effekte waren keine Maximaleffekte, denn sie ließen sich sowohl durch die intraperitoneale Injektion von Serotonin, wie auch von Isoprenalin noch steigern. Auch andere Studien zeigten bisher, dass die erzielten Effekte durch 5-HTP schwächer ausgeprägt sind, als durch 5-HT, vermutlich, weil es parallel bereits zum Abbau des 5-HTP kommt (Stier et al. 1984; Gergs et al. 2017). Generell ist das Ergebnis vereinbar mit der Annahme, dass 5-Hydroxytryptophan durch die 5-Hydroxytryptophan-Decarboxylase zu Serotonin metabolisiert wird (Übersicht: Pranzatelli 1988). 5-HTP selbst wirkt am 5-HT<sub>4a</sub>-Rezeptor nicht agonistisch, deswegen ist ein direkter Effekt eher unwahrscheinlich (Übersicht: Hoyer et al. 1994; Pauwels 2003). Die Wildtyp-Mäuse reagierten nicht auf intraperitoneal injiziertes 5-Hydroxytryptophan, jedoch auf Serotonin. Wahrscheinlich ergibt sich diese Wirkung aber nicht direkt, denn die adulte Wildtyp-Maus besitzt keine funktionellen Serotonin-Rezeptoren am Herzen.

Die fehlende Wirkung von 5-Hydroxytryptophan nach vorheriger Applikation des Decarboxylase-Hemmers NSD1015 unterstreicht das Vorhandensein und die Wirkung dieses Enzyms in den Kardiomyozyten (Pandey et al. 1983; Pönicke et al. 2012). Das bedeutet, die Kardiomyozyten können 5-Hydroxytryptophan in die Zelle aufnehmen, es durch die 5-Hydroxytryptophan-Decarboxylase zu Serotonin umwandeln und dieser

Schritt kann unterbrochen werden. NSD1015 bewirkt außerdem einen positiv inotropen und chronotropen Effekt bei Wildtyp- und transgenen Mäusen, der dafür ursächliche Mechanismus ist bisher noch nicht geklärt.

Da in den Kardiomyozyten der Maus die Synthese von Serotonin nach 5-Hydroxytryptophan-Zugabe möglich war, sollte im nächsten Schritt überprüft werden, ob das in humanen Kardiomyozyten auch möglich ist. Auch die humanen Trabekelpräparate reagierten positiv inotrop auf 5-Hydroxytryptophan. Dieser Effekt war mit GR 113808 antagonisierbar, was bedeutet, dass der Effekt über den 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor vermittelt war. Allerdings gab es auch einige Präparate, die nicht auf 5-Hydroxytryptophan reagierten. Durch Serotonin war bei diesen Präparaten allerdings ein positiv inotroper Effekt auslösbar, was die Frage aufwirft, warum das 5-Hydroxytryptophan bei manchen Präparaten und Patienten wirkt und bei anderen nicht. Bei zwei Präparaten von männlichen Patienten zeigte keins der Präparate einen Effekt durch 5-Hydroxytryptophan und bei einer weiblichen Patientin zeigte ein Präparat keinen Effekt, aber zwei Präparate aus der selben Gewebeprobe reagierten auf 5-HTP. Alle untersuchten Patienten wiesen mindestens eine koronare Dreifäßerkrankung auf, also eine ähnliche kardiale Vorerkrankung. Dazu waren die Patienten meist multimorbide und nahmen mehrere Medikamente ein (s. unter 9.9. Tabelle der Patientendaten im Anhang). Die Vormedikation kann natürlich die Wirkungsweise der verwendeten Substanzen beeinflussen, auf Grund der geringen Patientenanzahl war es aber nicht möglich herauszufinden, ob ein bestimmtes Medikament die Ursache für das Nichtansprechen einiger Präparate sein könnte. Weiterhin erklärt die Theorie einer medikamentösen Ursache auch nicht, dass bei den Präparaten von ein und derselben Patientin zwei Präparate auf 5-Hydroxytryptophan mit einem positiv inotropen Effekt reagieren und ein drittes Präparat keine Reaktion zeigt. Hier sollten weitere Untersuchungen angeschlossen werden, z.B. ob es ein ungleiches Expressionsmuster für die Decarboxylase im Herzgewebe gibt.

### **5.3. Wirkung von Tranylcypromin, Allopurinol und Disulfiram**

Als Hemmstoff der Monoaminoxidase verhindert Tranylcypromin irreversibel den Abbau von Katecholaminen und Serotonin (Baker et al. 1992). Bisher konnte sowohl in Kardiomyozyten von Mäusen, als auch von Menschen das Vorhandensein einer Monoaminoxidase nachgewiesen werden (Dorris 1982; Sivasubramaniam et al. 2003), was mit der Westernblot-Analyse und in der Immunhistochemie nochmals bestätigt wurde. Wie erwartet wirkt Tranylcypromin positiv inotrop und chronotrop bei Wildtyp- und transgenen Mäusen. Durch die Blockade von  $\beta$ -Adrenorezeptoren mit Propranolol war es möglich, die Katecholamin-Wirkung zu unterdrücken und es zeigte

sich nur noch ein positiv inotroper Effekt an transgenen Mäusen, der somit durch Serotonin bedingt zu sein scheint. Der chronotrope Effekt nach Propranolol-Gabe ließ sich nicht auswerten, durch die hohe Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  Propranolol kam es bei transgenen und Wildtyp-Präparaten zu Arrhythmien. Nach erneuter Tranylcypromin-Zugabe zeigten sich die Bradyarrhythmien sogar verstärkt bei den transgenen Mäusen, was man mit der arrhythmogenen Wirkung von Serotonin erklären kann. Um die Wirkung von Tranylcypromin präziser darstellen zu können, sollte das Experiment mit einer niedrigeren Propranolol-Gabe wiederholt werden.

Allopurinol zeigte einen geringen positiv inotropen Effekt an Wildtyp- und transgenen Mausvorhofpräparaten und Disulfiram keinen inotropen und chronotropen Effekt. Nach anschließender kumulativer Zugabe von Serotonin zeigte sich eine relative Zunahme der Kontraktionskraft um das Zweifache im Vergleich zu den Kontrollpräparaten, die Effizienz ließ sich also durch Allopurinol und Disulfiram steigern. Für die transgenen rechten Vorhofpräparate ergab sich kein Unterschied durch Allopurinol und Disulfiram zu den Kontrollpräparaten. Scheinbar ist der Abbauweg der Aldehyd-Dehydrogenase und Aldehyd-Reduktase für die Schlagfrequenz eher nicht relevant. Beide Substanzen wurden zusammen getestet und dadurch konnte nicht die einzelne Wirkung jeder Substanz untersucht werden, was die Beurteilbarkeit einschränkt. Es kann also sein, dass die Wirkung nur von einer der beiden Substanzen hervorgerufen wurde, oder sich die Wirkungen addiert haben.

#### **5.4. Wirkung von Compound 48/80 und Tyramin**

Durch Compound 48/80, das eine unspezifische Freisetzung von z.B. Katecholaminen und Serotonin aus intrazellulären Speichern bewirkt (Übersicht: Irman-Florjanc und Erjavec 1983; Ferjan und Lipnik-Štangelj 2013), zeigte sich bei den transgenen linken Vorhofpräparaten ein positiv inotroper Effekt nach vorheriger Propranolol-Gabe, welcher auch, wie von Irman-Florjanc & Erjavec beschrieben, Dosis-abhängig ist (Irman-Florjanc und Erjavec 1983). Aber auch bei den linken Vorhofpräparaten der Wildtyp-Kontrollen zeigte sich ab 100  $\mu\text{M}$  Compound 48/80 ein positiv inotroper Effekt. Eine Blockade durch 10  $\mu\text{M}$  Propranolol kann bei hohen Konzentrationen von Compound 48/80 nicht ausreichend sein, bzw. könnte Compound 48/80 in hohen Konzentrationen selbst noch einen positiv inotropen Effekt durch andere, bisher unbekannte Mechanismen bewirken. Möglicherweise kann Compound 48/80 selbst über einen G-Protein-vermittelten Effekt die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration oder die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität erhöhen. Nach erneuter Propranolol-Gabe war dieser positiv inotrope Effekt antagonisierbar, was eine ungenügende Blockade der  $\beta$ -Rezeptoren durch das Propranolol vermuten lässt. Bei transgenen Mäusen war es möglich, den Effekt durch

GR 113808, einem spezifischen 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptorantagonisten, zu senken. Die arrhythmogene Wirkung von Compound 48/80 scheint nicht nur durch eine Freisetzung durch Serotonin bedingt zu sein, denn bei den Wildtyp-Präparaten zeigte sich trotz fehlender 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren eine stärkere Ausbildung der Bradyarrhythmien. Dieser bisher unbekannt Mechanismus, der zu den festgestellten Arrhythmien führt, sollte weiter untersucht werden, z.B. durch Einsatz verschiedener Rezeptorantagonisten um andere beteiligte Signaltransduktionssysteme zu untersuchen.

