

**Serotonin-vermittelte Effekte auf isolierte Kardiomyozyten der Ratte
und die Rolle der Monoaminoxidase-A im kardialen Alterungsprozess**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Knittel, Jonas
aus Ehringshausen

Gießen 2024

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Physiologisches Institut

Gutachter: Prof. Dr. Klaus-Dieter Schlüter

Gutachter: Prof. Dr. Bernd Niemann

Tag der Disputation: 13. Juni 2024

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Physiologie des Herzens und der Kardiomyozyten	1
1.2	Reaktive Sauerstoffspezies im Herzen	2
1.2.1	Oxidativer Stress bei kardialen Erkrankungen	5
1.2.2	Oxidativer Stress im kardialen Alterungsprozess	6
1.2.3	Oxidativer Stress und körperliche Aktivität bei essentieller Hypertonie	6
1.3	Monoaminoxidasen und Serotoninstoffwechsel	7
1.3.1	Serotoninstoffwechsel im Herzen	8
1.3.2	Pathophysiologische Aspekte der Monoaminoxidasen	11
1.3.3	Therapeutisches Potential von Monoaminoxidase-Inhibitoren	12
1.4	Arbeitshypothesen	13
2	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1	Geräte	15
2.1.1	Allgemein verwendete Geräte	15
2.1.2	Isolation und Kultivierung der Kardiomyozyten	16
2.1.3	Kontraktionsmessungen	16
2.1.4	Isolation kardialer Mitochondrien und Quantifizierung von Wasserstoffperoxid	17
2.1.5	Proteinisolation und Western Blot	17
2.1.6	cDNA-Synthese und qPCR	18
2.2	Verbrauchsmaterial	18
2.3	Chemikalien	19
2.4	Medien, Puffer und Lösungen	20
2.4.1	Isolation und Kultivierung der Kardiomyozyten	20
2.4.2	Isolation der Mitochondrien	20
2.4.3	Proteinisolation, Western Blot und qPCR	20
2.5	Computerprogramme	21
2.6	Antikörper	21
2.7	Primer	22
2.8	Tierkollektiv	22
2.8.1	Rattenmodell	23
2.9	Tiertötung und Gewebeentnahme	23
2.10	Isolation und Kultivierung der Kardiomyozyten	24
2.10.1	Zellisolation	24
2.10.2	Zellkultivierung	27
2.11	Bestimmung kardialer Kontraktionsparameter	28
2.12	Quantifizierung mitochondrialer Wasserstoffperoxid-Produktion	30
2.12.1	Isolation kardialer Mitochondrien	30
2.12.2	Quantifizierung von Wasserstoffperoxid	31
2.13	Western Blot	31
2.13.1	Proteinisolation aus Gewebeproben	32
2.13.2	Proteinmengenbestimmung	32

2.13.3	Proteinseparation.....	33
2.13.4	Proteintransfer.....	33
2.13.5	Proteinnachweis.....	33
2.14	Quantitative Polymerasekettenreaktion.....	34
2.14.1	RNA-Isolation aus Gewebeprobe.....	34
2.14.2	Reinheits- und Integritätsbestimmung.....	35
2.14.3	cDNA-Synthese.....	35
2.14.4	Sequenzauswahl der Primerpaare.....	36
2.14.5	Auswahl der Referenzgene.....	36
2.14.6	Durchführung der qPCR.....	36
2.14.7	Auswertung.....	37
2.15	Statistik.....	38
3	ERGEBNISSE.....	39
3.1	Abschnitt 1: <i>in-vitro</i>-Versuche.....	39
3.1.1	Monoaminoxidasen im Rattenherz.....	39
3.1.2	Einfluss von Serotonin auf die Kontraktilität von Kardiomyozyten.....	40
3.1.2.1	Kurzfristige Effekte unter Einfluss von Serotonin.....	40
3.1.2.2	Langfristige Effekte unter Einfluss von Serotonin.....	41
3.1.3	Quantifizierung von Wasserstoffperoxid in isolierten kardialen Mitochondrien.....	42
3.2	Abschnitt 2: <i>in-vivo</i>-Versuche.....	43
3.2.1	Altersabhängige Expression der Monoaminoxidase-A.....	44
3.2.2	Altersabhängige Expression der Monoaminoxidase-A unter körperlicher Aktivität.....	44
3.2.3	Altersabhängige Expression der Monoaminoxidase-B.....	47
3.2.4	Altersabhängige Expression der Monoaminoxidase-B unter körperlicher Aktivität.....	47
3.2.5	Altersabhängige Expression des Serotonin-Transporters.....	49
3.2.6	Altersabhängige Expression des Serotonin-Transporters unter körperlicher Aktivität.....	49
3.2.7	Altersabhängige Expression der Aldehyddehydrogenase-2.....	51
3.2.8	Altersabhängige Expression der Aldehyddehydrogenase-2 unter körperlicher Aktivität.....	51
3.2.9	Altersabhängige Expression der Katalase.....	53
3.2.10	Altersabhängige Expression der Katalase unter körperlicher Aktivität.....	53
3.2.11	Altersabhängige Expression des Serotonin-Rezeptors-2A.....	55
3.2.12	Altersabhängige Expression des Serotonin-Rezeptors-2B.....	55
3.2.13	Zusammenfassung der Expressionsanalysen.....	56
4	DISKUSSION.....	59
4.1	Abschnitt 1: <i>in-vitro</i>-Versuche.....	59
4.1.1	Dominanz der Monoaminoxidase-A im Rattenherz.....	59
4.1.2	Abnahme der kontraktile Funktion von Kardiomyozyten unter Einfluss von Serotonin.....	60
4.1.3	Serotonin bewirkt eine Monoaminoxidase-A-vermittelte Produktion von Wasserstoffperoxid.....	62
4.2	Abschnitt 2: <i>in-vivo</i>-Versuche.....	62
4.2.1	Tiermodell zur Erfassung altersabhängiger Effekte, dem Einfluss arterieller Hypertonie und körperlicher Aktivität.....	63
4.2.2	Expressionsveränderungen der Monoaminoxidase-A, Aldehyddehydrogenase-2 und Katalase.....	63

4.2.3	Expressionsveränderung der Monoaminoxidase-A, Aldehyddehydrogenase-2 und Katalase unter Einfluss körperlicher Aktivität.....	65
4.2.4	Expressionsveränderung der Monoaminoxidase-B mit und ohne Einfluss körperlicher Aktivität	67
4.2.5	Expressionsveränderungen des Serotonin-Transporters mit und ohne Einfluss körperlicher Aktivität.....	67
4.2.6	Expressionsveränderungen serotonerger Rezeptoren	69
4.2.7	Zusammenfassung der Expressionsveränderungen	70
4.3	Limitationen der Arbeit und Ausblick	72
5	ZUSAMMENFASSUNG	74
6	SUMMARY	75
7	ANHANG.....	76
7.1	Einfluss von Clorgylin auf die Kontraktilität von Kardiomyozyten	76
7.2	Weitere Kontraktionsparameter zum Einfluss von Serotonin auf die Kontraktilität von Kardiomyozyten.....	76
8	LITERATURVERZEICHNIS	78
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	91
10	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	94
11	TABELLENVERZEICHNIS.....	103
12	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....	104
13	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG.....	105
14	DANKSAGUNG.....	106
15	TABELLARISCHER LEBENS LAUF.....	107

1 Einleitung

Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems stellten im Jahr 2021 mit einem Anteil von etwa 33 % deutschlandweit die häufigste Todesursache dar.¹³⁸ Neben einer hohen Mortalität führten Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems auch zu erheblichen Kosten für das Gesundheitssystem. So nahmen diese Krankheiten im Jahr 2020 in Deutschland mit mehr als 44 Milliarden Euro etwa 13 % der gesamten Krankheitskosten in Anspruch.¹³⁹ Reaktive Sauerstoffspezies (ROS, engl. *reactive oxygen species*) spielen eine wesentliche Rolle in der Entstehung und dem Fortschreiten kardiovaskulärer Erkrankungen.^{39,102,144} Eine Überproduktion von ROS führt zu oxidativem Stress, der einen negativen Einfluss auf die reguläre Zellphysiologie zur Folge hat.¹⁴⁰ Es sind einige zytosolische und mitochondriale Enzyme bekannt, die zur Produktion von ROS beitragen.¹⁰² Mitochondrien stellen in diesem Zusammenhang eine der Hauptquellen von intrazellulären ROS dar, die vor allem im Rahmen der Zellatmung an Enzymen der Atmungskette anfallen.^{84,102} Darüber hinaus konnte auch die Produktion von ROS durch Monoaminoxidasen (MAO)s nachgewiesen werden.^{35,66} Hierbei handelt es sich um eine Enzymgruppe mit zwei Isoformen, MAO-A und MAO-B, die an der äußeren mitochondrialen Membran gelegen und an der Metabolisierung biogener Amine beteiligt sind.¹⁵⁸ Aufgrund der Enzymfunktion im Abbau von Signalmolekülen (u.a. Neurotransmitter und Katecholamine) sowie der begleitenden Produktion von ROS, wurde die kardiale Bedeutung von MAOs zuletzt intensiver erforscht.^{64,66,93,116} Serotonin, auch als 5-Hydroxytryptamin (5-HT) bezeichnet, stellt neben Noradrenalin ein Hauptsubstrat der MAO-A dar.¹⁵⁸ Serotonin kann einerseits über spezifische serotonerge Rezeptoren auf die kardiomyozytäre Funktion einwirken.⁶⁸ Andererseits führt die Metabolisierung von Serotonin durch die MAO-A zur Bildung von ROS.¹¹ Ziel dieser Arbeit war es daher, die Rolle der MAOs und weiterer Serotoninstoffwechsel-assoziiierter Enzyme sowie die Effekte von Serotonin auf die Herzfunktion von Ratten zu analysieren und weitere therapeutische Ansatzpunkte in der Prävention kardialer ROS-Entstehung zu charakterisieren.

1.1 Physiologie des Herzens und der Kardiomyozyten

Grundlegend für die Pumpfunktion des Herzens sind Kardiomyozyten (KMZ), die zur Kontraktion fähig sind und bis zu 85 % des kardialen Volumens ausmachen.¹⁶⁰ Das Herz hat nur eine geringe Regenerationskapazität, da es sich um ein Gewebe aus größtenteils postmitotischen Zellen handelt.¹⁵⁰ Pro Herzschlag verbraucht das menschliche Herz ca.

300 mg Adenosintriphosphat (ATP).⁴⁵ Jeden Tag entspricht das, bei einer mittleren Herzfrequenz von 70 Schlägen pro Minute, einem durchschnittlichen Verbrauch von 30 kg ATP.⁴⁵ Aufgrund des hohen Energiebedarfs handelt es sich beim Herzen um ein Organ mit einem hohen Vorkommen an Mitochondrien.¹⁵⁰ Damit eine synchronisierte Herzaktion ablaufen kann, sind die einzelnen Zellen als funktionelles Synzytium über sog. *gap junctions* verbunden.¹²³ Die elektrische Stimulation wird über diese spezialisierten Zell-Zell-Kontakte an die benachbarten Zellen weitergegeben.¹²³ Das Aktionspotential wird in den Herzmuskelzellen in eine mechanische Kontraktion konvertiert, was als elektromechanische Kopplung beschrieben wird.¹²⁶ Abhängig vom Aktionspotential kommt es zu einem Einstrom von Calcium über die Öffnung von L-Typ-Ca²⁺-Kanälen.¹²⁶ Das intrazelluläre Calcium bewirkt eine Calcium-induzierte Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) durch Aktivierung von Ryanodin-Rezeptoren.¹²⁶ Calcium interagiert mit Troponin C am kontraktilem Apparat und aktiviert die Myosinkomplexe, wodurch die Kontraktion gestartet werden kann.¹²⁶ Die Kontraktion wird beendet, indem zytosolisches Calcium durch eine sarkoplasmatische Ca²⁺-ATPase (SERCA) wieder dem SR zugeführt wird.¹²⁶ Ebenso trägt ein Na⁺/Ca²⁺-Austauscher (NCX) zum Absinken der intrazellulären Calciumkonzentration durch Austausch von intrazellulärem Calcium mit extrazellulärem Natrium bei.¹²⁶ Neben der Kontraktilität besitzen KMZ auch eine endokrine Funktion, indem sie natriuretische Peptide (ANP, atriales natriuretisches Peptid und BNP, B-Typ natriuretisches Peptid) synthetisieren und sezernieren können.²⁹ Die eigentliche Herzerregung wird durch Schrittmacherzellen erzeugt.¹⁵¹ Die Erregung folgt dem Reizleitungssystem, bestehend aus Sinusknoten, atrioventrikulärem Knoten, His-Bündel, Kammerschenkeln und Purkinje-Fasern.^{126,151} Durch die Verzweigung der Purkinje-Fasern im Myokard erfolgt eine Übertragung der Erregung auf die KMZ.^{126,151}

1.2 Reaktive Sauerstoffspezies im Herzen

ROS ist ein Überbegriff für eine Gruppe von Molekülen, die eine kurze Halbwertszeit aufweisen und aufgrund ihrer chemischen Reaktivität in den Zellstoffwechsel eingreifen können.¹⁰² Zu den ROS zählt man u.a. Superoxid-Anionen (O₂^{•-}), Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Hydroxyl-Radikale (HO[•]).¹⁰² Neben zytosolischen Enzymen (u.a. NADPH-Oxidasen, Xanthin-Oxidasen, Cyclooxygenasen, Cytochrom-P450-Enzyme) konnten auch einige mitochondriale Enzyme (u.a. Enzyme der Atmungskette, p66^{Shc}, NOX4, MAOs) als Quelle für ROS identifiziert werden (Übersicht s. Abb. 1).¹⁰² Unter physiologischen Umständen sind bis zu 90 % der ROS mitochondrialen Ursprungs, wobei Enzyme der