Unter der Einwirkung von Tyramin, nach vorheriger Propranolol-Gabe zur Blockade der  $\beta$ -Rezeptoren, stellte sich ein positiv inotroper Effekt und ein positiv chronotroper Effekt bei den transgenen Präparaten dar. Bei den Wildtyp-Präparaten zeigten sich hingegen keinerlei Effekte durch Tyramin. Es war also möglich durch Tyramin das Serotonin aus Herzmuskelpräparaten freizusetzen. Allerdings konnte hier nicht nachgewiesen werden, ob das 5-HT aus den Herzmuskelzellen selbst stammt oder aus einem anderen Zelltyp.

### **5.5. Wirkung von Fluoxetin**

Im Rahmen der Hemmung des Uptake<sub>1</sub>-Mechanismus über den selektiven Serotonin-Transporter wurde Fluoxetin als bekannter SSRI eingesetzt (Wong et al. 1995). Der Uptake<sub>1</sub>-Mechanismus existiert vor allem in Nervenzellen, ist aber auch am Herz entdeckt worden (Sari und Zhou 2003; Pavone et al. 2008). In der Immunhistochemie ließ sich der Serotonin-Transporter im Herzgewebe der Maus nachweisen. In den Versuchen zeigte Fluoxetin einen positiv inotropen Effekt sowohl bei Wildtyp- als auch bei transgenen Vorhofpräparaten. Die Ursache dieses Effektes kann deswegen nicht nur bedingt durch eine Serotonin-Freisetzung hervorgerufen sein, diese wäre bei den Wildtyp-Präparaten nämlich nicht zu sehen. Die Konzentration von 10  $\mu$ M Fluoxetin kann auch andere Monoamin-Transporter, wie den NAT, hemmen und der positiv inotrope Effekt kann durch die Wirkung von Noradrenalin zustande kommen. Die Hemmkonstante  $K_i$  für Fluoxetin am NAT ist mit 340 nM beschrieben (Übersicht: Sánchez und Hyttel 1999). Weiterhin könnte Fluoxetin auch über andere, bisher ungeklärte Mechanismen zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration oder der Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität führen. Bei einer anschließenden kumulativen Gabe von Serotonin konnte das Ansprechen auf Serotonin durch Fluoxetin zu geringeren Serotonin-Konzentrationen verschoben werden. Der pEC<sub>50</sub>-Wert ohne Fluoxetin betrug 7,77, mit Fluoxetin 8,64. Durch die Hemmung des SERT scheint es also zu einer erhöhten Konzentration von Serotonin im Extrazellulärraum gekommen zu sein. Ähnliche Daten existieren bereits durch Versuche mit Kokain am menschlichen Vorhofpräparat (Kaumann et al. 1990). Im direkten Vergleich ist die maximal

erreichbare Kontraktionskraft mit Fluoxetin und Serotonin an den transgenen Maus-Vorhofpräparaten aber geringer, als nur mit Serotonin allein. Diesen Effekt kann man eventuell durch eine zeitliche Abschläpfung der Präparate erklären. Vergleicht man die Experimente von Fluoxetin und Serotonin mit den Experimenten, bei denen Fluoxetin und Serotonin erst nach dem Experiment einer kumulativen Serotoningabe (2. Effekt) appliziert wurden (Abb. 18d), so sieht man, dass hier ebenfalls die Ausgangskraft und die maximal erreichbare Kontraktionskraft geringer sind, weil das Präparat bereits länger durch vorherige Experimente beansprucht wurde. Betrachtet man dann aber Abb. 18e, so scheint die relative, d.h. auf den jeweiligen Ausgangswert bezogene, Maximalkraft fast gleich zu sein und auch bei einem durch Vorexperimente beanspruchten Präparat ist mit Fluoxetin noch ein Ansprechen auf geringere Serotonin-Konzentrationen möglich.

Als kardiovaskuläre Nebenwirkungen von Fluoxetin bei Patienten sind bereits Bradyarrhythmien mit Blutdruckabfall bis hin zur orthostatischen Synkope bekannt (Pacher und Kecskemeti 2004). Auch in den hier beschriebenen Experimenten bewirkte Fluoxetin am Sinusknoten einen negativ chronotropen Effekt bei Wildtyp- und transgenen Mäusen. Ob dieser Effekt allein Serotonin-vermittelt war, oder ob Fluoxetin auch hier einen zusätzlichen, bisher nicht geklärten Effekt hatte, konnte nicht vollständig durch diesen Versuch erklärt werden. Bekannt ist, dass Fluoxetin über die direkte Blockade von hERG-(K<sup>+</sup>)-Kanälen und auch durch Störungen des Proteintransports ein Long-QT-Syndrom mit tödlichen Arrhythmien auslösen kann (Rajamani et al. 2006).

## 5.6. Wirkung von Decynium 22 und Cortison

Decynium 22 soll den Uptake<sub>2</sub>-Mechanismus von Katecholaminen, Histamin und Serotonin über OCT und PMAT hemmen und dadurch den extrazellulären Serotoninspiegel anheben. Der Uptake<sub>2</sub>-Mechanismus spielt vor allem in Nicht-Nervenzellen eine große Rolle und sowohl OCT, wie auch PMAT wurden auch im Herzgewebe nachgewiesen (Duan und Wang 2010; Grube et al. 2011) und durch den immunhistochemischen Nachweis im Herzgewebe von Mäusen bestätigt. Diese Transporter haben eine höhere Kapazität als spezielle Monoamin-Transporter wie SERT, aber dafür eine geringere Affinität (Hill et al. 2011).

Im Experiment mit Decynium 22 zeigte sich nur ein transienter positiv inotroper Effekt bei den transgenen Vorhofpräparaten. Anschließend kam es zu einer Abnahme der Kontraktionskraft. Bei den Präparaten der rechten transgenen Vorhöfe zeigte sich ein negativ chronotroper Effekt. Ähnlich verhielten sich auch die Präparate der Wildtyp-Kontrollen. Hier zeigte sich als einziger Unterschied, dass die rechten Vorhofpräparate

von der Schlagfrequenz wesentlich stärker abfielen, als die rechten Vorhofpräparate der transgenen Mäuse. Es ist also fraglich, ob der Effekt durch eine erwartete Erhöhung des extrazellulären Serotonins bewirkt wurde. Der OCT transportiert möglicherweise nicht nur Serotonin in die Zelle, sondern auch endogenes Serotonin nach extrazellulär. Dadurch könnte der negativ inotrope und chronotrope Effekt ebenfalls erklärbar sein, oder der Effekt wird durch Decynium 22 selbst hervorgerufen. Ebenfalls möglich wäre eine Freisetzung geringer Mengen von z.B. Katecholaminen, da OCT kein reiner Serotonin-Transporter ist. Dagegen spricht wiederum der Schlagfrequenzabfall der rechten Vorhofpräparate.