Atmungskette wesentlich involviert sind.¹⁶ Die Atmungskette umfasst vier enzymatische Komplexe (Komplex I-IV), die unter Beteiligung der Elektronentransporter, Ubiquinon und Cytochrom C, einen Membrangradienten aufbauen, der im letzten Schritt der Atmungskette durch eine ATP-Synthase zur Synthese von ATP genutzt wird.¹⁵⁹ Zum Aufbau des Membrangradienten werden Elektronen aus Reduktionsäquivalenten (NADH und FADH₂) genutzt.¹⁵⁹ Während des Elektronentransports können Elektronen aus dem Transportsystem entweichen und mit Sauerstoff reagieren, was zur Bildung von Superoxid-Anionen führt.¹⁴⁵ Etwa 0,2 % bis 2 % der Elektronen in der Elektronentransportkette entweichen auf diese Weise und tragen somit konstant zur mitochondrialen ROS-Entstehung bei.¹⁵⁹ Das entstehende Superoxid-Anion kann aufgrund seiner Polarität nicht entlang der mitochondrialen Membran diffundieren und wird durch mitochondriale Superoxid-Dismutasen (Mn-SOD) zu frei diffundierendem Wasserstoffperoxid abgebaut.⁶⁶ Neben den Enzymen der Atmungskette ist auch das zytosolische Adapterprotein p66^{Shc} an der mitochondrialen ROS-Entstehung beteiligt.³⁴ p66^{Shc} kann in seiner phosphorylierten Form in das Mitochondrium translozieren und mit Cytochrom C interagieren, indem es Elektronen abfängt und auf Wasser überträgt, sodass Wasserstoffperoxid entsteht.³⁴ Ebenso trägt NOX4, das zur Gruppe der NADPH-Oxidasen (NOX) gezählt wird, zur mitochondrialen ROS-Entstehung bei.⁷³ NOX sind größtenteils zytosolisch lokalisiert, es konnte aber speziell für NOX4 ein Nachweis in der inneren mitochondrialen Membran (IMM) von KMZ erfolgen.⁷³ NOX übertragen ein Elektron von NADPH auf Sauerstoff, wobei Superoxid-Anionen freigesetzt werden.⁷³ MAOs sind ebenfalls an der Entstehung von ROS beteiligt.^{35,66} Sie befinden sich in der äußeren mitochondrialen Membran (ÄMM) und katalysieren den Abbau von biogenen Aminen und Katecholaminen, wobei Wasserstoffperoxid als Nebenprodukt freigesetzt wird.⁶⁶ Unter physiologischen Umständen tragen die genannten Enzyme durch die Entstehung von ROS als Signalmoleküle zur physiologischen Herzfunktion bei (engl. *redox signaling*).¹¹⁸ Beschrieben sind Einflüsse von ROS bei der Herzentwicklung, der Differenzierung von KMZ, dem Calciumhaushalt und der Blutflussregulation.¹⁹ Eine Überproduktion von ROS geht mit oxidativem Stress einher, der die physiologische Zellfunktion negativ beeinflusst.¹¹⁰ Es kommt zu einer Schädigung von Proteinen, Lipiden, der Desoxyribonukleinsäure (DNA, engl. *deoxyribonucleic acid*) und der mitochondrialen Funktion, was insgesamt den Zelltod fördert.¹¹⁰

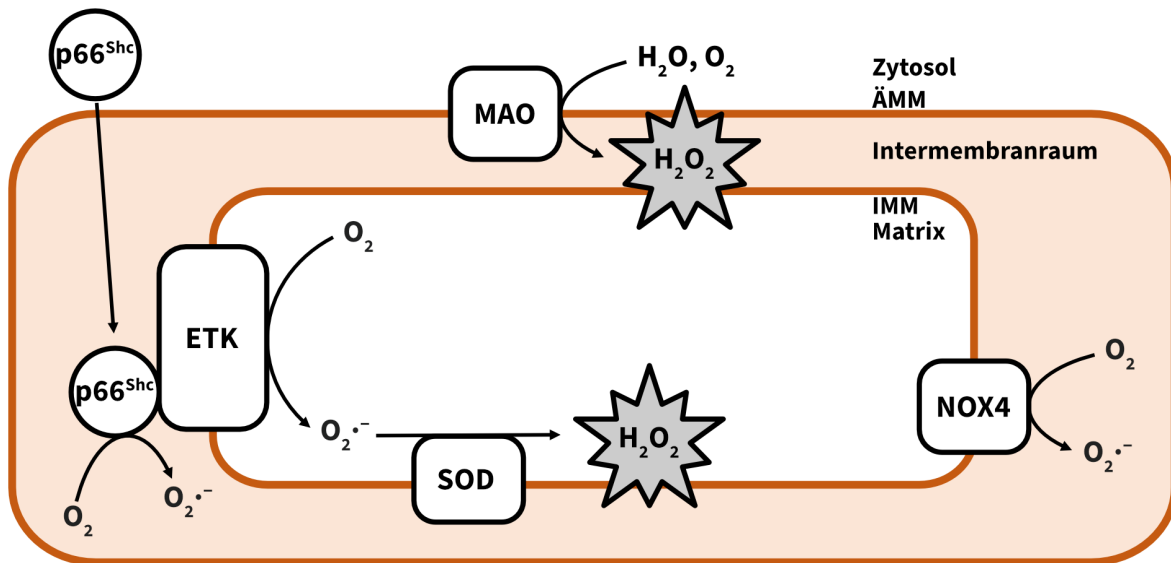


Abbildung 1: Übersicht der mitochondrialen Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies. Die wesentliche Entstehung von ROS geht auf die Enzyme der Elektronentransportkette (ETK) zurück. Die Enzyme der ETK befinden sich im Bereich der inneren mitochondrialen Membran (IMM). Einige Elektronen durchlaufen nicht den regulären Transportweg und werden auf Sauerstoff übertragen, sodass Superoxid-Anionen ($O_2^{\cdot-}$) entstehen. p66^{Shc} befindet sich im Zytosol und kann bei zellulärem Stress in das Mitochondrium translozieren. Dort interagiert p66^{Shc} mit Cytochrom C, das Bestandteil der ETK ist. p66^{Shc} führt ebenfalls durch Übertragung von Elektronen auf Sauerstoff zur Entstehung von Superoxid-Anionen. NOX4 ist an der IMM gelegen und nutzt NADPH zur Übertragung von Elektronen auf Sauerstoff. Superoxid-Anionen können nicht entlang der mitochondrialen Membran diffundieren und werden durch Superoxid-Dismutasen (SOD) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) abgebaut. MAOs befinden sich an der äußeren mitochondrialen Membran (ÄMM) und katalysieren den Abbau von biogenen Aminen und Katecholaminen, wobei es zur Freisetzung von Wasserstoffperoxid kommt.

Oxidativer Stress konnte bei einer Vielzahl von kardialen Pathologien festgestellt werden. Zu nennen sind hier u.a. Zustände der kardialen Hypertrophie⁸⁹, Herzinsuffizienz¹⁴⁴ und diabetischen Kardiomyopathie⁸⁰. Zur Aufrechterhaltung der regulären Zellfunktion und der Vermeidung von oxidativem Stress verfügt die Zelle über antioxidative Enzyme (engl. *antioxidative defense*).^{101,102} Superoxid-Dismutasen (SOD) metabolisieren Superoxid-Anionen zu Wasserstoffperoxid, welches wiederum von Katalasen zu Wasser und Sauerstoff abgebaut wird.¹⁰² Verschiedene Isoformen der SOD kommen sowohl zytosolisch als auch mitochondrial vor.¹⁰² Bei der Katalase handelt es sich um ein überwiegend peroxisomal lokalisiertes Enzym, das aber auch in kardialen Mitochondrien nachgewiesen wurde.¹⁰⁹ Darüber hinaus tragen Glutathionperoxidasen und Peroxiredoxine zum Abbau von Wasserstoffperoxid bei.¹⁰² Letztlich bestimmt das Gleichgewicht zwischen ROS-Produktion und ROS-Neutralisierung das intrazelluläre ROS-Niveau und trägt damit zur zellulären ROS-Homöostase bei. Dieser Zustand wird auch als Redox-Balance beschrieben.⁵

1.2.1 Oxidativer Stress bei kardialen Erkrankungen

Im Herzen kann ein übermäßiges Vorhandensein von ROS zur Entwicklung und zum Fortschreiten eines maladaptiven Myokardumbaus führen.¹⁰⁵ ROS beeinflussen die Zellphysiologie und die kontraktilen Elemente der KMZ, indem sie mit Proteinen interagieren und sie in ihrer Funktion beeinträchtigen.¹⁴² So können ROS zur Umkehr der Transportrichtung des NCXs mit nachfolgender Steigerung der intrazellulären Calciumkonzentration führen.¹⁶¹ Ebenso kommt es zu ROS-bedingten Modulationen von L-Typ-Ca²⁺-Kanälen, SERCA und Ryanodin-Rezeptoren.¹⁶¹ Die Modulationen bedingen insgesamt eine Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration (engl. *calcium overload*), die eine kontraktile Dysfunktion zur Folge hat.¹⁶¹ Zusätzlich gibt es ROS-bedingte Auswirkungen auf die extrazelluläre Matrix, indem es zu einer Proliferation kardialer Fibroblasten kommt und Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) aktiviert werden.¹⁴² Bereits vor über 40 Jahren wurden ROS mit kardialen Ischämie-Reperfusionsschäden in Verbindung gebracht.⁵¹ Die Schädigung wird durch einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in Folge des hypoxischen ATP-Mangels bedingt.⁹⁵ Die mitochondriale Calciumakkumulation und die ischämische Schädigung der Atmungskette bewirken eine zunehmende ROS-Produktion, was zur Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätspore (MPTP, engl. *mitochondrial permeability transition pore*) beiträgt.⁹⁵ Bei der MPTP handelt es sich um einen nicht-selektiven Ionentransporter, der zur mitochondrialen Depolarisation und Freisetzung proapoptotischer Signale führt.⁹⁵ Durch die ROS-bedingte mitochondriale Dysfunktion kommt es zu einer ROS-induzierten Freisetzung weiterer mitochondrialer ROS, was unter dem Begriff der ROS-induzierten-ROS-Freisetzung beschrieben wurde.¹⁶² Neben dem akuten Einfluss von ROS beim Reperfusionsschaden konnten auch ROS-bedingte Effekte bei einer Herzinsuffizienz nachgewiesen werden, die mit einer mitochondrialen Calciumakkumulation durch eine verminderte ATP-Produktion einhergingen.¹²⁰ Abseits der Auswirkung auf den Calciumhaushalt konnten weitere negative Effekte von ROS bei einer Herzinsuffizienz festgestellt werden: Es kommt zur Aktivierung von Signalwegen, die den Zelltod fördern, zur Proliferation kardialer Fibroblasten, zur Aktivierung von MMPs, zur Schädigung der mitochondrialen DNA (mtDNA) mit resultierender mitochondrialen Dysfunktion und zu kardialer Hypertrophie.⁷⁰

1.2.2 Oxidativer Stress im kardialen Alterungsprozess

Altern stellt alleine betrachtet einen Risikofaktor für die Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen dar.¹³⁶ Eine Abgrenzung zu altersabhängigen Herzerkrankungen (u.a. Arteriosklerose und Koronare Herzerkrankung) erscheint in Anbetracht dessen schwierig, sodass Altern als solches auch als pro-pathologischer Prozess betrachtet werden kann.⁷⁷ Denham Harman stellte bereits im Jahr 1956 die Theorie auf, dass freie Radikale, zu denen auch ein Teil der ROS gezählt wird, der Ursprung des Alterns seien.⁵⁸ Seine Hypothese wurde unter der *free radical theory of aging* bekannt.⁵⁸ Der Alterungsprozess am Herzen zeichnet sich auf zellulärer Ebene durch zunehmende Seneszenz aus, die mit vermehrtem Zelltod einhergeht.¹³¹ Im Alter kommt es zu einer Veränderung in der Expression von Proteinen, die an der Produktion und am Abbau von ROS beteiligt sind.¹⁰¹ Die antioxidative Kapazität nimmt ab während es gleichzeitig zu einer erhöhten Produktion von ROS kommt.¹⁰¹ Mitochondriale ROS-Produktion nimmt dabei eine Schlüsselposition ein.^{30,143} Belege für die Bedeutung von Mitochondrien lieferten Schriner *et al.* bereits im Jahr 2005, indem sie zeigten, dass transgene Mäuse mit mitochondrialer Überexpression der Katalase eine um 18 % verlängerte Lebensspanne aufwiesen im Vergleich zu Tieren mit peroxisomaler oder nukleärer Katalase-Überexpression.¹²⁸ Mitochondrien sind nicht nur wesentliche ROS-Produzenten, sondern auch potentieller Angriffspunkt für ROS, indem sie die mtDNA schädigen.^{104,150} Die Schädigung bewirkt dabei einerseits die Abnahme der mitochondrialen Funktion mit konsekutivem Energieverlust der Zelle und andererseits eine vermehrte Produktion von ROS.^{104,108,150} Die ablaufende Kaskade wirkt auf die kardiale ROS-Homöostase ein und führt zur Zellschädigung mit vermehrtem Zelltod.^{104,150} Mitochondrien verfügen im Gegensatz zum Nukleus über keine Reparaturmechanismen bei Schädigung der DNA, sodass mtDNA-Schäden im zeitlichen Verlauf akkumulieren.¹⁰⁸ Hierin wird eine grundlegende Ursache gesehen, welche die Bedeutung der mtDNA im Alterungsprozess hervorhebt.¹⁰⁸

1.2.3 Oxidativer Stress und körperliche Aktivität bei essentieller Hypertonie

Arterielle Hypertonie ist ein wesentlicher Risikofaktor in der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen.⁷¹ Eine arterielle Hypertonie liegt nach Definition der Leitlinie der *European Society of Cardiology* (ESC) aus dem Jahr 2018 vor, sobald Blutdruckwerte von über 140 mmHg (systolisch) und/oder 90 mmHg (diastolisch) gemessen werden.¹⁵³ Die Ätiologie wird in eine primäre und sekundäre Form unterteilt.¹⁵³ Am häufigsten liegt eine primäre

Hypertonie vor, die auch als essentielle Hypertonie bezeichnet wird.¹⁵³ Ätiologisch handelt es sich um ein multifaktorielles Geschehen, das im Zusammenhang mit Übergewicht, Bewegungsmangel und zunehmendem Alter steht.⁵⁷ Körperliche Aktivität zählt zu den Primärempfehlungen der Therapie einer essentiellen Hypertonie, die unter dem Begriff der Lifestyle-Maßnahmen subsumiert werden.¹⁵³ Oxidativer Stress konnte vielfach in Zusammenhang mit arterieller Hypertonie und Hypertonie-bedingter endothelialer Dysfunktion beobachtet werden.¹²⁹ Wesentlicher Ursprung von ROS in der Pathogenese der Hypertonie sind Enzyme der NOX-Gruppe: NOX-bedingte ROS können eine mitochondriale Dysfunktion bewirken und den oxidativen Stress zunehmend erhöhen.⁵² Körperliche Aktivität ist in der Lage die zelluläre Belastung durch ROS zu verringern und protektiv auf die endotheliale Funktion einzuwirken.⁶⁰ Trotz des protektiven Einflusses auf die Entstehung von ROS liegen auch Berichte aus Tierversuchen vor, die negative Effekte in Bezug auf die kardiale Funktion unter körperlicher Aktivität bei manifester arterieller Hypertonie aufzeigen.^{28,127} So konnte eine zunehmende kardiale Fibrose mit einer diastolischen Dysfunktion bei hypertensiven Ratten beobachtet werden, obwohl körperliche Aktivität zu einer Abnahme von ROS führte.¹²⁷

1.3 Monoaminoxidasen und Serotoninstoffwechsel

Bei MAOs handelt es sich um Enzyme der äußeren mitochondrialen Membran, die am Abbau von biogenen Aminen und Katecholaminen beteiligt sind und im Jahr 1928 erstmalig von Mary Bernheim im Lebergewebe beschrieben wurden.¹³³ Für die enzymatische Aktivität benötigen MAOs Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) als Kofaktor.¹⁵⁸ MAOs werden anhand ihrer Substratspezifität und ihrer Sensitivität gegenüber pharmakologischer Inhibitoren in zwei Isoformen, MAO-A und MAO-B, unterteilt.⁴² Jede Isoform wird von separaten Genabschnitten kodiert, wobei die Proteine in ihrer Aminosäuresequenz zu über 90 % übereinstimmen.^{7,53} MAO-A katalysiert bevorzugt den Abbau von Noradrenalin und Serotonin, wobei bereits niedrige Konzentrationen an Clorgylin (Clg) diesen Vorgang spezifisch inhibieren.¹⁵⁸ MAO-B präferiert als Substrate Phenylethylamin und Benzylamin.¹⁵⁸ Selegilin stellt einen spezifischen Inhibitor der MAO-B dar.¹⁵⁸ Beide Isoformen können Dopamin, Tyramin und weitere Substrate metabolisieren.¹⁵⁸ Als Hauptprodukt entsteht beim Abbau von Aminen ein Aldehyd.⁴² Begleitend werden Ammoniak und Wasserstoffperoxid freigesetzt.⁴² Das Aldehyd wird im weiteren Verlauf durch die Aldehyddehydrogenase-2 (ALDH2) zur korrespondierenden Säure verstoffwechselt.⁴¹ Die Stoffwechselprodukte der MAOs können potentiell toxisch auf

Zellen wirken.^{63,88} Von besonderer Bedeutung ist Wasserstoffperoxid, das zu den ROS gezählt wird und als solches schädlich auf die Zelle einwirken kann (s. Kap. 1.2). Wasserstoffperoxid kann darüber hinaus intrazellulär eine Reaktion mit Eisen eingehen und Hydroxyl-Radikale bilden, was auch als Fenton-Reaktion bezeichnet wird.¹⁵⁴ Die Expression der MAOs unterscheidet sich zwischen verschiedenen Organen und Geweben. Die Verteilung der MAOs wurde zuerst im zentralen Nervensystem untersucht.¹⁵² MAO-A und MAO-B wurden in differenzierten Hirnregionen nachgewiesen.¹⁵² Im peripheren Gewebe wurde MAO-A vorwiegend im Darm, in der Plazenta, im Muskelgewebe, in den Nieren, in der Leber und in der Milz nachgewiesen.⁵³ MAO-B wurde vorwiegend im Darm, der Leber, den Nebennieren und der Lunge nachgewiesen.⁵⁴ Der Nachweis von MAOs im Herzen wurde zu Beginn in neuronalen Nervenendigungen verortet, die im Zusammenhang mit dem Abbau von Neurotransmittern stehen.² In Denervierungsexperimenten konnte jedoch gezeigt werden, dass sich ein Großteil der kardialen MAOs extraneuronal befinden.^{83,111} In nachfolgenden Untersuchungen konnten MAOs in verschiedenen Zellen des Herzgewebes, einschließlich KMZ, nachgewiesen werden.⁹³ In humanen KMZ kommen beide Isoformen vor, wobei MAO-A im Vergleich zu MAO-B in größerer Menge exprimiert zu werden scheint.¹³² Es konnte darüber hinaus eine Varianz der Verteilung zwischen verschiedenen Spezies beobachtet werden: Eine einzelne Arbeit beschrieb MAO-A als die dominante Isoform im Herzgewebe der Ratte, wohingegen MAO-B im Herzgewebe der Maus dominiert.³⁸

1.3.1 Serotoninstoffwechsel im Herzen

Serotonin gilt neben Noradrenalin als eines der Hauptsubstrate der MAO-A und ist an der Regulation der Herzfunktion beteiligt.¹⁵⁸ Serotonin wird hauptsächlich von enterchromaffinen Zellen des Darms produziert und in das Blut sezerniert.¹⁴⁹ Dort wird es von Thrombozyten aufgenommen, gespeichert und bei Aktivierung in Form einer Degranulation freigesetzt.⁴⁰ Lange Zeit galt die Freisetzung aus aktivierten Thrombozyten im Rahmen der Hämostase als einzige Quelle von Serotonin im Herzen. Es konnte aber auch eine Synthese von Serotonin in kardialen Endothelzellen nachgewiesen werden.¹¹³ Darüber hinaus scheinen auch KMZ selbst Enzyme der Serotoninsynthese zu exprimieren.¹⁰⁶ Die Wirkung von Serotonin auf das kardiovaskuläre System ist vielfältig (Übersicht s. Abb. 2). Extrazelluläres Serotonin kann über einen spezifischen Serotonin-Transporter (SERT) intrazellulär aufgenommen werden.^{11,12} Neben SERT sind weitere Transporter für Monoamine, zu denen neben Serotonin auch Katecholamine zählen, bekannt. Der Plasma-

Membran-Monoamin-Transporter (PMAT) und verschiedene Isoformen des Organischen-Kationen-Transporters (OCT) scheinen eine weitere Möglichkeit für die intrazelluläre Aufnahme von Serotonin darzustellen.^{49,137} Nach der Aufnahme in die Zelle kommt es durch MAO-A zur Inaktivierung von Serotonin, indem dieses in einer oxidativen Desaminierung zu 5-Hydroxyindolacetaldehyd (5-HIAL, engl. *5-hydroxyindoleacetaldehyde*) metabolisiert wird.¹⁴ Begleitend wird Wasserstoffperoxid und Ammoniak freigesetzt.¹⁴ 5-HIAL kann daraufhin durch die ALDH2 zu 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA, engl. *5-hydroxyindoleacetic acid*) verstoffwechselt und mit dem Urin ausgeschieden werden.¹⁴ Wasserstoffperoxid wird von Katalasen in Wasser und Sauerstoff abgebaut.¹⁴ Die Wirkung von Serotonin kann aber auch durch membranständige Serotonin-Rezeptoren (5-HTR) vermittelt werden, von denen sieben Rezeptorklassen (5-HT₁R bis 5-HT₇R) mit weiteren Subtypen im kardiovaskulärem System bekannt sind.⁶⁸ Es handelt sich um G-Proteingekoppelte Rezeptoren und für KMZ scheinen 5-HT_{2A}R, 5-HT_{2B}R und 5-HT₄R von besonderer Bedeutung zu sein.^{22,48,96} 5-HT_{2A}R konnte in hypertrophierten KMZ vermehrt nachgewiesen werden.⁴⁸ Außerdem konnte gezeigt werden, dass 5-HT_{2A}R über eine zelluläre Signalkaskade zur kardiomyozytären Hypertrophie beiträgt.⁴⁸ 5-HT_{2B}R konnten demgegenüber protektive Effekte auf KMZ unter apoptotischen Bedingungen unterstellt werden, indem u.a. die Expression des proapoptotischen Proteins Bax inhibiert wird.⁹⁶ Serotonin kann demnach über 5-HT_{2B}R stabilisierend auf Mitochondrien einwirken. Serotonin ist auch über Rezeptoren in der Lage einen Einfluss auf die Kontraktilität von KMZ zu nehmen. Für 5-HT₄R sind positiv inotrope, chronotrope und lusitrope Effekte beschrieben, die auf Beeinflussung von HCN-Kanälen (engl. *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel*) und L-Type-Ca²⁺-Kanälen zurückgeht.²² Bei HCN-Kanälen handelt es sich um Ionenkanäle, die an der Entstehung des Schrittmacherpotentials beteiligt sind.¹ Die beschriebenen Effekte des 5-HT₄R beschränken sich jedoch auf atriale KMZ.²² Eine Übertragbarkeit auf ventrikuläre KMZ ist bisher nicht bestätigt.

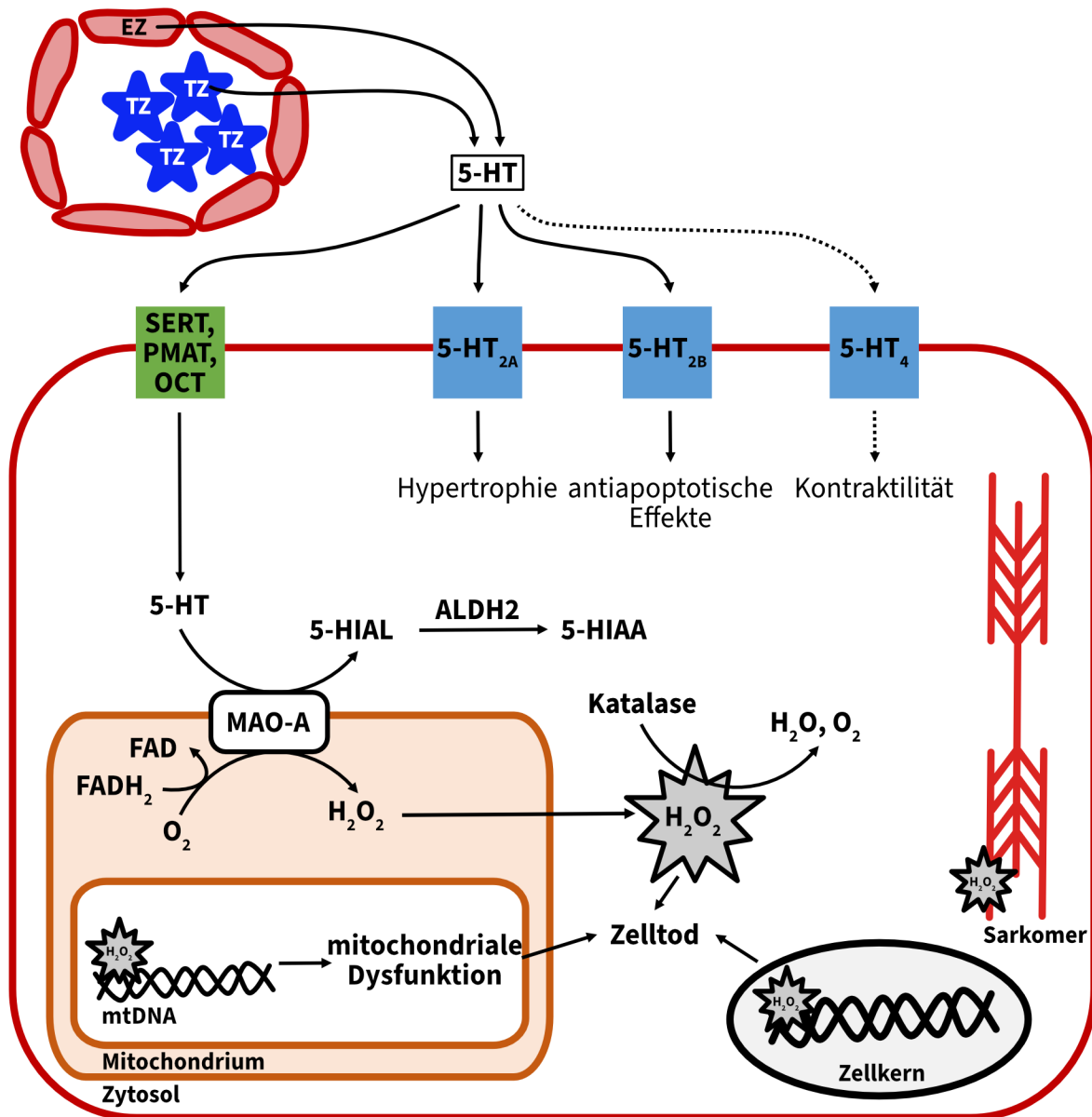


Abbildung 2: Übersicht des Serotoninstoffwechsels in Kardiomyozyten. Serotonin (5-HT) kann aus aktivierten Thrombozyten (TZ) in kardialen Gefäßen oder auch aus kardialen Endothelzellen (EZ) freigesetzt werden und entweder Rezeptor-abhängig (farblich blau dargestellt) oder Transporter-abhängig (farblich grün dargestellt) auf KMZ einwirken. Die Rezeptor-vermittelte Wirkung über Serotonin-Rezeptoren kann über 5-HT_{2A}R, 5-HT_{2B}R oder 5-HT₄R erfolgen. 5-HT_{2A}R bewirkt die Aktivierung einer Signalkaskade, welche die Entstehung einer kardialen Hypertrophie fördert, wohingegen 5-HT_{2B}R antiapoptotische Effekte aufzeigt. 5-HT₄R konnte bisher lediglich in atrialen KMZ nachgewiesen werden und bewirkt eine Zunahme der Kontraktilität. Da eine ubiquitäre Wirkung im Herzen nicht angenommen werden kann, sind die 5-HT₄R-vermittelten Effekte durch gestrichelte Linien dargestellt. Eine intrazelluläre Aufnahme von 5-HT ist über spezifische (SERT) und unspezifische Transporter (PMAT, OCT) möglich. In der Zelle wird 5-HT MAO-A-vermittelt zu 5-HIAL abgebaut, was wiederum durch die ALDH2 zu 5-HIAA metabolisiert wird. Als Nebenprodukt der MAO-A-vermittelten Reaktion fällt Wasserstoffperoxid (H₂O₂) an, welches als ROS eine Schädigung des kontraktiven Apparats bewirkt, indem es mit Proteinen der Sarkomere interagiert. Darüber hinaus schädigt Wasserstoffperoxid die mtDNA, was in einer mitochondrialen Dysfunktion resultiert. Durch Schädigung des Zellkerns und weiterer Organellen fördert Wasserstoffperoxid den Zelltod. Wasserstoffperoxid kann durch Katalasen zu Wasser und Sauerstoff abgebaut werden.