Cortison stellt ebenfalls eine Möglichkeit dar, den Uptake<sub>2</sub>-Mechanismus zu hemmen. Anders als bei Decynium 22 wirkt Cortison aber nur hemmend auf die OCT 3 und nicht auf den PMAT (Duan und Wang 2010). Wir erwarteten ähnliche Effekte durch Cortison wie durch Fluoxetin, es zeigte sich aber ein negativ inotroper Effekt bei den transgenen Vorhofpräparaten. Dieser negativ inotrope Effekt war etwas schwächer ausgeprägt als der der Lösungsmittelkontrolle, möglicherweise wurde ein schwach positiv inotroper Effekt durch den stärkeren Effekt des Lösungsmittels DMSO überlagert. Diese Theorie könnte man in einem weiteren Experiment mit einem anderen Lösungsmittel erneut untersuchen. Gegen einen positiv inotropen Effekt des Cortisons spricht aber auch die Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve von Serotonin ( $pEC_{50}$ Serotonin:  $8,36 \pm 0,29$ ;  $pEC_{50}$ Cortison+S.:  $7,98 \pm 0,31$ ). Das heißt, die Empfindlichkeit für Serotonin wird vermindert, was gegen die Beteiligung einer OCT-Hemmung spricht, sondern eher für die Störung der Membranfunktion durch z.B. DMSO. Die rechten transgenen Vorhofpräparate reagierten auf Cortison mit DMSO, wie bei Fluoxetin und Decynium 22, ebenfalls mit einem negativ chronotropen Effekt, doch auch das Lösungsmittel DMSO allein wirkte negativ chronotrop. Wahrscheinlich haben sich auch bei diesem Versuch die Effekte von Lösungsmittel und zu untersuchender Substanz überlagert. In einer anschließenden kumulativen Gabe von Serotonin zeigte sich ein ähnliches Ergebnis, wie schon bei den linken Vorhofpräparaten, es kam ebenfalls zu einer Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve ( $pEC_{50}$ DMSO+S.:  $8,23$ ;  $pEC_{50}$ Cortison+S.:  $7,67$ ). Analog zu Decynium 22 ist davon auszugehen, dass durch die Hemmung des OCT Serotonin weder in, noch aus den Zellen kommen kann, wodurch weniger endogenes Serotonin aktiv sein könnte. Letztendlich ist durch die beiden Versuche der Mechanismus des Uptake<sub>2</sub> am Herzen nicht ausreichend zu erklären und er sollte mit gezielteren Experimenten weiter untersucht werden.

## 6. Zusammenfassung

In Herzmuskelpräparaten ist eine Synthese von Serotonin aus 5-Hydroxytryptophan möglich, entgegen der gängigen Lehrmeinung, dass Serotonin nur aus dem Blut in das Herz gelangt.

Dazu erfolgten Untersuchungen an Wildtyp-Mäusen, an transgenen Mäusen, die den humanen 5-HT<sub>4a</sub>-Rezeptor kardial überexprimieren, jeweils am Organpräparat und auch echokardiografisch in vivo. Ergänzend fanden auch Untersuchungen an menschlichen Trabekelmuskeln statt.

Eine messbare Serotoninsynthese aus Tryptophan über die Tryptophan-Hydroxylase (TPH1) fand nicht statt, obwohl die TPH1 in Kardiomyozyten nachgewiesen werden konnte (Côté et al. 2003).

Über die 5-Hydroxytryptophan-Decarboxylase ist eine Synthese von Serotonin in Kardiomyozyten durch Zugabe von 5-Hydroxytryptophan möglich, es zeigen sich deutliche positiv inotrope Effekte, sowohl am isolierten transgenen Mausvorhofpräparat, wie auch in vivo an transgenen Mäusen und selbst am menschlichen Trabekelmuskel. An Wildtypmäusen konnten keine Effekte durch 5-HTP erzielt werden.

Der positiv inotrope Effekt von 5-HTP lässt sich durch den Decarboxylase-Hemmstoff NSD1015 erfolgreich unterdrücken, was die Aktivität der 5-Hydroxytryptophan-Decarboxylase in Kardiomyozyten bestätigt. Der Effekt von 5-HTP ist nicht so effizient wie der Effekt von Serotonin.

Serotonin wird in Herzvorhöfen über verschiedene Wege abgebaut. Durch die Hemmung der Monoaminoxidase mit Tranylcypromin ließ sich die Konzentration von Serotonin am Rezeptor erhöhen, die Kardiomyozyten zeigten positiv inotrope und chronotrope Effekte.

Auch andere Abbauvorgänge über Redoxreaktionen der Aldehyd-Dehydrogenase spielen vermutlich im Metabolismus des Serotonins eine Rolle. So zeigten Disulfiram und Allopurinol eine Steigerung der Effizienz von zugegebenem Serotonin auf seine inotrope Wirkung.

Weiterhin ist es möglich Serotonin aus kardialen Zellen durch Tyramin und Compound 48/80 freizusetzen, es zeigten sich positiv inotrope Effekte. Diese waren im Versuch mit Compound 48/80 durch den spezifischen 5-HT<sub>4a</sub>-Rezeptorantagonisten

GR 113808 antagonisierbar, es zeigte sich eine Abschwächung des vorher erzielten positiv inotropen Effektes.

SERT, der selektive Serotonin-Transporter, wird kardial exprimiert (Pavone et al. 2008; Gergs et al. 2017) und durch die Hemmung des Serotonin-Reuptakes durch Blockade des Transporters mit Fluoxetin war eine Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve möglich. Ein Transport von Serotonin von intra- nach extrazellulär und umgekehrt ist auch über andere Transporter möglich, zum Beispiel durch unspezifische Wiederaufnahme-Transporter wie OCT und PMAT. Die verwendeten Hemmstoffe Cortison und Decynium 22 zeigten aber keine eindeutigen Effekte, bzw. kam es zu einer Reduktion der positiven Effekte von Serotonin. Diese unspezifischen Wiederaufnahme-Transporter scheinen am Herzen eine eher geringere Bedeutung für den Serotonintransport zu haben oder die verwendeten Hemmstoffe waren zu unspezifisch.

Generell ist ein Metabolismus von Serotonin direkt in Kardiomyozyten möglich. Die 5-Hydroxytryptophan-Decarboxylase ist in vitro an Mausvorhöfen, menschlichen Papillarmuskelpräparaten und in vivo an der Maus beeinflussbar, sodass die These, dass Kardiomyozyten das Serotonin nur aus dem Blut von Thrombozyten aufnehmen, widerlegt ist. Da neben den getesteten Substanzen auch Medikamente in den Serotonin-Metabolismus eingreifen und die Serotoninkonzentration erhöhen oder senken können, können als unerwünschte Nebenwirkungen Arrhythmien, unerklärbare Tachykardien oder auch Bradykardien entstehen. Diese Effekte werden direkt in den Kardiomyozyten ausgelöst. So wird in manchen Ländern 5-Hydroxytryptophan als Nahrungsergänzungsmittel bei milder Depression empfohlen, was Tachykardien als unerwünschte Nebenwirkungen auslösen kann. Weiterhin kann aber der positiv inotrope Effekt des Serotonins als „unerwünschte“ Nebenwirkung bei z.B. einer Medikation einer Depression mit Tranylcypromin bei gleichzeitig bestehender Herzinsuffizienz ein therapeutischer Nutzen sein und sollte bei Medikationseinstellungen beachtet werden. Da aber immer auch arrhythmogene Effekte möglich sind, sollte eine gute Überwachung und ggf. schnelles Eingreifen gewährleistet sein.