1.3.2 Pathophysiologische Aspekte der Monoaminoxidasen

Verschiedene tierexperimentelle Untersuchungen konnten die wesentliche Bedeutung von MAOs in der kardiomyozytären ROS-Entstehung belegen.^{64,66} Die protektiven Effekte, die unter pharmakologischer oder genetischer Inhibierung der MAOs beobachtet werden konnten, schließen beide Isoformen ein. Aufgrund der Variabilität in der kardialen Expression erfolgten Untersuchungen der MAO-A überwiegend an Ratten, wohingegen Untersuchungen der MAO-B an Mäusen stattfanden. An Mäusen konnte der Nachweis erfolgen, dass MAO-B im Progress einer kardialen Dysfunktion in Folge einer erhöhten Druckbelastung involviert ist⁶⁵ und eine kardiale Deletion der MAO-B das Ausmaß von Reperfusionsschäden verringert.⁶¹ Eine Inhibierung der MAO-A konnte auch in Ratten das Ausmaß von kardialen Reperfusionsschäden vermindern¹¹ und protektiv auf die schädlichen Effekte einer kardialen Druckbelastung einwirken.^{62,65,141} Der protektive Einfluss einer pharmakologischen MAO-A-Inhibition mit Moclobemid konnte auch für Rattenherzen nach Myokardinfarkt belegt werden.¹⁴⁸ Die Effekte wurden zumeist der MAO-A-vermittelten Entstehung von Wasserstoffperoxid zugeschrieben, das zur mitochondrialen Dysfunktion beiträgt (s. Kap. 1.2). Villeneuve *et al.* zeigten, dass eine herzspezifische Überexpression der MAO-A zu strukturellen Defekten der Mitochondrien mit ATP-Mangel führt.¹⁴⁷ In anschließenden Versuchen an dem gleichen Tiermodell konnte auch eine MAO-A-vermittelte Schädigung der Telomere aufgezeigt werden, die im Zusammenhang mit kardialer Alterung stehen.⁴ Außerdem konnten sie eine p-53-vermittelte Repression von PGC-1 α (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor-c coactivator-1a*) feststellen, was den Zelltod förderte.¹⁴⁷ PGC-1 α stellt einen Transkriptionsfaktor dar, der regulatorisch vielfältig auf die mitochondriale Funktion einwirkt.¹⁴⁶ Die Schädigung von MAO-A-bedingtem Wasserstoffperoxid ist jedoch nicht nur auf Mitochondrien begrenzt: Es ist auch ein Einfluss auf die kontraktilen Proteine, Aktin und Tropomyosin, beschrieben.⁹² Wasserstoffperoxid führt zur Oxidation der Proteine und trägt dadurch zur kontraktilen Dysfunktion bei.⁹² Neben Wasserstoffperoxid entstehen bei der enzymatischen Aktivität der MAO-A auch Aldehyde, die ebenfalls zytotoxische Effekte aufweisen.⁹⁹ Aldehyde haben reaktive Eigenschaften und können Reaktionen mit Lipiden, Proteinen und der DNA eingehen.²⁴ Die Aldehyde werden durch die ALDH2 in Säuren abgebaut (s. Kap. 1.3.1). Eine Stimulierung der ALDH2 konnte das Ausmaß kardialer Schädigung durch Ischämie-Reperfusion mindern.²³ Kaludercic *et al.* zeigten darüber hinaus, dass eine Inaktivierung der ALDH2 zu einer Akkumulation von Aldehyden aus dem MAO-B-vermittelten Dopaminabbau führt und damit den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials

bedingt.⁶⁵ Für einige pathophysiologische Zustände, u.a. kardiale Hypertrophie und Herzinsuffizienz, ist eine kardiale Expressionszunahme der MAO-A beschrieben worden.⁶⁴ Es konnte auch eine altersabhängige Überexpression registriert werden, die mit einer erhöhten Produktion von Wasserstoffperoxid einherging.^{87,90} Ungeklärt ist jedoch der altersabhängige Einfluss weiterer Serotoninstoffwechsel-assoziiierter Enzyme. Außerdem ist die Frage ungeklärt, weshalb es im Alter und bei kardialen Erkrankungen zu einer deutlichen Zunahme der kardialen Expression der MAO-A kommt.

1.3.3 Therapeutisches Potential von Monoaminoxidase-Inhibitoren

Bekanntheit erreichten MAO-Inhibitoren bereits in den 1950iger Jahren als medikamentöse Behandlungsmöglichkeit bei Depression. Ursprünglich war der Wirkstoff Iproniazid zur Behandlung von Tuberkulose entwickelt worden, aber es konnte als Nebeneffekt eine stimmungsaufhellende Wirkung festgestellt werden.³¹ Aufgrund vielseitiger Wechselwirkungen mit Nahrungsmitteln, verloren die frühzeitigen Inhibitoren jedoch an Bedeutung.³¹ Die Wechselwirkungen wurden als *cheese effect* bekannt, da Tyramin-haltige Speisen (u.a. gealterter Käse, Rotwein) hypertensive Krisen auslösen konnten.¹⁵⁶ Der Effekt beruht darauf, dass Tyramin ein Substrat der MAOs darstellt und in hohen Konzentrationen sympathomimetisch wirkt.¹⁵⁶ Erst im Zusammenhang mit der Entwicklung weiterer spezifischer Inhibitoren rückten MAO-Inhibitoren wieder in das Interesse der klinischen Medizin.³¹ Man unterscheidet heute die MAO-Inhibitoren bezüglich ihrer Selektivität gegenüber beider Isoformen und deren pharmakologischer Reversibilität. So existieren irreversible nicht-selektive MAO-Inhibitoren (Iproniazid), irreversible selektive MAO-Inhibitoren (Clg für MAO-A und Selegilin für MAO-B) und reversible selektive MAO-Inhibitoren (Moclobemid für MAO-A).³¹ Selegilin stellt einen wesentlichen Bestandteil der Therapie bei Morbus Parkinson dar.⁴³ Moclobemid besitzt aktuell lediglich einen Stellenwert als Reservetherapeutikum bei behandlungsresistenter unipolarer Depression.⁶ Die positiven kardialen Effekte durch pharmakologische oder genetische MAO-Inhibition sind lediglich im Tierversuch belegt (s. Kap. 1.3.2). Wesentliche Untersuchungen am Menschen hinsichtlich des Einflusses auf kardiovaskuläre Ereignisse sind bisher nicht erfolgt, obwohl der pharmakologische Fortschritt der MAO-Inhibitoren eine sicherere Anwendung ermöglichen würde.³² Von Interesse sind solche Untersuchungen insofern, dass Depressionen eine wesentliche Komorbidität bei kardialen Ereignissen darstellen. Murphy *et al.* konnten in ihrer Untersuchung an einer australischen Kohorte mit akuten kardialen Ereignissen eine Prävalenz für Depressionen von 17 % im Anschluss an das Ereignis

feststellen.⁹⁴ MAO-A-Inhibitoren stellen somit einen vielversprechenden pharmakologischen Ansatz in der Therapie kardialer Erkrankungen bei der Komorbidität einer Depression dar.

1.4 Arbeitshypothesen

Die Ziele dieser Arbeit wurden in zwei Abschnitte gegliedert. Der erste Abschnitt bestand vorwiegend aus *in-vitro*-Versuchen an isolierten KMZ der Ratte, wohingegen der zweite Abschnitt *in-vivo*-Versuche am Rattenherz mit Expressionsanalysen wesentlicher Serotoninstoffwechsel-assoziiierter Enzyme und Rezeptoren beinhaltete.

Abschnitt 1: *in-vitro*-Versuche

Da eine Dominanz der MAO-A im Rattenherz beschrieben worden war³⁸, galt es zuerst die vermutete Dominanz im Herzgewebe und in isolierten ventrikulären KMZ des vorliegenden Rattenkollektivs zu bestätigen. Wir stellten hierzu folgende Hypothese auf: **MAO-A ist die dominante Isoform der MAOs im Rattenherz.**

MAO-A ist in der Lage über Stoffwechselprodukte (Wasserstoffperoxid und Aldehyde), die bei der Metabolisierung von Serotonin anfallen, zytotoxisch zu wirken.⁶⁶ Der Nachweis einer direkten MAO-A-vermittelten Schädigung der kontraktilen Funktion isolierter KMZ liegt bisher nicht vor. Wir setzten hierzu das MAO-A-Substrat Serotonin an isolierten ventrikulären KMZ ein und analysierten die kontraktile Funktion. Zur empirischen Überprüfung stellten wir folgende Hypothese auf: **Serotonin führt MAO-A-vermittelt zu einer funktionellen Schädigung isolierter adulter ventrikulärer KMZ, die in einer Abnahme kontraktile Parameter resultiert.**

Abschnitt 2: *in-vivo*-Versuche

In einem zweiten Abschnitt sollten anhand von Expressionsanalysen die altersabhängige Expression der MAOs und weiterer Serotoninstoffwechsel-assoziiierter Enzyme analysiert werden. Da eine altersabhängige Zunahme der MAO-A-Expression bereits beschrieben worden war⁹⁰, untersuchten wir zusätzlich den Einfluss auf weitere Enzyme (MAO-B, ALDH2, Katalase, SERT) und Rezeptoren (5-HT_{2A}R, 5-HT_{2B}R). Es ist bisher unklar, ob die Expressionszunahme der MAO-A einen adaptiven oder maladaptiven Prozess darstellt. Die Betrachtung weiterer Enzyme ermöglichte es die Expressionszunahme der MAO-A in den Serotonin-Stoffwechsel einzuordnen. Ein adaptiver Prozess würde demnach mit einer kompensatorischen Expressionszunahme der ALDH2 und Katalase einhergehen,

wohingegen wir dies bei einem maladaptiven Prozess nicht erwarteten. Hierzu formulierten wir folgende explorative Hypothese: **Alter und Hypertonie führen im Rattenmodell zu einer Zunahme der MAO-A-Expression und beeinflussen konsekutiv die Expression weiterer Serotoninstoffwechsel-assoziiertes Enzyme und Rezeptoren.**

Zusätzlich untersuchten wir den altersabhängigen Einfluss auf die Expression bei arterieller Hypertonie und körperlicher Aktivität. Da bereits gezeigt werden konnte, dass körperliche Aktivität bei arterieller Hypertonie in der Lage ist kardiale ROS zu mindern^{60,127}, erwarteten wir auch einen Einfluss auf die Expression der MAOs und weiterer Serotoninstoffwechsel-assoziiertes Enzyme. Körperliche Aktivität könnte demnach in der Lage sein die Expression ROS-produzierender Enzyme (MAOs) und ROS-eliminierender Enzyme (Katalase) so zu beeinflussen, dass die Redox-Balance wiederhergestellt wird. Wir stellten zur Überprüfung unserer Annahme folgende explorative Hypothese auf: **Körperliche Aktivität führt im Rattenmodell mit Hypertonie zu einer Expressionsabnahme der MAO-A, wohingegen es zu einer Expressionszunahme der ALDH2 und Katalase kommt.**

2 Material und Methoden

Die verwendeten Materialien sind nachfolgend alphabetisch gemäß ihrer Bezeichnung aufgelistet. Sofern bekannt, ist zusätzlich der Produktname angegeben. Die Angabe des Herstellers erfolgt ohne Nennung der Rechtsform, der Standort bezieht sich auf den Hauptsitz des produzierenden Unternehmens.

2.1 Geräte

2.1.1 Allgemein verwendete Geräte

Bezeichnung	Produktname	Hersteller
Bauchdeckenschere, 160 mm		Aescluap, Tuttlingen, Deutschland
Bunsenbrenner	FireBoy	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Exsikkator		Duran Group, Wertheim, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Biozero BZ-8000K	Keyence, Osaka, Japan
Glasware		Schott, Mainz, Deutschland
Hybridisierungssofen	Hybridiser HB-1D	Techne, Wertheim-Bestenheid, Deutschland
Kapselpinzette		Eickemeyer, Tuttlingen, Deutschland
Kreisschüttler	MS2 Minishaker	IKA-Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland
Krokodilklemme		Eickemeyer, Tuttlingen, Deutschland
Laufräder		Trixie Heimtierbedarf, Tarp, Deutschland
Messzylinder		Duran Group, Wertheim, Deutschland
Mikroplatten-Leser	Infinite® 200	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Mikroskop	M60	Leica Camera, Wetzlar, Deutschland
pH-Meter	pH211 microprocessor	HANNA Instruments, Vöhringen, Deutschland
Pipetten	Eppendorf Research® Plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Präparierschere groß		Aescluap, Tuttlingen, Deutschland
Präparierschere klein		Aescluap, Tuttlingen, Deutschland
Präzisionswaage groß		Kern & Sohn, Balingen, Deutschland

Präzisionswaage klein	Acculab	Sartorius Group, Göttingen, Deutschland
Sterilbank	HERAsafe®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Teflonscheibe		Cavey Laboratory Engineering, Goomshall, UK
Ultraschallprozessor	UP100H	Hielscher Ultraschall-Technologie, Teltow, Deutschland
Zentrifuge	Microfuge® 18 Centrifuge	Beckman Coulter, Pasadena, CA, USA

2.1.2 Isolation und Kultivierung der Kardiomyozyten

Bezeichnung	Produktname	Hersteller
Brutschrank	Heraeus® BBD 6220	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Büchnertrichter		Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Gewebeschnneider	Mcllwain Tissue Chopper	Cavey Laboratory Engineering, Goomshall, UK
Kanüle, 1,8 cm Innendurchmesser	Eigenanfertigung	Physiologisches Institut, Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland
Langendorff-Perfusionsanlage	Eigenanfertigung	Physiologisches Institut, Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland
Nylongaze, 200 µm Porengröße		Neolab, Berlin, Deutschland
Peristaltikpumpe	ISMATEC®	Cole-Parmer, Wertheim, Deutschland
Plastikscheibe		Cavey Laboratory Engineering, Goomshall, UK
Silikonverbindung für Kanüle, 1,5 cm Innendurchmesser	flexiPERM®	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Uhrglasschale		Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserbad	Aqualine AL 18	Lauda, Lauda-Königshofen, Deutschland
Wasserbad mit Wärmepumpe	Lauda CS 6	Lauda, Lauda-Königshofen, Deutschland
Zentrifuge	Allegra 21 Series	Beckman Coulter, Pasadena, CA, USA

2.1.3 Kontraktionsmessungen

Kontraktionsmessungen wurden an einer Konstruktion nachfolgender Geräte durchgeführt, die von der Firma Scientific Instruments (Gilching, Deutschland) als Sonderanfertigung für das Physiologische Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen (nachfolgend als Physiologisches Institut bezeichnet) zusammengestellt wurden.

Bezeichnung	Produktname	Hersteller
Computerbildschirm	Philips Observation Monitor	Philips, Hamburg, Deutschland
Elektrischer Stimulator	Stimulator T	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
Interface	INT4	SI Heidelberg, Deutschland
Mikroskop		Nikon, Tokio, Japan
Oszillograph	OS 90204	LG Group, ehemals GoldStar, Seoul, Südkorea
Videokamera		Nikon, Tokio, Japan
Zeilenkamera		Scientific Instruments, Gilching, Deutschland

2.1.4 Isolation kardialer Mitochondrien und Quantifizierung von Wasserstoffperoxid

Bezeichnung	Produktname	Hersteller
Homogenisator nach Potter-Elvehjem (5 ml)		Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge mit Thermostat	Heraeus Fresco 17 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Spektrophotometer	Cary Eclipse	Agilent, Santa Clara, CA, USA

2.1.5 Proteinisolation und Western Blot

Bezeichnung	Produktname	Hersteller
Chemilumineszenz-Kamera	ChemiDoc 5000	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Entwicklerschalen		Labor Products, Gaithersburg, MD, USA
Gelkammer	XCell SureLock™ Mini-Cell	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Glasplatte		Biometra, Göttingen, Deutschland
Hamiltonspritze	Miroliter® Nr. 710	Hamilton Germany, Planegg-Martinsried, Deutschland
Heizblock	Dri-Block® DB-2D	Techne, Wertheim, Deutschland
Laborschüttler	Unimax 1010	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Roller		Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Schwämme		Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Stromversorgung Elektrophorese	PS 608 electrophoresis power supply	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Transfermodul	XCell II Blot Module	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ultraschall-Homogenisator	UP100H	Hielscher Ultrasonics, Teltow, Deutschland

2.1.6 cDNA-Synthese und qPCR

Bezeichnung	Produktname	Hersteller
Homogenisator	Precellys® 24 tissue homogenizer	Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich
Spektrophotometer	NanoDrop® ND-1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Thermocycler	CFX Connect Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Vortexmischer	Vortex Genius 3	IKA-Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland
Zentrifuge	Allegra 25R	Beckman Coulter, Pasadena, CA, USA

2.2 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Produktname	Hersteller
Blotting-Papier	Sorte 703	VWR Darmstadt, Deutschland
Gel für Gelelektrophorese	NuPAGE™ Bis-Tris Gel	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Keramikkügelchen	Precellys® Keramik-Kit	Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich
Kulturschalen	Falcon Typ 353001	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Mikrotiterplatte	96-well crystal clear	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Nitrocellulosemembran	Protein nitrocellulose membrane	Whatman GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Pipettenspitzen		Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Proteinmarker	Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, 26634	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Röhrchen mit Schraubverschluss (15 ml, 50 ml)	CELLSTAR®	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml)	CELLSTAR®	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Skalpell	Skalpell Nr. 21	Feather, Köln, Deutschland
Verschlussfolie	Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA
Zellschaber		Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellstoff		Hartmann, Heidenheim, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	Corning™ Falcon™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.3 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Adenosintriphosphat (ATP)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aqua bidest.	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Benzonase	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Carbogen	Praxair Deutschland, Düsseldorf, Deutschland
Carnitin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Clorgylin (Clg)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Creatin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Cytosin-Arabinofuranosid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
D(+)-Glukose Monohydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
dATP-Lösung	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
dCTP-Lösung	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
dGTP-Lösung	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
dTTP-Lösung	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
EGTA (Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum Gold (FCS)	GE Healthcare Bio-Sciences, Pasching, Österreich
FS-Puffer, 5x	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Glutamat (L-Glutaminsäure)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure)	Roche, Mannheim, Deutschland
Isofluran	Abbvie, Wiesbaden, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kollagenase Typ 2	Worthington Biochemical, Lakewood, NJ, USA
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Malat (Maleinsäure)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Medium 199	Biochrom, Berlin, Deutschland
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
MOPS (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid-Lösung (0,9 %)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Oligo dt	Roche, Mannheim, Deutschland
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml) Gibco™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Serotonin (5-HT)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Taurin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris-gepufferte Salzlösung (TBS), 20x	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Tris-HCl (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Meerrettich-Peroxidase (HRP, engl. <i>horseradish peroxidase</i>)	Roche, Mannheim, Deutschland

2.4 Medien, Puffer und Lösungen

2.4.1 Isolation und Kultivierung der Kardiomyozyten

Bezeichnung	Zusammensetzung bzw. Bezeichnung und Hersteller
Ausplattier- und Wasch-Medium (für je 20 Kulturschalen)	20 ml CCT, 400 µl Penicillin-Streptomycin (2 %), pH 7,4
Creatin-Carnitin-Taurin-Medium (CCT)	9,8 g/l Medium M199, 2 mM Carnitin, 5 mM Creatin, 10 µM Cytosin-Arabinofuranosid, 15 mM HEPES, 5 mM Taurin, gelöst in Aqua bidest., pH 7,4
Kollagenaselösung	5 ml Powell-Medium, 25 mg Kollagenase Typ 2, 250 µM CaCl ₂
Powell-Medium	110 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,2 mM KH ₂ PO ₄ , 1,2 mM MgSO ₄ , 25 mM HEPES, 10 mM Glukose, pH 7,4
Vorplattier-Medium (für je 20 Kulturschalen)	20 ml CCT, 800 µl FCS (4 %), 400 µl Penicillin-Streptomycin (2 %), pH 7,4

2.4.2 Isolation der Mitochondrien

Bezeichnung	Zusammensetzung bzw. Bezeichnung und Hersteller
Glutamat-Malat-Inkubationspuffer	125 mM KCl, 10 mM MOPS, 1,2 mM MgCl ₂ , 1,2 mM KH ₂ PO ₄ , 20 µM EGTA, 5 mM Glutamat, 2,5 mM Malat, gelöst in Aqua bidest., pH 7,4
Isolationspuffer	100 mM KCl, 50 mM MOPS, 5 mM MgSO ₄ , 1 mM ATP, 1 mM EGTA, gelöst in Aqua bidest.

2.4.3 Proteinisolation, Western Blot und qPCR

Bezeichnung	Zusammensetzung bzw. Bezeichnung und Hersteller
cDNA-Synthese-Mix	4 µl 5x FS-Puffer, 1 µl Oligo dt (50 µM), 1 µl dNTP-Lösungen (10 mM je Nukleotid), 1 µl 100 mM DTT, 0,2 µl RNasin Plus (25 U/µl, Promega, Dübendorf, Deutschland), 1 µl SuperScript IV Transcriptase (200 U/µl, Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA)

Lämmli-Puffer	Probenpuffer nach Lämmli, 2x (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Lyse-Puffer	100 µl Cell Lysis Buffer (10x, 9803, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), 900 µl H ₂ O, 10 µl 0,1 M PMSF
Transfer-Puffer	50 ml NuPAGE™ Transfer Buffer (NP0006, Thermo Fisher Scientific), 1 ml NuPAGE™ Antioxidant (NP0005, Thermo Fisher Scientific), 200 ml Methanol, 749 ml Aqua bidest.

2.5 Computerprogramme

Bezeichnung	Bezugsquelle
Affinity Designer 1.10.6	Serif, Nottingham, UK
Biozero image analysis application	Keyence, Osaka, Japan
Biozero observation application	Keyence, Osaka, Japan
Cary Eclipse Software	Agilent, Santa Clara, CA, USA
CFX Maestro Software 2.0	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
ImageJ 1.53k	National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
Microsoft Excel für Mac, Version 16.70	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Microsoft Word für Mac, Version 16.70	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Mucell	Scientific Instruments, Gilching, Deutschland
ND-100, Version 3.5.1	Coleman Technologies, Langley, Kanada
Prism 9 for macOS	GraphPad Software, Boston, MA, USA
Tecan Magellan, Version 6	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Zotero 6.0.21	Corporation for Digital Scholarship, Vienna, VA, USA

2.6 Antikörper

Die Antikörper wurden in Tris-gepufferter Salzlösung (TBS), 5 % bovinem Serumalbumin (BSA) und 0,1 % Tween20 gemäß der nachfolgend angegebenen Verdünnung inkubiert. Unterschieden wurden primäre und sekundäre Antikörper. Primäre Antikörper richten sich gegen das gewünschte Zielantigen. Sekundäre Antikörper zeichnen sich dadurch aus, dass sie an primäre Antikörper binden können und mit einer Meerrettich-Peroxidase (HRP, engl. *horseradish peroxidase*) gekoppelt sind.

Zielantigen	Spezies	Klonalität	Verdünnung	Typ und Kopplung	Bestellnummer	Hersteller
GAPDH	Maus	polyklonal	1:4000	primär	ABS16	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaninchen-IgG	Ziege	polyklonal	1:2000	sekundär, HRP-gekoppelt	P0448	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
MAO-A	Kaninchen	monoklonal	1:1000	primär	Ab126751	Abcam, Cambridge, UK
MAO-B	Kaninchen	polyklonal	1:1000	primär	M1821	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.7 Primer

Die aufgeführten Primer wurden in der quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR) zum Flankieren der gewünschten Nukleotidsequenzen genutzt. Die Primerpaare wurden, wie im Kap. 2.14.4 beschrieben, für komplementäre Gene der Spezies *Rattus norvegicus* bestimmt und von ThermoFisher Scientific geliefert. Für jedes Gen ist die Referenzsequenz aus der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, National Library of Medicine, Bethesda, MD, USA) angegeben. Die Nomenklatur der Gene erfolgte in Anlehnung an die *Rat Genome Database* (RGD).¹³⁵ Die qPCR wurde unter Einhaltung der primerspezifischen Annealing-Temperatur (Temp.) durchgeführt.

Gen (Spezies: <i>Rattus norvegicus</i>)	Gen-name	NCBI-Referenz-Sequenz	Temp.	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')
Aldehyd-Dehydrogenase 2 (ALDH2)	<i>ALDH2</i>	NM_032416.1	60 °C	TGGCTGATCTCA TCGAACGG	CAGCCAGCATAA TAGCGGAGA
Beta-2-Mikroglobulin	<i>B2M</i>	NM_012512.2	60 °C	GCCGTCGTGCTT GCCATTC	CTGAGGTGGGTG GAACTGAGAC
Hypoxanthin-Phosphoribosyl-transferase 1	<i>HPRT</i>	NM_012583	60 °C	CCAGCGTCGTGA TTAGTGAT	CAAGTCTTTCAG TCCTGTCC
Katalase	<i>CAT</i>	NM_012520.2	60 °C	GCCCCTCCTCGT TCAAGATG	TATCCAAAAGCA CCTGCTCCC
Monoaminoxidase-A (MAO-A)	<i>MAOA</i>	NM_033653.1	60 °C	GTTGGACAAAAA CTGCTCGGG	GGAACCACAGGG CAGATACC
Monoaminoxidase-B (MAO-B)	<i>MAOB</i>	NM_013198.1	60 °C	GGCTGTGCTGCT ATAATGGGA	ATAATGGACTGG CTGCAGAGC
Ribosomales Protein L32	<i>RPL32</i>	NM_013226.2	60 °C	CAGGGTGCGGA GAAGATTCA	TCTCAGCACAGT AAGATTTGTTGC
Serotonin-Rezeptor 2A (5-HT _{2A} R)	<i>HTR2A</i>	NM_017254.1	60 °C	TGGTCATCATGG CAGTGTC	CCACCGGTACCC ATACAGGA
Serotonin-Rezeptor 2B (5-HT _{2B} R)	<i>HTR2B</i>	NM_017250.1	60 °C	ATGTTTGAGGCT ACATGGCCC	CGGGAATTGCAC TGATTGGC
Serotonin-Transporter (SERT)	<i>SLC6A4</i>	NM_013034.4	59 °C	AGGAGTTCTACT TGCGCCAT	TTGCCAGATGTT TTGACGCC

2.8 Tierkollektiv

In dieser Arbeit wurden männliche Wistar-Hannover-Ratten (WIS, Stamm: RjHan:WI, Herkunft: Zentralinstitut für Versuchstierzucht Hannover, Deutschland) bei Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) bezogen. Ebenfalls wurden weibliche spontan hypertensive Ratten (SHR, Stamm: SHR/NHsd, Herkunft: National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) bei Envigo (Indianapolis, IN, USA) bestellt. Alle Ratten waren zum Bestellzeitpunkt

etwa 6 Wochen alt. Die Tiere wurden nach der Ankunft im Tierstall des Physiologischen Institutes unter Standardbedingungen (Temperatur 20-24 °C, Luftfeuchtigkeit 45-65 %, konstanter Tag/Nacht-Rhythmus) in Gruppen zu je drei Ratten gehalten. Es wurden Futter (Altromin Hybridpellet, Altromin Spezialfutter, Lage, Deutschland) und Wasser *ad libitum* gestellt.