## 7. Literaturverzeichnis

- Afzal F, Andressen KW, Mørk HK, et al (2008) 5-HT<sub>4</sub>-elicited positive inotropic response is mediated by cAMP and regulated by PDE3 in failing rat and human cardiac ventricles. *Br J Pharmacol* 155:1005–1014. doi: 10.1038/bjp.2008.339
- Bach T, Syversveen T, Kvingedal AM, et al (2001) 5HT<sub>4</sub>(a) and 5-HT<sub>4</sub>(b) receptors have nearly identical pharmacology and are both expressed in human atrium and ventricle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 363:146–160.
- Baganz NL, Blakely RD (2013) A dialogue between the immune system and brain, spoken in the language of serotonin. *ACS Chem Neurosci* 4:48–63. doi: 10.1021/cn300186b
- Baker GB, Coutts RT, McKenna KF, Sherry-McKenna RL (1992) Insights into the mechanisms of action of the MAO inhibitors phenelzine and tranylcypromine: a review. *J Psychiatry Neurosci* 17:206–214.
- Bard JA, Zgombick J, Adham N, et al (1993) Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT<sub>7</sub>) positively linked to adenylate cyclase. *J Biol Chem* 268:23422–23426.
- Baumgartner HR (1973) [Platelet adhesion to the subendothelial tissue]. *Bull Schweiz Akad Med Wiss* 29:177–190.
- Beck O, Helander A, Carlsson S, Borg S (1995) Changes in Serotonin Metabolism during Treatment with the Aldehyde Dehydrogenase Inhibitors Disulfiram and Cyanamide. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 77:323–326. doi: 10.1111/j.1600-0773.1995.tb01035.x
- Bender E, Pindon A, van Oers I, et al (2000) Structure of the human serotonin 5-HT<sub>4</sub> receptor gene and cloning of a novel 5-HT<sub>4</sub> splice variant. *J Neurochem* 74:478–489.
- Bertrand PP, Barajas-Espinosa A, Neshat S, et al (2010) Analysis of real-time serotonin (5-HT) availability during experimental colitis in mouse. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 298:G446–55. doi: 10.1152/ajpgi.00318.2009
- Bianchi P, Kunduzova O, Masini E, et al (2005) Oxidative stress by monoamine oxidase mediates receptor-independent cardiomyocyte apoptosis by serotonin and postischemic myocardial injury. *Circulation* 112:3297–3305. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.528133
- Blondel O, Gastineau M, Dahmoune Y, et al (1998) Cloning, expression, and pharmacology of four human 5-hydroxytryptamine 4 receptor isoforms produced by alternative splicing in the carboxyl terminus. *J Neurochem* 70:2252–2261.
- Bockaert J, Fozard JR, Dumuis A, Clarke DE (1992) The 5-HT<sub>4</sub> receptor: a place in the sun. *Trends Pharmacol Sci* 13:141–145.
- Bom AH, Duncker DJ, Saxena PR, Verdouw PD (1988) 5-Hydroxytryptamine-induced tachycardia in the pig: possible involvement of a new type of 5-hydroxytryptamine receptor. *Br J Pharmacol* 93:663–671. doi: 10.1111/(ISSN)1476-5381

- Brattelid T, Kvingedal AM, Krobert KA, et al (2004a) Cloning, pharmacological characterisation and tissue distribution of a novel 5-HT<sub>4</sub> receptor splice variant, 5-HT<sub>4</sub>(i). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369:616–628. doi: 10.1007/s00210-004-0919-4
- Brattelid T, Qvigstad E, Lynham JA, et al (2004b) 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. doi: 10.1007/s00210-004-0963-0
- Bristow MR (2000) beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. *Circulation* 101:558–569.
- Buchwalow I, Boecker W, Wolf E, et al (2013) Signal amplification in immunohistochemistry: loose-jointed deformable heteropolymeric HRP conjugates vs. linear polymer backbone HRP conjugates. *Acta Histochem* 115:587–594. doi: 10.1016/j.acthis.2012.12.008
- Buchwalow I, SamoiloVA V, Boecker W, Tiemann M (2011) Non-specific binding of antibodies in immunohistochemistry: fallacies and facts. *Sci Rep* 1:28. doi: 10.1038/srep00028
- Buchwalow IB, Böcker W (2010) *Immunohistochemistry: Basics and Methods*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
- Champier J, Claustrat B, Besançon R, et al (1997) Evidence for tryptophan hydroxylase and hydroxy-indol-O-methyl-transferase mRNAs in human blood platelets. *Life Sci* 60:2191–2197.
- Chester AH, Allen SP, Tadjkarimi S, Yacoub MH (1993) Interaction between thromboxane A<sub>2</sub> and 5-hydroxytryptamine receptor subtypes in human coronary arteries. *Circulation* 87:874–880.
- Côté F, Thévenot E, Fligny C, et al (2003) Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:13525–13530. doi: 10.1073/pnas.2233056100
- Cryan JF, Dinan TG (2012) Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci* 13:701–712. doi: 10.1038/nrn3346
- Curtet S, Soulier JL, Zahradnik I, et al (2000) New arylpiperazine derivatives as antagonists of the human cloned 5-HT<sub>4</sub> receptor isoforms. *J Med Chem* 43:3761–3769. doi: 10.1021/jm0009538
- De Maeyer JH, Straetemans R, Schuurkes JAJ, Lefebvre RA (2006) Porcine left atrial and sinoatrial 5-HT<sub>4</sub> receptor-induced responses: fading of the response and influence of development. *Br J Pharmacol* 147:140–157. doi: 10.1038/sj.bjp.0706497
- Docherty JR (1988) Investigations of cardiovascular 5-hydroxytryptamine receptor subtypes in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 337:1–8.
- Dong X-Z, Li Z-L, Zheng X-L, et al (2013) A representative prescription for emotional disease, Ding-Zhi-Xiao-Wan restores 5-HT system deficit through interfering the synthesis and transshipment in chronic mild stress-induced depressive rats. *J Ethnopharmacol* 150:1053–1061. doi: 10.1016/j.jep.2013.10.018

- Dorris RL (1982) A simple method for screening monoamine oxidase (MAO) inhibitory drugs for type preference. *J Pharmacol Methods* 7:133–137.
- Duan H, Wang J (2010) Selective transport of monoamine neurotransmitters by human plasma membrane monoamine transporter and organic cation transporter 3. *J Pharmacol Exp Ther* 335:743–753. doi: 10.1124/jpet.110.170142
- Dumuis A, Bouhelal R, Sebben M, Bockaert J (1988a) A 5-HT receptor in the central nervous system, positively coupled with adenylate cyclase, is antagonized by ICS 205 930. *Eur J Pharmacol* 146:187–188.
- Dumuis A, Bouhelal R, Sebben M, et al (1988b) A nonclassical 5-hydroxytryptamine receptor positively coupled with adenylate cyclase in the central nervous system. *Mol Pharmacol* 34:880–887.
- Eftekhari P, Roegel JC, Lezoualc'h F, et al (2001) Induction of neonatal lupus in pups of mice immunized with synthetic peptides derived from amino acid sequences of the serotonergic 5-HT<sub>4</sub> receptor. *Eur J Immunol* 31:573–579. doi: 10.1002/1521-4141(200102)31:2<573::AID-IMMU573>3.0.CO;2-9
- Eftekhari P, Sallé L, Lezoualc'h F, et al (2000) Anti-SSA/Ro52 autoantibodies blocking the cardiac 5-HT<sub>4</sub> serotonergic receptor could explain neonatal lupus congenital heart block. *Eur J Immunol* 30:2782–2790. doi: 10.1002/1521-4141(200010)30:10<2782::AID-IMMU2782>3.0.CO;2-9
- Erickson JD, Eiden LE (1993) Functional identification and molecular cloning of a human brain vesicle monoamine transporter. *J Neurochem* 61:2314–2317.
- Erspamer V, Asero B (1953) Isolation of enteramine from extracts of posterior salivary glands of *Octopus vulgaris* and of *Discoglossus pictus* skin. *J Biol Chem* 200:311–318.
- Erspamer V, Testini A (1959) Observations on the release and turnover rate of 5-hydroxytryptamine in the gastrointestinal tract. *J Pharm Pharmacol* 11:618–623.
- Feldman JM, Lee EM (1985) Serotonin content of foods: effect on urinary excretion of 5-hydroxyindoleacetic acid. *Am J Clin Nutr* 42:639–643.
- Ferjan I, Lipnik-Štangelj M (2013) Chronic pain treatment: the influence of tricyclic antidepressants on serotonin release and uptake in mast cells. *Mediators Inflamm* 2013:340473–7. doi: 10.1155/2013/340473
- Flachaire E, Beney C, Berthier A, et al (1990) Determination of reference values for serotonin concentration in platelets of healthy newborns, children, adults, and elderly subjects by HPLC with electrochemical detection. *Clin Chem* 36:2117–2120.
- Fukumori R, Minegishi A, Satoh T, et al (1980) Changes in the serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid contents in rat brain after ethanol and disulfiram treatments. *Eur J Pharmacol* 61:199–202.
- Gergs U, Baumann M, Böckler A, et al (2010) Cardiac overexpression of the human 5-HT<sub>4</sub> receptor in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299:H788–98. doi: 10.1152/ajpheart.00691.2009
- Gergs U, Böckler A, Ebelt H, et al (2013) Human 5-HT<sub>4</sub> receptor stimulation in atria of transgenic mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 386:357–367. doi:

10.1007/s00210-013-0831-x

- Gergs U, Jung F, Buchwalow IB, et al (2017) Pharmacological and physiological assessment of serotonin formation and degradation in isolated preparations from mouse and human heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* ajpheart.00350.2017. doi: 10.1152/ajpheart.00350.2017
- Golino P, Piscione F, Willerson JT, et al (1991) Divergent effects of serotonin on coronary-artery dimensions and blood flow in patients with coronary atherosclerosis and control patients. *N Engl J Med* 324:641–648. doi: 10.1056/NEJM199103073241001
- Grammer JB, Zeng X, Bosch RF, Kühlkamp V (2001) Atrial L-type Ca<sup>2+</sup>-channel, beta-adrenoreceptor, and 5-hydroxytryptamine type 4 receptor mRNAs in human atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol* 96:82–90.
- Green AR, Curzon G (1970) The effect of tryptophan metabolites on brain 5-hydroxytryptamine metabolism. *Biochem Pharmacol* 19:2061–2068.
- Greenberg MJ (1960) Structure-activity relationship of tryptamine analogues on the heart of *Venus mercenaria*. *Br J Pharmacol Chemother* 15:375–388.
- Grube M, Ameling S, Noutsias M, et al (2011) Selective regulation of cardiac organic cation transporter novel type 2 (OCTN2) in dilated cardiomyopathy. *Am J Pathol* 178:2547–2559. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.02.020
- Haycock JW, Kumer SC, Lewis DA, et al (2002) A monoclonal antibody to tryptophan hydroxylase: applications and identification of the epitope. *J Neurosci Methods* 114:205–212.
- Hayer-Zillgen M, Brüss M, Bönisch H (2002) Expression and pharmacological profile of the human organic cation transporters hOCT1, hOCT2 and hOCT3. *Br J Pharmacol* 136:829–836. doi: 10.1038/sj.bjp.0704785
- Hill JE, Makky K, Shrestha L, et al (2011) Natural and synthetic corticosteroids inhibit uptake 2-mediated transport in CNS neurons. *Physiol Behav* 104:306–311. doi: 10.1016/j.physbeh.2010.11.012
- Hiroi T, Hayashi-Kobayashi N, Nagumo S, et al (2001) Identification and characterization of the human serotonin-4 receptor gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 289:337–344. doi: 10.1006/bbrc.2001.5979
- Hollander W, Michelson AL, Wilkins RW (1957) Serotonin and antiserotonins. I. Their circulatory, respiratory, and renal effects in man. *Circulation* 16:246–255.
- Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, et al (1994) International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev* 46:157–203.
- Hunter LW, Rorie DK, Tyce GM (1993) Inhibition of aromatic L-amino acid decarboxylase under physiological conditions: optimization of 3-hydroxybenzylhydrazine concentration to prevent concurrent inhibition of monoamine oxidase. *Biochem Pharmacol* 45:1363–1366.
- Huot P, Fox SH, Brotchie JM (2011) The serotonergic system in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 95:163–212. doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.08.004

- Irman-Florjanc T, Erjavec F (1983) Compound 48/80 and substance P induced release of histamine and serotonin from rat peritoneal mast cells. *Agents Actions* 13:138–141.
- Ishiwata T, Saito T, Hasegawa H, et al (2004) Changes of body temperature and extracellular serotonin level in the preoptic area and anterior hypothalamus after thermal or serotonergic pharmacological stimulation of freely moving rats. *Life Sci* 75:2665–2675. doi: 10.1016/j.lfs.2004.04.040
- Iversen LL (1965) The uptake of catechol amines at high perfusion concentrations in the rat isolated heart: A novel catechol amine uptake process. *Br J Pharmacol Chemother* 25:18–33.
- Jacobsen MB, Nitter-Hauge S, Bryde PE, Hanssen LE (1995) Cardiac manifestations in mid-gut carcinoid disease. *Eur Heart J* 16:263–268.
- Jahnel U, Rupp J, Ertl R, Nawrath H (1992) Positive inotropic response to 5-HT in human atrial but not in ventricular heart muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 346:482–485.
- Jonnakuty C, Gragnoli C (2008) What do we know about serotonin? *J Cell Physiol* 217:301–306. doi: 10.1002/jcp.21533
- Kaumann AJ (1985) Two classes of myocardial 5-hydroxytryptamine receptors that are neither 5-HT1 nor 5-HT2. *J Cardiovasc Pharmacol* 7 Suppl 7:S76–8.
- Kaumann AJ (1990) Piglet sinoatrial 5-HT receptors resemble human atrial 5-HT4-like receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 342:619–622.
- Kaumann AJ (1994) Do human atrial 5-HT4 receptors mediate arrhythmias? *Trends Pharmacol Sci* 15:451–455.
- Kaumann AJ, Sanders L (1994) 5-Hydroxytryptamine causes rate-dependent arrhythmias through 5-HT4 receptors in human atrium: facilitation by chronic beta-adrenoceptor blockade. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 349:331–337.
- Kaumann AJ, Sanders L, Brown AM, et al (1991) A 5-HT4-like receptor in human right atrium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 344:150–159.
- Kaumann AJ, Sanders L, Brown AM, et al (1990) A 5-hydroxytryptamine receptor in human atrium. *Br J Pharmacol* 100:879–885.
- Kim DY, Camilleri M (2000) Serotonin: a mediator of the brain-gut connection. *Am J Gastroenterol* 95:2698–2709. doi: 10.1111/j.1572-0241.2000.03177.x
- Kultschitzky N (1897) Zur Frage über den bau des Darmkanals.
- Langlois M, Fischmeister R (2003) 5-HT4 receptor ligands: applications and new prospects. *J Med Chem* 46:319–344.
- Lauder JM, Tamir H, Sadler TW (1988) Serotonin and morphogenesis. I. Sites of serotonin uptake and -binding protein immunoreactivity in the midgestation mouse embryo. *Development* 102:709–720.
- Lee BE, Toledo AH, Anaya-Prado R, et al (2009) Allopurinol, xanthine oxidase, and cardiac ischemia. *J Investig Med* 57:902–909. doi: 10.2310/JIM.0b013e3181bca50c

- Lefebvre H, Compagnon P, Contesse V, et al (2001) Production and metabolism of serotonin (5-HT) by the human adrenal cortex: paracrine stimulation of aldosterone secretion by 5-HT. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5001–5007. doi: 10.1210/jcem.86.10.7917
- LeMessurier DH, Schwartz CJ, Whelan RF (1959) Cardiovascular effects of intravenous infusions of 5-hydroxytryptamine in man. *Br J Pharmacol Chemother* 14:246–250.
- Lucas JJ, Hen R (1995) New players in the 5-HT receptor field: genes and knockouts. *Trends Pharmacol Sci* 16:246–252.
- Ludwig A, Zong X, Stieber J, et al (1999) Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *EMBO J* 18:2323–2329. doi: 10.1093/emboj/18.9.2323
- Ma JZ, Beuten J, Payne TJ, et al (2005) Haplotype analysis indicates an association between the DOPA decarboxylase (DDC) gene and nicotine dependence. *Hum Mol Genet* 14:1691–1698. doi: 10.1093/hmg/ddi177
- MacLennan DH (2000) Ca<sup>2+</sup> signalling and muscle disease. *Eur J Biochem* 267:5291–5297.
- Millson DS, Haworth SJ, Rushton A, et al (1991) The effects of a 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonist (ICI 169,369) on changes in waking EEG, pupillary responses and state of arousal in human volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 32:447–454. doi: 10.1111/j.1365-2125.1991.tb03929.x
- Minamino T, Kitakaze M, Asanuma H, et al (1999) Plasma adenosine levels and platelet activation in patients with atrial fibrillation. *Am J Cardiol* 83:194–198.
- Minamino T, Kitakaze M, Sato H, et al (1997) Plasma levels of nitrite/nitrate and platelet cGMP levels are decreased in patients with atrial fibrillation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:3191–3195.
- Molinoff PB, Axelrod J (1971) Biochemistry of catecholamines. *Annu Rev Biochem* 40:465–500. doi: 10.1146/annurev.bi.40.070171.002341
- Moriwaki Y, Yamamoto T, Nasako Y, et al (1993) In vitro oxidation of pyrazinamide and allopurinol by rat liver aldehyde oxidase. *Biochem Pharmacol* 46:975–981.
- Muller CL, Anacker AMJ, Veenstra-VanderWeele J (2016) The serotonin system in autism spectrum disorder: From biomarker to animal models. *Neuroscience* 321:24–41. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.11.010
- Naughton M, Mulrooney JB, Leonard BE (2000) A review of the role of serotonin receptors in psychiatric disorders. *Hum Psychopharmacol* 15:397–415. doi: 10.1002/1099-1077(200008)15:6<397::AID-HUP212>3.0.CO;2-L
- Nebigil CG, Etienne N, Messaddeq N, Maroteaux L (2003) Serotonin is a novel survival factor of cardiomyocytes: mitochondria as a target of 5-HT<sub>2B</sub> receptor signaling. *FASEB J* 17:1373–1375. doi: 10.1096/fj.02-1122fje
- Olsson S, Edwards IR (1992) Tachycardia during cisapride treatment. *BMJ* 305:748–749.
- Ouadid H, Albat B, Nargeot J (1995) Calcium currents in diseased human cardiac cells.

- J Cardiovasc Pharmacol 25:282–291.
- Ouadid H, Seguin J, Dumuis A, et al (1992) Serotonin increases calcium current in human atrial myocytes via the newly described 5-hydroxytryptamine<sub>4</sub> receptors. *Mol Pharmacol* 41:346–351.
- Pacher P, Kecskemeti V (2004) Cardiovascular side effects of new antidepressants and antipsychotics: new drugs, old concerns? *Curr Pharm Des* 10:2463–2475.
- Paintal AS (1973) Sensory mechanisms involved in the Bezold-Jarisch effect. *Aust J Exp Biol Med Sci* 51:3–15.
- Pandey A, Habibulla M, Singh R (1983) Tryptophan hydroxylase and 5-HTP-decarboxylase activity in cockroach brain and the effects of p-chlorophenylalanine and 3-hydroxybenzylhydrazine (NSD-1015). *Brain Res* 273:67–70.
- Pau D, Workman AJ, Kane KA, Rankin AC (2003) Electrophysiological effects of 5-hydroxytryptamine on isolated human atrial myocytes, and the influence of chronic beta-adrenoceptor blockade. *Br J Pharmacol* 140:1434–1441. doi: 10.1038/sj.bjp.0705553
- Pauwels PJ (2003) 5-HT receptors and their ligands.
- Pavone LM, Spina A, Muto Lo R, et al (2008) Heart valve cardiomyocytes of mouse embryos express the serotonin transporter SERT. *Biochem Biophys Res Commun* 377:419–422. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.09.152
- Peroutka SJ, Howell TA (1994) The molecular evolution of G protein-coupled receptors: focus on 5-hydroxytryptamine receptors. *Neuropharmacology* 33:319–324.
- Pino R, Cerbai E, Calamai G, et al (1998) Effect of 5-HT<sub>4</sub> receptor stimulation on the pacemaker current I(f) in human isolated atrial myocytes. *Cardiovasc Res* 40:516–522.
- Popova NK (2006) From genes to aggressive behavior: the role of serotonergic system. *BioEssays* 28:495–503. doi: 10.1002/bies.20412
- Porzio MA, Pearson AM (1977) Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* 490:27–34.
- Pönicke K, Gergs U, Buchwalow IB, et al (2012) On the presence of serotonin in mammalian cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem* 365:301–312. doi: 10.1007/s11010-012-1270-6
- Pranzatelli MR (1988) Effect of chronic treatment with 5-hydroxytryptophan on cortical serotonin receptors in the rat. *Clin Neuropharmacol* 11:257–262.
- Qvigstad E, Brattelid T, Sjaastad I, et al (2005) Appearance of a ventricular 5-HT<sub>4</sub> receptor-mediated inotropic response to serotonin in heart failure. *Cardiovasc Res* 65:869–878. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.11.017
- Rahme MM, Cotter B, Leistad E, et al (1999) Electrophysiological and antiarrhythmic effects of the atrial selective 5-HT<sub>4</sub> receptor antagonist RS-100302 in experimental atrial flutter and fibrillation. *Circulation* 100:2010–2017.

- Rajamani S, Eckhardt LL, Valdivia CR, et al (2006) Drug-induced long QT syndrome: hERG K<sup>+</sup> channel block and disruption of protein trafficking by fluoxetine and norfluoxetine. *Br J Pharmacol* 149:481–489. doi: 10.1038/sj.bjp.0706892
- Rapport MM, Green AA, Page IH (1947) Purification of the substance which is responsible for the vasoconstrictor activity of serum. *Fed Proc* 6:184.
- Richter DW, Manzke T, Wilken B, Ponimaskin E (2003) Serotonin receptors: guardians of stable breathing. *Trends Mol Med* 9:542–548.
- Riegersperger M, Covic A, Goldsmith D (2011) Allopurinol, uric acid, and oxidative stress in cardiorenal disease. *Int Urol Nephrol* 43:441–449. doi: 10.1007/s11255-011-9929-6
- Sakai K (1979) Role of 5-hydroxytryptamine in the vasoconstrictor action of compound 48/80 in the rat femoral vasculature. *Br J Pharmacol* 65:363–366. doi: 10.1111/(ISSN)1476-5381
- Sari Y, Zhou FC (2003) Serotonin and its transporter on proliferation of fetal heart cells. *Int J Dev Neurosci* 21:417–424.
- Saxena PR, Mylecharane EJ, Heiligers J (1985) Analysis of the heart rate effects of 5-hydroxytryptamine in the cat; mediation of tachycardia by 5-HT<sub>1</sub>-like receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 330:121–129.
- Sánchez C, Hyttel J (1999) Comparison of the effects of antidepressants and their metabolites on reuptake of biogenic amines and on receptor binding. *Cell Mol Neurobiol* 19:467–489.
- Shao R, Li X, Feng Y, et al (2014) Direct effects of metformin in the endometrium: a hypothetical mechanism for the treatment of women with PCOS and endometrial carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 33:41. doi: 10.1186/1756-9966-33-41
- Sharkawi M (1980) Inhibition of alcohol dehydrogenase by disulfiram; possible relation to the disulfiram-ethanol reaction. *Life Sci* 27:1939–1945. doi: 10.1016/0024-3205(80)90412-9
- Shiels MS, Huang HY, Hoffman SC, et al (2008) A community-based study of cigarette smoking behavior in relation to variation in three genes involved in dopamine metabolism: Catechol-O-methyltransferase (COMT), dopamine beta-hydroxylase (DBH) and monoamine oxidase-A (MAO-A). *Prev Med* 47:116–122. doi: 10.1016/j.ypmed.2008.03.013
- Sivasubramaniam SD, Finch CC, Rodriguez MJ, et al (2003) A comparative study of the expression of monoamine oxidase-A and -B mRNA and protein in non-CNS human tissues. *Cell Tissue Res* 313:291–300. doi: 10.1007/s00441-003-0765-6
- Squires LN, Rubakhin SS, Wadhams AA, et al (2010) Serotonin and its metabolism in basal deuterostomes: insights from *Strongylocentrotus purpuratus* and *Xenoturbella bocki*. *J Exp Biol* 213:2647–2654. doi: 10.1242/jeb.042374
- Stier CT, McKendall G, Itskovitz HD (1984) Serotonin formation in nonblood-perfused rat kidneys. *J Pharmacol Exp Ther* 228:53–56.
- Takano S (1995) Role of 5-hydroxytryptamine in platelet thrombus formation and mechanisms of inhibition of thrombus formation by 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> antagonists in rabbits. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 330:297–308.

- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350–4354.
- Tyce GM (1990) Origin and metabolism of serotonin. *J Cardiovasc Pharmacol* 16 Suppl 3:S1–7.
- Wagner LA, Koerker RL, Schneider FH (1973) Influence of different anions on catecholamine release induced by tyramine and amphetamine. *Biochem Pharmacol* 22:430–432.
- Walther DJ, Bader M (2003) A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem Pharmacol* 66:1673–1680.
- Wangemann T, Giessler C, Willmy-Matthes P, et al (2003) The indirect negative inotropic effect of carbachol in beta1-adrenoceptor antagonist-treated human right atria. *Eur J Pharmacol* 458:163–170.
- Wilkinson LO, Auerbach SB, Jacobs BL (1991) Extracellular serotonin levels change with behavioral state but not with pyrogen-induced hyperthermia. *J Neurosci* 11:2732–2741.
- Wong DT, Bymaster FP, Engleman EA (1995) Prozac (fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. *Life Sci* 57:411–441.
- Woolley DW, Shaw EN (1957) Evidence for the participation of serotonin in mental processes. *Ann N Y Acad Sci* 66:649–65– discussion– 665–7.
- Workman AJ, Rankin AC (1998) Serotonin, I(f) and human atrial arrhythmia. *Cardiovasc Res* 40:436–437.
- Xu J, Jian B, Chu R, et al (2002) Serotonin mechanisms in heart valve disease II: the 5-HT<sub>2</sub> receptor and its signaling pathway in aortic valve interstitial cells. *Am J Pathol* 161:2209–2218. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64497-5
- Yusuf S, Al-Saady N, Camm AJ (2003) 5-hydroxytryptamine and atrial fibrillation: how significant is this piece in the puzzle? *J Cardiovasc Electrophysiol* 14:209–214.

## 8. Thesen

1. 5-Hydroxytryptophan wird in Kardiomyozyten zu Serotonin synthetisiert.
2. Der Syntheseschritt von 5-Hydroxytryptophan zu Serotonin wird durch den Decarboxylase-Hemmstoff NSD1015 unterdrückt.
3. Serotonin wird in Kardiomyozyten unter anderem durch Monoaminoxidasen abgebaut. Tranylcypromin erhöht als unspezifischer MAO-Hemmer die Serotoninkonzentration in Kardiomyozyten.
4. Weitere enzymatische Abbauprozesse stellen die Aldehyd-Reduktase/Aldehyd-Dehydrogenase dar, Disulfiram und Allopurinol steigern die Effizienz einer weiteren Serotoninapplikation.
5. SERT wird kardial auf Proteinebene exprimiert und die Blockade mit Fluoxetin bewirkt einen positiv inotropen Effekt, der ein indirekter Hinweis für eine erhöhte extrazelluläre Serotonin-Konzentration sein kann.
6. Tyramin bewirkt bei transgenen Vorhofpräparaten einen positiv inotropen Effekt, vorstellbar durch eine Freisetzung von Serotonin aus den Kardiomyozyten.

## 9. Anhang

### 9.1. Puffer und Lösungen

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

### 9.2. Genotypisierung der Versuchstiere

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

### 9.3. Homogenisierung/ SDS-Polyacrylamidgel/ Westernblot

Homogenisationspuffer	NaHCO <sub>3</sub> 10 mM, 20 % SDS, pH 7,4
Probenpuffer	Tris-Base 0,125 M, SDS 4 %, Glycerol 20 %, Bromphenolblau 0,002 %, pH 6,8
Trenngel (10 %)	Porziopuffer 47,39 %, 30 %iges Acrylamid 31,6 %, Glycerol 7,9 %, H <sub>2</sub> O 12,64 %, TEMED 0,08 %, APS 1 %
Sammelgel (4 %)	Sammelgelpuffer 24,73 %, 30 %iges Acrylamid 12,16 %, H <sub>2</sub> O 61,05 %, TEMED 0,06 %, APS 1 %
Porziopuffer	Tris-Base 0,2 M, Glycin 0,6 M, EDTA 0,12 mM, SDS 0,2 %, Glycin 10 %, Polyacrylamid 0,4 %, pH 8,8
Sammelgelpuffer	Tris-Base 0,5 M, SDS 0,4 %, pH 8
APS	Ammoniumpersulfat (10 %) gelöst in Aqua dest.

Elektrophoresepuffer	Tris-Base 0,4 M, Glycin 1,2 M, SDS 0,4 %, pH 8,8, gelöst in 1l Aqua dest. (Verwendet wurde Verdünnung 1:10)
Transferpuffer	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 40 mM, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 7,9 mM, pH 8, gelöst in 5l Aqua dest.
Blockierungspuffer	TBST, 5 % Magermilchpulver, pH 7,4
TBST	Tris-Base 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1% (V/V), pH 7,4
AP-Puffer	Triethanolamin 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl <sub>2</sub> 5 mM, pH 9,4
ECF-Substrat-Lösung	ECF-Substrat 36 mg in ECF dilution buffer 60 ml gelöst

#### 9.4. Kontraktionskraft- und Frequenzmessungen an Mausvorhöfen

##### Tyrode-Lösung

Stamm I	NaCl 17,5 % (g/V), KCl 1,005 % (g/V), MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O 0,56 % (g/V)
Stamm II	NaHCO <sub>3</sub> 5,00 % (g/V)
Stamm III	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 0,29 % (g/V)
NaCl	119,8 mM
KCl	5,4 mM
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	1,1 mM
NaHCO <sub>3</sub>	22,6 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,42 mM
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,8 mM
Glucose	5,05 mM
Ascorbinsäure	0,28 mM
Na <sub>2</sub> EDTA	0,05 mM
pH 7,4	

#### 9.5. Verwendete Substanzen

Agarose, Typ SeaKem	FMC bioproducts, Philadelphia, USA
Allopurinol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumpersulfat 10 % (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Anti-AADC-Antikörper	antikoerper-online.de, ABIN2776802, Aachen
Anti-Mao-A-Antikörper	antikoerper-online.de, ABIN406595, Aachen
Anti-OCT2- Antikörper	antikoerper-online.de, ABIN4354103, Aachen
Anti-OCT3- Antikörper	antikoerper-online.de, ABIN2426897, Aachen
Anti-PMAT- Antikörper	antikoerper-online.de, ABIN754948, Aachen
Anti-TPH-Antikörper	Bio-Rad Laboratories, AHP930, München
anti-rabbit IgG+alk. Phosphatase	Sigma-Aldrich, Steinheim
anti-sheep IgG+alk. Phosphatase	Sigma-Aldrich, Steinheim
L(+)-Ascorbinsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Chloroform	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Compound 48/80	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cortison	Sigma-Aldrich, Steinheim
Decynium 22	Sigma-Aldrich, Steinheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Disulfiram	European Pharmacopoeia Reference Standard
DNA-Leiter GeneRuler™	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
dNTP	MBI Fermentas, Heidelberg
ECF Substrat +Puffer	GE Healthcare, Berlin
Essigsäure 100 %	Merck, Darmstadt
Ethanol 100 %	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Fluka Chemie GmbH, Neu-Ulm
Fluoxetin	Sigma-Aldrich, Steinheim
GR 113808	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerol	C. Roth GmbH, Karlsruhe
HCl	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Heparin	Biochrom AG, Berlin