2.8.1 Rattenmodell

Zur Untersuchung altersabhängiger Effekte war es notwendig, dass Ratten unterschiedlicher Altersstufen für spätere Versuche getötet wurden. Die Gewebeentnahme erfolgte bei WIS und SHR an drei Altersstufen zu je 6, 30 und 46 Wochen. Bis zum Erreichen der Altersstufen wurden die Tiere wie oben beschrieben im Tierstall gehalten. Neben altersabhängigen Effekten konnte durch den Vergleich zwischen WIS und SHR der Einfluss einer essentiellen Hypertonie untersucht werden. SHR werden in diesem Zusammenhang seit den 1960iger Jahren als Tiermodell verwendet und gehen auf ein Inzuchtmodell von Okamoto und Aoki zurück.¹⁰⁰ Die arterielle Hypertonie wird polygenetisch vererbt und führt zur Entwicklung einer manifesten arteriellen Hypertonie nach 12 bis 14 Wochen mit systolischen Blutdruckwerten zwischen 180 mmHg und 220 mmHg.^{37,107} Außerdem wurde der Einfluss körperlicher Aktivität auf SHR untersucht, indem Laufräder innerhalb der Käfige platziert wurden. Hierzu konnte auf bereits vorliegende Gewebeproben aus vorherigen Tierversuchen zurückgegriffen werden, die in Teilen durch Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Arbeitsgruppe bereits publiziert worden waren.^{28,127,155} Das Modell stellt ein etabliertes Verfahren zur Untersuchung von körperlicher Aktivität bei hypertensiven Kreislaufverhältnissen dar.¹²⁴ Für diese Arbeit wurden Expressionsanalysen an den konservierten Herzgewebeproben von SHR verschiedenen Alters (6, 12, 22 und 30 Wochen) mittels qPCR durchgeführt.

2.9 Tiertötung und Gewebeentnahme

Die Tiertötung und Gewebeentnahme erfolgten durch Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Physiologischen Institutes. Gemäß Tierschutzgesetz § 6 Abs. 4 wurde die Tiertötung den Tierschutzbeauftragten der Justus-Liebig-Universität Gießen unter dem Aktenzeichen 561_M angezeigt. Vor der Gewebeentnahme wurde je eine Ratte in einen Exsikkator gesetzt, in welchem sich ein Luftgemisch mit 5 % Isofluran befand. Nach mehrminütiger Exposition konnte die Ratte in einen tiefen Narkotisierungszustand (u.a. bemerkbar durch fehlende Stell- und Haltereфлекse, verlangsamte Atmung und fehlende Reaktion auf Umweltreize)

versetzt werden. Erst wenn die Ratte diesen Zustand erreicht hatte, wurde sie aus dem Exsikkator genommen und durch zervikale Dislokation getötet. Das Abdomen wurde kaudal des Rippenbogens eröffnet, sodass das Diaphragma einsehbar war. Durch einen Einschnitt des Diaphragmas konnten die nun kollabierten Lungenflügel und das dazwischenliegende Herz mit ventral liegendem Thymus visualisiert werden. Es folgte ein kranialer Schnitt oberhalb des Thymus zur Durchtrennung der herznahen Gefäße, sodass Lunge, Herz und Thymus als Organpaket entnommen werden konnten. Das Organpaket wurde in 4 °C kalte Kochsalzlösung überführt. Innerhalb der Kochsalzlösung wurde das Herz von anliegendem Gewebe freipräpariert, indem die Lungenflügel herznah abgetrennt und Fettgewebe inklusive Thymus entfernt wurden. Von besonderer Bedeutung war die möglichst langstreckige Erhaltung der Aorta, da diese zur retrograden Perfusion an der Langendorff-Perfusionsanlage benötigt wurde. Neben der Entnahme von Herzgewebe wurde auch Lebergewebe gewonnen, indem ein Teil des linken Leberlappens mit einer Schere vom Rest der Leber abgetrennt wurde.

2.10 Isolation und Kultivierung der Kardiomyozyten

Das Arbeiten mit Primärkulturen aus adulten ventrikulären KMZ der Ratte stellte eine wesentliche Grundlage dieser Arbeit dar und diente als Voraussetzung für weitere Versuche. Das Verfahren folgte der von Nippert *et al.* publizierten Methode und wurde nach den Standardanweisungen der Arbeitsgruppe durchgeführt.^{98,125} Die Langendorff-Perfusionsanlage wurde als Eigenanfertigung durch das Physiologische Institut bereitgestellt (Übersicht s. Abb. 3).

2.10.1 Zellisolation

Zum Lösen der KMZ aus dem Gewebeverbund war eine enzymatische Verdauung mit Kollagenaselösung (s. Kap. 2.4.1) an einer Langendorff-Perfusionsanlage notwendig. Die grundlegende Methodik der Herzperfusion *ex vivo* beruht auf den von Langendorff beschriebenen Untersuchungen am Säugetierherz aus dem Jahre 1895.⁷⁸ Die Herzperfusion erfolgt dabei retrograd über die *Aorta ascendens*, indem der Perfusionsdruck zu einem Verschluss der Aortenklappe führt, sodass das Perfusat über die Ostien entlang der Koronarien geleitet wird. Das Perfusat tritt im Anschluss über den *Sinus coronarius* aus und tropft an der Herzspitze ab.

Vorab musste die Langendorff-Perfusionsanlage vorbereitet werden, indem diese zuerst mit *Aqua bidest.* und nachfolgend mit Powell-Medium (s. Kap. 2.4.1) für fünf Minuten gespült

wurde. Parallel erwärmte sich das zirkulierende Wasser im doppelwandigen Glasrohr durch eine externe Wärmepumpe auf 37 °C. Nach Beendigung der Spülung wurde die Langendorff-Perfusionsanlage mit 80 ml Powell-Medium luftblasenfrei befüllt und mit Carbogen (95 % Sauerstoff und 5 % Kohlenstoffdioxid) begast.

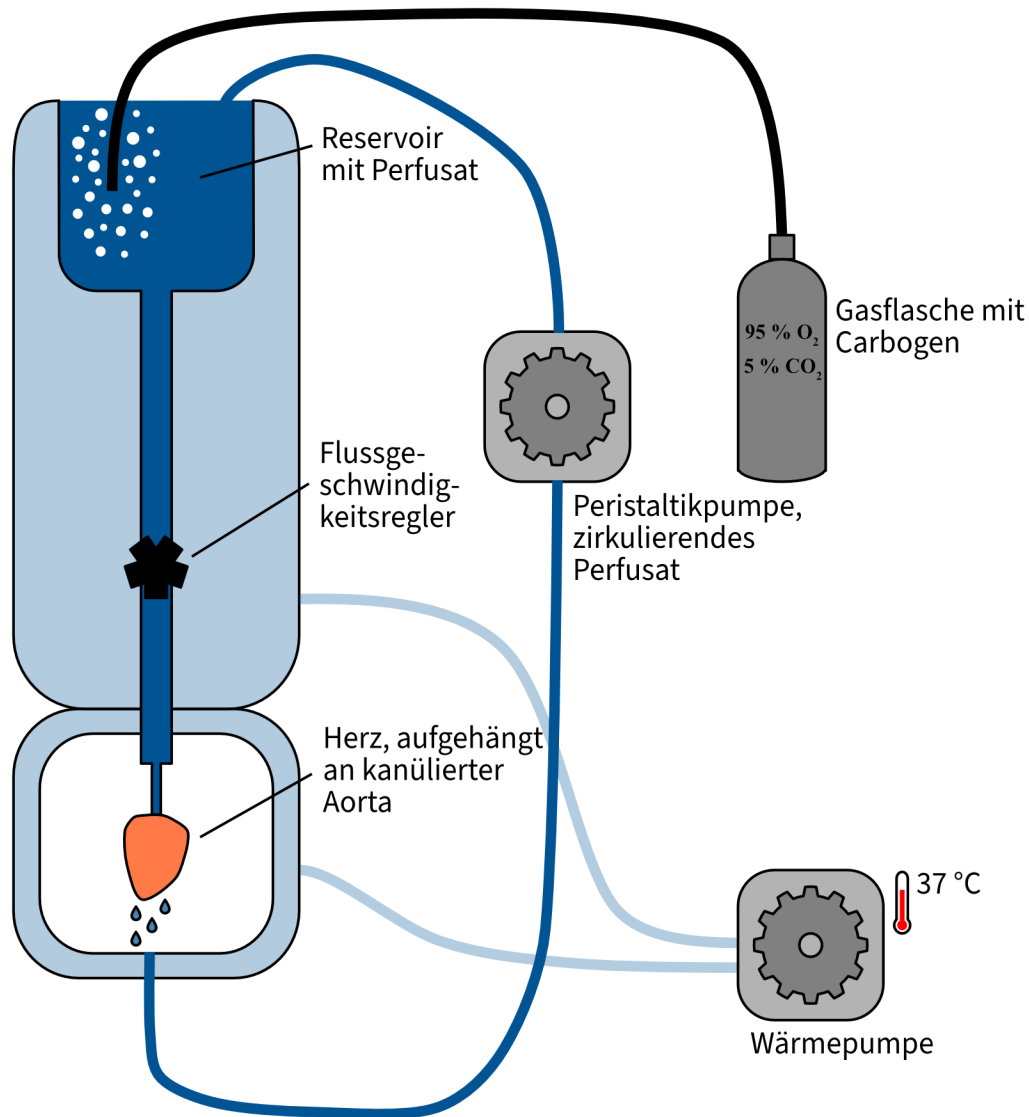


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Langendorff-Perfusionsanlage. Nach Spülung der Anlage mit *Aqua bidest.* konnte diese mit Powell-Medium gefüllt werden. Durch den doppelwandigen Aufbau erwärmte die Wärmepumpe die Flüssigkeit in der Doppelwand (farblich hellblau dargestellt) auf 37 °C. Das Perfusat (farblich dunkelblau dargestellt) wurde mit Carbogen begast und durch die Peristaltikpumpe in Zirkulation gehalten, wodurch das kanülierte Herz enzymatisch verdaut wurde. Die Durchflussgeschwindigkeit des Perfusats wurde über den Flussgeschwindigkeitsregler eingestellt. Nach 25 Minuten erfolgte die Abtrennung und weitere Verarbeitung des Herzens.

Jetzt konnte das vorab isolierte Herz durch Kanülierung der langstreckigen Aorta an das System angeschlossen werden. Da sich zu diesem Zeitpunkt noch Blutreste innerhalb des Herzens und der Gefäße befanden, wurde dieses mit 40 ml Powell-Medium offen perfundiert. Eine offene Perfusion beschreibt, dass das Perfusat nach Durchfließen des

Herzens verworfen wurde und kein geschlossener Kreislauf über die Peristaltikpumpe vorlag. Nach Durchlaufen der Spülung wurde der Kreislauf geschlossen und 5 ml Kollagenaselösung zusammen mit 40 ml Powell-Medium in das Reservoir gegeben. In den darauffolgenden 25 Minuten erfolgte die enzymatische Verdauung des Herzens unter konstanter Perfusion, indem der Flussgeschwindigkeitsregler so eingestellt wurde, dass etwa ein Perfusatstropfen pro Sekunde an der Herzspitze abtropfte. Nach Ablauf der Zeit wurde die Perfusion durch Abdrehen des Flussgeschwindigkeitsreglers gestoppt. Die Ventrikel wurden unter Verbleib der Atrien von der Kanüle abgetrennt und in eine Uhrglasschale überführt. Dort konnten die Ventrikel durch Einschneiden seitlich eröffnet werden, sodass das Herz eine plane Struktur annahm. Eine manuelle Zerkleinerung konnte bereits durch die Verwendung von zwei Skalpelln erzielt werden, indem das Herz mehrfach eingeschnitten wurde. Für eine weitere Zerkleinerung wurde das Herz auf eine Teflonplatte übertragen, die einem Gewebeschneider zugeführt wurde. Im Gewebeschneider konnte das Herz längs als auch quer mit einer Schnittbreite von 0,7 mm weiter zerkleinert werden. Das nun verflüssigte Gewebe wurde in ein Behältnis mit 12 ml des kollagenasehaltigen Perfusats gegeben und in einem Wasserbad bei 37 °C unter Auf- und Abpipettieren für fünf Minuten nachverdaut. Zur weiteren Gewebeauftrennung wurde die Gewebesuspension durch eine Nylongaze mit einer Porengröße von 200 µm gefiltert und danach bei 400 U/min dreiminütig zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen. Nachfolgend waren mehrere Rekalzifizierungs- und Zentrifugationsschritte notwendig, um die KMZ wieder an eine physiologische Calciumkonzentration zu gewöhnen (s. Tab. 1). Mit Beendigung dieser Schritte war die Zellisolation aus dem Herzwewebe erreicht. Als nächstes mussten die Zellen für die Kultivierung unter einer Sterilbank vorbereitet werden.

Tabelle 1: Rekalzifizierungs- und Zentrifugationsschritte. Beschrieben sind die vier erforderlichen Schritte der Rekalzifizierung und Zentrifugation im Rahmen der Zellisolation an der Langendorff-Perfusionsanlage. Das verwendete Powell-Medium wurde auf 37 °C erwärmt und durchgehend mit Carbogen begast. Vor Zugabe des Powell-Mediums wurde die erforderliche Menge an Calciumchlorid (CaCl₂) hinzugegeben und vermischt.

Schritt	Zentrifugation	Bemerkung	CaCl ₂ -Konzentration
1	nicht notwendig	Zugabe von 6 ml Powell-Medium	250 µM
2	300 U/min, 2 min	Überstand verwerfen, Zugabe von 6 ml Powell-Medium	500 µM
3	nicht notwendig	Zugabe von 12 ml Powell-Medium	1 mM
4	200 U/min, 1 min	Überstand verwerfen	

2.10.2 Zellkultivierung

Ausgangspunkt der Kultivierung war das isolierte Zellpellet nach dem letzten Schritt der Rekalzifizierung und Zentrifugation unter der Sterilbank. Dieses musste nun in 20 ml Ausplattier-Medium (s. Kap. 2.4.1) resuspendiert werden. Bevor eine Übertragung der KMZ in Kulturschalen erfolgen konnte, bedurfte es einer Vorbereitung der Kulturschalen mit Vorplattier-Medium (s. Kap. 2.4.1). Dazu wurde je 1 ml Vorplattier-Medium in die Kulturschale gegeben und diese daraufhin für mindestens eine Stunde in einem Brutschrank bei 37 °C und 95 % Wasserdampfsättigung inkubiert. Zur Anheftung der KMZ am Schalenboden diente fetales Kälberserum (FCS), welches sich im Vorplattier-Medium befand. Vor Überführung der KMZ in die Kulturschalen musste das Vorplattier-Medium abgesaugt werden. Danach wurde je Kulturschale 1 ml der Zellsuspension pipettiert. Nachdem die Überführung abgeschlossen war, wurden die Kulturschalen für eine Stunde im Brutschrank bei 37 °C und 95 % Wasserdampfsättigung inkubiert. Da nicht alle KMZ am Schalenboden anhafteten, war es notwendig diese aus der Kulturschale durch Wechsel des Trägermediums zu entfernen. Ebenso konnten durch den Wechsel des Trägermediums nicht vitale Zellen entfernt werden. Dazu wurde das Ausplattier-Medium zusammen mit den nicht anhaftenden bzw. nicht vitalen Zellen abgesaugt und durch je 1 ml 37 °C warmes Wasch-Medium (s. Kap. 2.4.1) ersetzt. Im Regelfall konnten nach Durchlaufen der Isolation mindestens 20 Kulturschalen pro Herz angefertigt werden. Die Kulturschalen wurden anschließend stichprobenartig unter einem Lichtmikroskop hinsichtlich der Anzahl der vitalen Zellen kontrolliert (s. Abb. 4). Die Kulturschalen wurden ab jetzt bis zur weiteren Verwendung für mindestens 24 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 95 % Wasserdampfsättigung gelagert.

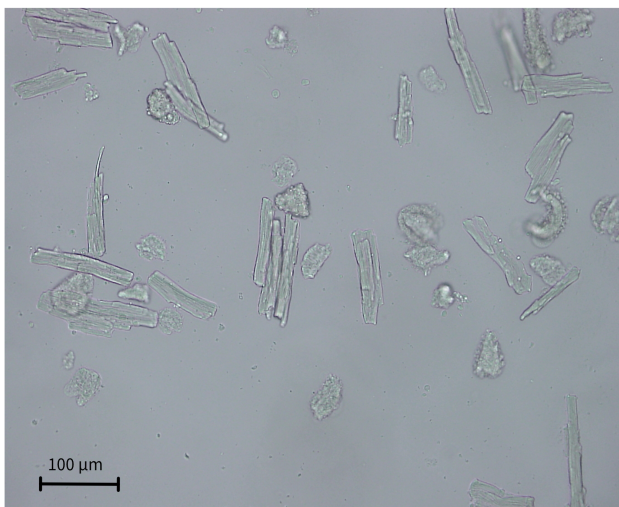


Abbildung 4: Kardiomyozyten nach Durchlaufen der Isolationsschritte auf einer Kulturschale. Lichtmikroskopische Aufnahme isolierter KMZ im Anschluss an den Isolationsprozess. Dargestellt ist eine Übersichtsaufnahme in 10x Vergrößerung. Zu sehen sind stäbchenförmigen KMZ, die der Kulturschale anhaften. Vereinzelt sind nicht vitale Zellen an ihrer abgerundeten Form zu erkennen, die durch den Wechsel des Trägermediums nicht vollständig entfernt werden konnten. Der Maßstab ist durch den schwarzen Balken angegeben, welcher einer Länge von 100 µm entspricht.

2.11 Bestimmung kardialer Kontraktionsparameter

Durch die Fähigkeit von KMZ zur Kontraktion, stellte die Bestimmung der kontraktile Funktion *ex vivo* an isolierten KMZ eine grundlegende Methode dieser Arbeit dar. Durch die Isolation verlieren die Zellen ihre Zell-Zell-Kontakte, die zuvor die geordnete Weitergabe elektrischer Stimulationen durch Schrittmacherzellen ermöglichten. Aus diesem Grund war es nun erforderlich, dass die Zellen durch einen externen elektrischen Stimulus zur Kontraktion angeregt wurden. Diese Methode wurde bereits 2003 durch Langer *et al.* beschrieben.⁷⁹ Ausgangspunkt für die weiteren Untersuchungen waren die zuvor isolierten und kultivierten KMZ (s. Kap. 2.10). Die jeweils zu messende Kulturschale wurde kurz vor der Messung aus einem Brutschrank mit 37 °C und 95 % Wasserdampfsättigung entnommen und auf den Objektisch eines Lichtmikroskops gelegt, welches mit einer Video- und einer Zeilenkamera verbunden war. Dies ermöglichte einerseits die korrekte Ausrichtung der zu messenden KMZ anhand des Bildes der Videokamera und andererseits die Messung der Änderung der Zellgrenzen durch Erfassung der Zeilenkamera. Der Deckel der Kulturschale wurde durch eine eigene Anfertigung des Physiologischen Institutes ersetzt, in welcher zusätzlich zwei Silberchlorid-Drähte eingelassen waren, die in das Kulturmedium hineinragten. Die Drähte dienten als Elektroden im Sinne einer Kathode und Anode, an welchen zwei gegenläufige biphasische Spannungen von 50 mV für 0,5 ms angelegt wurden. Das dadurch erzeugte elektrische Feld führte zu einer synchronisierten Kontraktion der KMZ mit einer Frequenz von 2 Hz (entsprechend 120 Schlägen pro Minute). Die Längenänderung der KMZ wurde durch die Zeilenkamera registriert, indem diese die Zellgrenzen durch Änderung der Graustufen abbildete. Die zu messende Zelle wurde mit Hilfe der Videokamera in die Messposition der Zeilenkamera eingestellt. Für die Messung wurden lediglich solche KMZ ausgewählt, die synchron kontrahierten, eine stäbchenförmige Form aufwiesen und morphologisch vital erschienen. Das Signal der Zeilenkamera wurde in ein elektrisches Signal transformiert und auf einem Oszillographen abgebildet. Die unterschiedlich registrierten Helligkeiten sorgten für Auslenkungen auf der y-Achse, wobei die Zellgrenzen durch ihren Amplitudensprung von dunkel zu hell besonders gut abgrenzbar waren (schematische Darstellung s. Abb. 5). War nun eine Zelle ausgewählt und korrekt eingestellt, erfolgte die Messung durch das Programm Mucell, das die Längenänderung über die Zeit auswertete. Das Messprotokoll sah eine vierfache Messung von neun zufällig ausgewählten KMZ pro Schale vor, wobei zwischen den vier Messungen eine zeitliche Latenz von zehn Sekunden lag.

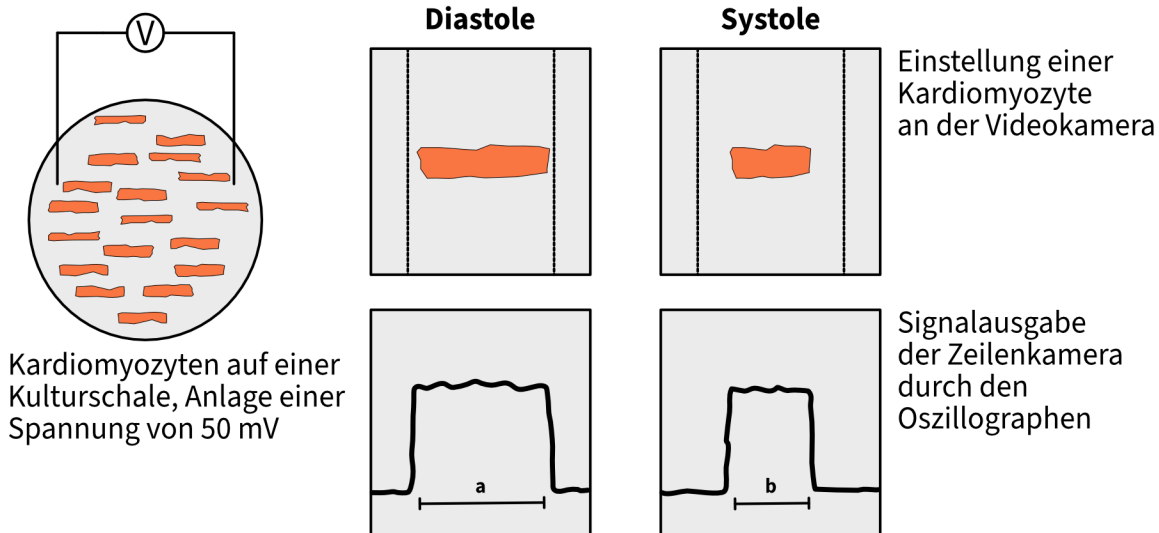


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Bestimmung kardialer Kontraktionsparameter. Die KMZ wurden kurz nach Entnahme aus dem Brutschrank auf einen Mikroskoptisch mit angeschlossener Videokamera gelegt. An die Kulturschale wurde eine biphasische Spannung von 50 mV für 0,5 ms angelegt. Nach korrekter Justierung der zu messenden KMZ über die Videokamera in den Erfassungsbereich der Zeilenkamera (Bereich zwischen den gestrichelten Linien) konnte das Signal der Zeilenkamera durch den Oszillographen ausgegeben werden. Die Zellgrenzen sind dabei durch deutliche Ausschläge auf der y-Achse zu erkennen. Computergestützt konnte somit die Zelllänge in der Diastole (Strecke a) und in der Systole (Strecke b) erfasst werden. Alle übrigen Kontraktionsparameter ergeben sich aus der Erfassung der Strecken und deren Änderung über die Zeit.

Zur Auswertung wurde das arithmetische Mittel der vier Messungen gebildet. Die erfassten Kontraktionsparameter wurden durch das Programm Mucell ausgegeben (s. Tab. 2). Im Regelfall wurden bei der graphischen Auswertung die relative Zellverkürzung (dL/L) in % dargestellt.

Tabelle 2: Kontraktionsparameter. Angegeben sind die Kontraktionsparameter, deren Einheit und Beschreibung, die durch das Programm Mucell als Excel-kompatible Tabelle ausgegeben wurden. Verwendet wurde bei jedem Parameter das arithmetische Mittel aus vier einzelnen Messungen. Im Regelfall beschränkte sich die Darstellung auf die relative Zellverkürzung (dL/L) in %.

Parameter	Einheit	Beschreibung
TTP (time to peak)	ms	Zeit von Beginn der Zellverkürzung bis zur maximalen Verkürzung
Amplitude	μm	Maximales Maß der Zellverkürzung
TTP50%	ms	Zeit bis zu 50 % der maximalen Zellverkürzung
R50%	ms	Zeit der maximalen Zellverkürzung bis zur Relaxation auf 50 % der Zellverkürzungsstrecke
Contraction Velocity	$\mu\text{m/s}$	Maximale Kontraktionsgeschwindigkeit
Relaxation Velocity	$\mu\text{m/s}$	Maximale Relaxationsgeschwindigkeit
Mean Shortening	$\mu\text{m/s}$	Mittlere Verkürzungsgeschwindigkeit
dL/L	%	Relative Zellverkürzung als Verhältnis der Amplitude zur diastolischen Länge
Ldiast	μm	Diastolische Länge, Länge in vollständiger Relaxation

Zur Anwendung kamen zwei verschiedene Versuchsprotokolle, wobei die kurzfristigen und langfristigen Effekte von Substanzen auf die kontraktile Funktion von KMZ untersucht wurden. Zur Messung kurzfristiger Effekte wurden 10 µl der jeweiligen Substanz vor der Messung der Kulturschale hinzugeben und mit einer Latenz von 5 Minuten startete der Messvorgang. Bei der Messung langfristiger Effekte erfolgte die Zugabe von 10 µl der jeweiligen Substanz am vorherigen Tag der Messung, sodass der Zeitpunkt zwischen Zugabe und Messung im Bereich von 20 bis 24 Stunden lag. Als Kontrolle diente in beiden Fällen die Zugabe von 10 µl *Aqua bidest*. Die Gruppenzuordnung war den durchführenden Personen nicht bekannt und wurde erst nach Beendigung des Versuches aufgelöst, sodass eine verblindete Messung gewährleistet werden konnte. Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Substanzen in verschiedenen Konzentrationen verwendet: Clg und Serotonin.

2.12 Quantifizierung mitochondrialer Wasserstoffperoxid-Produktion

Die Entstehung von Wasserstoffperoxid wurde an isolierten Mitochondrien aus Herzwewebe von WIS gemessen. Die Isolation der Mitochondrien als auch die Quantifizierung von Wasserstoffperoxid wurden nach der von Bøtker *et al.* beschriebenen Methode durchgeführt, die auf einer Fluoreszenzreaktion beruht.¹⁵ Die Versuche wurden durch Frau Reis in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rainer Schulz begleitet.

2.12.1 Isolation kardialer Mitochondrien

Ausgangspunkt der Isolation war das freipräparierte Herz, welches sich an der Langendorff-Perfusionsanlage befand und mit 40 ml Powell-Medium blutfrei perfundiert wurde (s. Kap. 2.10). Nach Abtrennung der Ventrikel unterhalb der Atrien erfolgte die weitere Verarbeitung, indem diese zuerst durch Skalpelle manuell zerkleinert wurden. Alle weiteren Schritte fanden ab jetzt entweder bei 4 °C oder auf Eis statt. Die Ventrikel wurden nun in Isolationspuffer (s. Kap. 2.4.2) gewaschen und gewogen. Im Anschluss konnten die Ventrikel in 10 ml/g Isolationspuffer versetzt mit 0,04 % BSA überführt werden. Zur Homogenisierung wurde ein Homogenisator nach Potter-Elvehjem verwendet. Dabei wurde durch fünffaches Drücken des Teflonstempels eine manuelle Zerkleinerung erreicht. Die homogene Suspension wurde jetzt für zehn Minuten bei 800 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand erneut für zehn Minuten bei 8.000 g zentrifugiert. Der nun vorliegende Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Isolationspuffer resuspendiert und danach nochmals für zehn Minuten bei 8.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und

das entstandene Pellet in 4 ml Isolationspuffer resuspendiert und in einem letzten Schritt für zehn Minuten bei 8.000 g zentrifugiert. Nach Beendigung der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet, jetzt nahezu bestehend aus Mitochondrien, in 1 ml Isolationspuffer ohne ATP gelöst. Die vorliegende Suspension aus kardialen Mitochondrien konnte für nachfolgende Untersuchungen verwendet werden.