5-Hydroxytryptophan	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isoamylalkohol	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Isoprenalin	Sigma-Aldrich, Steinheim
KCl	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Magermilchpulver	TSI GmbH, Zeven
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	C. Roth GmbH, Karlsruhe
NaCl	Merck, Darmstadt
Na <sub>2</sub> EDTA	C. Roth GmbH, Karlsruhe
NaHCO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
NSD1015	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pentobarbital	Spofa, Prag
Phenol	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Pyridoxal-5-Phosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Steinheim
Saccharose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Serotonin	Sigma-Aldrich, Steinheim
PCR-Puffer, 15 mM MgCl <sub>2</sub>	Ampliqon, Odense
Taq-DNA-Polymerase	Ampliqon, Odense
Tranylcypromin	Tocris Bioscience, Bristol
Tris-hydroxymethyl-aminomethan	Fluka AG, Buch
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween 20	Merck, Darmstadt
Tyramin	Sigma-Aldrich, Steinheim

**9.6. Geräte und Bezugsquellen**

Biophotometer; Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

Echokardiografie System Vevo® 2100; VisualSonics, Toronto, Canada

Elektrophorese-Einheit SE 600; Hoefer, San Francisco, USA

Elektrophoresekammer Typ Horizon 58; Life Technologies, Gaithersburg, USA

Kontraktionskraftmessanlage (Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim)

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

Mikrodismembrator S; Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen

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

pH-Meter; WTW GmbH, STH 600, Weilheim

Prism 5; Graphpad Software, San Diego, USA

Transfer-Einheit TE 62; Hoefer, San Francisco, USA

TYPHOON 9410 Variable Mark Imager; Amersham Biosciences, Freiburg

Waage Typ AT261 DeltaRange; Mettler Instruments GmbH, Gießen

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

**9.7. Primer**

Forward Primer      MHC-SEQ-P1, biomers.net GmbH, Ulm  
ACC CTT ACC CCA CAT AGA CC

Reverse Primer      5-HT-SEQ-P1R, biomers.net GmbH, Ulm  
AAA CAC CTC CCC ATA AAT CC

**9.8. PCR-Programm**

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

**9.9. Daten zu den verwendeten humanen Trabekelpräparaten**

Patient	Alter	Geschlecht	5-HTP	5-HT	Diagnose	Medis
C.S.	75	w	ja	-	Koronare Dreifäßerkrankung mit hochgradiger Aortenklappenstenose, arterielle Hypertonie, Angina pectoris, Hyperlipidämie	ASS 100, L-Thyroxin, Ezetimib, Simvastatin, Losartan, Phenprocoumon
H.J.	70	m	nein	ja	Koronare Dreifäßerkrankung mit Hauptstammstenose, arterielle Hypertonie, PAVK IIb, Arrhythmia absoluta bei VHF, Z.n. Kardioversion	ASS 100, Ramipril, Metoprolol, Xarelto, Pantoprazol, Simvastatin, Torasemid
R.W.	68	m	nein	ja	Koronare Dreifäßerkrankung, Z.n. NSTEMI, arterielle Hypertonie, Adipositas	ASS 100, Ramipril, Metoprolol, Torasemid, Ranitidin, Simvastatin, Clopidogrel
P.A.W.	46	m	ja	-	Koronare Dreifäßerkrankung, dekompensierte Herzinsuffizienz NYHA II/III, arterielle Hypertonie, leichtgradige Mitralklappeninsuffizienz, Dyslipoproteinämie, Nikotinabusus	ASS 100, Ramipril, Carvedilol, Torasemid, Eplerenon, Simvastatin, Phenprocoumon
K.P.	77	m	ja	-	Koronare Dreifäßerkrankung, leichtgradige Mitralklappeninsuffizienz arterielle Hypertonie	ASS 100, Clopidogrel, Bisoprolol, Valsartan, Moxonidin, Simvastatin
L.K.	78	w	ja	-	Koronare Dreifäßerkrankung, hochgradige Aortenklappenstenose, arterielle Hypertonie, Adipositas, Struma nodosa, Rheumatoide Arthritis	ASS 100, Clopidogrel, Carvedilol, Allopurinol, Prednisolon, Simvastatin, Adalimumab, Nicergolin

## **Selbstständigkeitserklärung**

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

### **Metabolismus von Serotonin und kontraktile Wirkung an 5-HT<sub>4a</sub>- Rezeptoren in Vorhöfen von Herzen transgener Mäuse**

im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der

Martin- Luther- Universität Halle- Wittenberg (Direktor: Prof. Dr. med. J. Neumann)

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

Halle, den

Franziska Jung

Weiterhin erkläre ich, keine weiteren Promotionsversuche an anderen Hochschulen unternommen zu haben.

Halle, den

Franziska Jung

## Lebenslauf

Name: Jung  
 Vorname: Franziska  
 Geburtsdatum/-ort: 25.09.1991 in Chemnitz (Sachsen)  
 Familienstand: ledig  
 Anschrift: Humboldtstraße 4, 06114 Halle (Saale)  
 Staatsangehörigkeit: Deutsch

## Berufliche Tätigkeit

seit 02/2017 Assistenzärztin für HNO-Heilkunde; Helios Klinik Hettstedt

## Studium

11/2016 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung – mündlicher Teil  
 11/2015 – 10/2016 Praktisches Jahr (Wahlterial: HNO UK Halle)  
 10/2015 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung – schriftlicher Teil  
 01/2015 – 07/2015 Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Pharmakologie Halle (Saale)  
 03/2014 Poster-Vorstellung bei der DGPT Jahrestagung in Kiel (deutsche Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie)  
 seit 06/2013 Doktorandin am Institut für Pharmakologie Halle (Saale) bei Prof. Joachim Neumann  
 09/2012 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 seit 10/2010 Studium der Humanmedizin an der Martin- Luther- Universität Halle Wittenberg

## Schulbildung

06/2010 Abitur  
 2002 – 2010 Besuch des Samuel- von- Pufendorf- Gymnasiums in Flöha (Sachsen)  
 1998 – 2002 Besuch der Grundschule Niederwiesa (Sachsen)

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Joachim Neumann bedanken, zum einen für die Überlassung des Themas, zum anderen für die ausdauernde Betreuung und permanente Ansprechbarkeit. Zu jeder Tageszeit hatte er ein offenes Ohr und Auge für meine anfangs oft noch nicht gelungenen Versuche und gute Verbesserungsvorschläge. Auch die Zusammenarbeit bei den echokardiografischen Versuchen war sehr bemerkenswert.

Weiterhin gilt ein besonderer Dank Herrn Dr. Ulrich Gergs, für die außerordentlich geduldige Betreuung und Beantwortung aller aufgetretenen Fragen und Probleme, sowie die Unterstützung beim Bearbeiten des Posters und des Vorstellen dieses in Kiel, sowie auch des Papers und die nützlichen Hinweise zum erstellen dieser Arbeit.

Ich danke auch allen anderen Mitarbeitern des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie für die familiäre Integration ins Team und die Hilfsbereitschaft bei jeglichen Fragen, die beim Experimentieren aufgetreten sind. Insbesondere Frau Sonja Reber, die mich im Präparieren und im Experimentierablauf schulte und zu der ich jederzeit kommen konnte, wenn es Probleme beim Präparieren gab und Frau Pia Willmy, die mir bei Problemen mit den verwendeten Substanzen immer schnellstmöglich und unkompliziert weiterhalf, sowie mich mit genügend Mäusen aus dem Tierstall versorgte.

Ein weiterer besonderer Dank gilt natürlich meinen Eltern und John. Ohne eure Unterstützung, Geduld und Motivation wäre das Experimentieren und Schreiben der Arbeit nicht möglich gewesen. Es hat lange gedauert, aber was lange währt, wird gut.