2.12.2 Quantifizierung von Wasserstoffperoxid

Die Quantifizierung von Wasserstoffperoxid erfolgte unter Verwendung von Amplex UltraRed Reagent (A36006, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) nach den Herstellerempfehlungen. Die Methode basiert auf einer Fluoreszenzerfassung von Amplex UltroxRed. Dieses wird stöchiometrisch im Verhältnis eins zu eins zu Wasserstoffperoxid gebildet, indem eine gekoppelte HRP Amplex UltraRed oxidiert und zeitgleich Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff reduziert.⁵⁵ Die Fluoreszenz von Amplex UltroxRed wurde über einen Zeitraum von zehn Minuten bei einer Exzitations- und Emissionswellenlänge von 565 nm bzw. 581 nm in einem Spektrophotometer erfasst. Zur Detektion der Wasserstoffperoxid-Produktion von isolierten Mitochondrien wurden 50 µl der vorab hergestellten mitochondrienhaltigen Suspension verwendet. Dieser wurden 48,5 µl Glutamat-Malat-Inkubationspuffer (s. Kap. 2.4.2), 1 µl HRP (500 U/ml) und 0,5 µl Amplex UltraRed Reagent hinzugefügt. Die Messung erfolgte in einer 96-Well-Platte am Spektrophotometer entweder mit der gewünschten Substanzbeigabe oder äquivalent mit *Aqua bidest.* als Negativkontrolle. Verwendet wurden in diesem Zusammenhang folgende Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationsstufen: Clg und Serotonin. Nach Ablauf der Versuchszeit von zehn Minuten wurden die Ergebnisse durch die Herstellersoftware Cary Eclipse Software ausgewertet. Angezeigt wurde die Fluoreszenzintensität in absoluten Einheiten (a.u.) zu den Messzeitpunkten über einen Zeitraum von zehn Minuten. Für spätere Gruppenvergleiche wurde pro Gruppe der Mittelwert der Steigung der Fluoreszenzintensität über die Zeit verwendet (a.u./min).

2.13 Western Blot

Der Nachweis von kardialen Proteinen (MAO-A, MAO-B und GAPDH, engl. *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) erfolgte mittels Western Blot. Hierzu wurden Proteinisolate aus Gewebeproben gewonnen und im weiteren Verlauf immunologisch bearbeitet, sodass Proteine ihrer Größe entsprechend durch Antikörperbindung visualisiert

werden konnten. Als Positivkontrolle für MAO-A und MAO-B diente der Proteinnachweis an Lebergewebe, in dem ein ubiquitäres Vorkommen beider Isoformen beschrieben ist.¹³⁴

2.13.1 Proteinisolation aus Gewebeproben

Es wurden 100 µg der Gewebeprobe (Herz- oder Lebergewebe von WIS) auf Eis abgewogen, mit 500 µl Lysepuffer (s. Kap. 2.4.3) versetzt, und bei 6.000 U/min für 40 Sekunden am Homogenisator homogenisiert. Die Suspension wurde für zehn Minuten auf Eis gelagert und im Anschluss mittels Ultraschall-Homogenisator für weitere 30 Sekunden homogenisiert. Zur Abtrennung fester Bestandteile erfolgte eine Zentrifugation bei 14.000 g und 4 °C für zehn Minuten. Der proteinhaltige Überstand wurde im Verhältnis 1:50 mit *Aqua bidest.* verdünnt. Nun konnten 500 µl der verdünnten Lösung mit 250 µl 2-fach konzentriertem Lämmli-Puffer (s. Kap. 2.4.3) für fünf Minuten bei 95 °C im Heizblock inkubiert werden. Die Proben wurden im Anschluss bei - 20 °C eingelagert oder direkt für die weitere Proteinbestimmung verwendet.

2.13.2 Proteinmengenbestimmung

Damit im späteren Verlauf ein gleichmäßiges Auftragen von Proteinmengen ermöglicht werden konnte, wurden die isolierten Proteinmengen in Anlehnung an die von Lowry *et al.* beschriebene Methode bestimmt und ggf. mit *Aqua bidest.* ausgeglichen.⁸² Zur Durchführung der Proteinmengenbestimmung wurde das DC Protein Assay Kit I (5000111, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) gemäß der Herstellerempfehlungen verwendet. Die verwendeten Proben wurden vorab im Verhältnis 1:10 mit *Aqua bidest.* verdünnt. Nun konnte zu je 5 µl Probe 25 µl reagent A' (bestehend aus 1 ml reagent A und 20 µl reagent S) hinzugegeben und vermischt werden. Es folgte die Zugabe von 200 µl reagent B, wonach die Proben für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Nach Ablauf der Zeit konnte die Absorption bei einer Wellenlänge von 750 nm photometrisch bestimmt werden. Je Probe erfolgte eine doppelte Bestimmung mit anschließender Bildung des arithmetischen Mittelwertes. Für die weitere Berechnung war es notwendig eine Standardkurve aus bekannten Proteinmengen mitzubestimmen. Hierzu wurde die Absorption weiterer Proben mit bekannten Konzentrationen an Albumin (BSA, 0 mg/ml bis 1,4 mg/ml, in Schritten von 0,2 mg/ml) photometrisch bestimmt. Anhand der ermittelten Standardkurve konnten die Konzentrationen der Proben ermittelt werden. Sobald alle Konzentrationen bekannt waren, wurden die Proben gleichmäßig auf das niedrigste gemessene Konzentrationsniveau mit *Aqua bidest.* verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei - 80 °C eingelagert.

2.13.3 Proteinseparation

Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch Verwendung bereits fertiggestellter Gele (NuPAGE Bis-Tris Gel, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) gemäß der Herstelleranweisungen. Die Gele wurden nach Entnahme aus der Verpackung dreimalig mit Laufpuffer (1-fach konzentriert, s. Kap. 2.4.3) gewaschen bevor diese in die Gelkammer eingeklemmt wurden. In die Gelkammer wurden immer zwei Gele eingeklemmt und der Raum zwischen diesen mit 200 ml Laufpuffer und 500 µl NuPAGE Antioxidant (NP0005, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) befüllt. Der Raum außerhalb der Gele wurde mit 600 ml Laufpuffer (1-fach konzentriert) aufgefüllt. Die Proben wurden nun mit Hilfe einer Hamiltonspritze zu je 12 µl in die Geltaschen aufgetragen. Neben dem Auftragen der Proben wurde eine Geltasche mit 10 µl eines Proteinmarkers (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) befüllt. Nach Verschließen der Gelkammer konnte die Gelelektrophorese durch Anlegen einer Spannung von 200 V für 50 Minuten gestartet werden.

2.13.4 Proteintransfer

Nach der Gelelektrophorese mussten die aufgetrennten Proteine von dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen werden. Dieser Schritt erfolgte unter Verwendung eines Transfermoduls in derselben Gelkammer wie bei der Gelelektrophorese. Zur Übertragung der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde diese zusammen mit dem Gel und weiteren Filterpapieren und Schwämmen möglichst luftblasenfrei in dem Transfermodul zusammengeführt, indem diese vorab mit Transferpuffer (s. Kap. 2.4.3) befeuchtet wurden. Nachdem die Transferkammer eingesetzt wurde, wurde die innere Gelkammer mit 40 ml Transferpuffer aufgefüllt. Die äußere Kammer wurde mit 600 ml *Aqua bidest.* zur Kühlung des Systems befüllt. Nach Schließung der Gelkammer konnte ein Gleichstrom von 30 V für 60 Minuten angelegt werden, sodass die Proteine gemäß ihrer Anordnung auf dem Gel auf die Membran übertragen wurden. Nach Ablauf der Transferzeit konnte die Membran entnommen werden und für eine Minute in einer Plastikschaale mit *Aqua bidest.* gelagert werden. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen, wurde die Membran mit einer Lösung aus 5 ml TBS und 5 % BSA für 60 Minuten inkubiert.

2.13.5 Proteinnachweis

Der immunologische Nachweis von Proteinen erfolgte durch Markierung mit Antikörpern (verwendete Antikörper s. Kap. 2.6). Der spezifische Primärantikörper band an das gewünschte Epitop. In einem weiteren Schritt band ein Sekundärantikörper an die

spezifische Immunglobulin-Domäne des Primärantikörpers. Der Sekundärantikörper war mit einer HRP gekoppelt, welche durch Metabolisierung der Entwicklerlösung eine Chemilumineszenz-Reaktion bewirkte. Dazu wurde die Membran in einer Lösung bestehend aus 5 ml TBS, 5 % BSA, 0,1 % Tween20 und dem entsprechenden Antikörper über Nacht (mindestens mehr als 12 Stunden) bei 4 °C auf einem Laborschüttler inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran dreimal für zehn Minuten mit TBS und 0,1 % Tween20 gewaschen, sodass der Primärantikörper entfernt wurde. Der Sekundärantikörper wurde zusammen mit einer Lösung aus 5 ml TBS, 5 % BSA und 0,1 % Tween20 für 60 Minuten lichtgeschützt inkubiert. Wie zuvor, erfolgte auch an dieser Stelle ein dreimaliges Waschen für zehn Minuten mit TBS und 0,1 % Tween20, wobei der letzte Waschschriff lediglich in TBS ohne Tween20 stattfand. Die weitere Nachweisreaktion erfolgte durch Verwendung von SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (34577, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) nach den Herstellerempfehlungen. Dazu wurde die Membran in einer Entwicklerschale für zwei Minuten mit je 3 ml Color Reagent A und Color Reagent B inkubiert. Die Membran konnte daraufhin auf eine Glasplatte aufgelegt und lichtgeschützt in die Entwicklerkammer einer Chemilumineszenz-Kamera eingebracht werden. Die stattfindende Chemilumineszenz-Reaktion wurde durch die Kamera erfasst und konnte über Änderungen der Blendeneinstellung und der Belichtungszeit variiert werden. Ausgewählt wurde das Bild, welches nach Optimierung der Einstellungen keine Bereiche von Unter- oder Überbelichtung aufwies.

2.14 Quantitative Polymerasekettenreaktion

Die qPCR wurde zum Nachweis spezifischer mRNA-Transkripte (engl. *messenger ribonucleic acid*) genutzt, indem diese nach Umschreibung in cDNA (engl. *complementary DNA*) in einem Thermocycler ihrer Ausgangskonzentration entsprechend vervielfältigt wurden. Die Durchführung erfolgte, soweit dies möglich war, unter Berücksichtigung der Minimalanforderungen der *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE)*-Guidelines.²⁰

2.14.1 RNA-Isolation aus Gewebeproben

Die RNA-Isolation erfolgte nach der Phenol-Chloroform-Extraktions-Methode²⁶ unter Benutzung von peqGOLD TriFast (VWR International, Radnor, PA, USA; ehemals peqlab) anhand der Protokollangaben des Herstellers. Anfangs wurden dazu 50 mg bis 100 mg tiefgefrorenes Herz- oder Lebergewebe (- 80 °C) nach Zugabe von 1 ml peqGOLD TriFast

in einem Homogenisator für zweimalig 20 Sekunden bei 5.500 U/min homogenisiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde die Probe für mindestens drei Minuten unter Raumtemperatur gelagert. In einem darauffolgenden Zentrifugationsschritt (15 Minuten, 4 °C, 12.500 U/min) bildeten sich drei Phasen aus, die RNA, Proteine und DNA voneinander trennten. Die wässrige obere Phase, welche die gewünschte RNA enthielt, wurde abgetragen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,5 ml Isopropanol versetzt. Die Probe wurde nun für bis zu 15 Minuten bei - 20 °C gelagert bis ein neuer Zentrifugationsschritt (15 Minuten, 4 °C, 12.500 U/min) erfolgte. Der Überstand wurde verworfen und das am Boden befindliche Pellet, welches die RNA enthielt, in 1 ml Ethanol (70 %) durch leichtes Schwenken gelöst. Zur weiteren Aufreinigung erfolgte eine letzte Zentrifugation (15 Minuten, 4 °C, 12.500 U/min). Erneut wurde der Überstand verworfen und das Reaktionsgefäß mit geöffnetem Deckel unter der Sterilbank für 60 Minuten gelagert. Dadurch konnten mögliche alkoholische Überreste verdampfen. Zuletzt wurde das RNA-Pellet in 50 µl RNAase-freiem Wasser eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei - 80 °C gelagert.

2.14.2 Reinheits- und Integritätsbestimmung

Die photometrische Bestimmung der Reinheit und Integrität der RNA erfolgte am NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Zur Feststellung der Reinheit der RNA wurde der Quotient der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm (A_{260}/A_{280}) gebildet. Es wurden dabei Werte von 1,9 bis 2,1 akzeptiert, andernfalls wurde die RNA-Isolation wiederholt. Ebenfalls wurde die RNA-Konzentration photometrisch mit einem Zielbereich von 200-800 ng/µl bestimmt. Sofern eine höhere Konzentration erzielt wurde, erfolgte eine Verdünnung durch *Aqua bidest.* in den Zielbereich. Proben, deren Konzentration unterhalb des Zielbereichs lagen, wurden verworfen.

2.14.3 cDNA-Synthese

Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte durch den Einsatz der SuperScript IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) anhand der Herstellerempfehlungen im Thermocycler. Die RNA-Proben wurden dazu für 15 Minuten bei 60 °C denaturiert und anschließend im Verhältnis 1:1 mit cDNA-Synthese-Mix (s. Kap. 2.4.3) versetzt. Die darin befindliche Reverse Transcriptase konnte in den folgenden 60 Minuten bei 37 °C die mRNA in cDNA umschreiben. Der Vorgang wurde durch ein Erhitzen auf 95 °C für fünf Minuten gestoppt, wodurch die Reverse Transcriptase inaktiviert wurde.

Die entstandenen Proben wurden im Verhältnis 1:10 mit *Aqua bidest.* verdünnt und bei - 20 °C aufbewahrt.

2.14.4 Sequenzauswahl der Primerpaare

Die gewünschten Primersequenzen wurden auf Grundlage von Primer-BLAST *in silico* ermittelt.¹⁵⁷ Dazu wurden die Standardeinstellungen verwendet. Es wurden nur solche Sequenzen ausgewählt, die eine Exon-Exon-Verbindung aufwiesen und den kodierenden Bereich der Ziel-mRNA beinhalteten. Dadurch konnte das Risiko für eine spätere Amplifikation genomischer Verunreinigungen zusätzlich verringert werden. Als Organismus wurde stets *Rattus norvegicus* (taxid 10116) ausgewählt. Die ermittelten Sequenzen wurden von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) bezogen. Gelöst wurden je 15 µl Forward Primer (100 µM) und 15 µl Reverse Primer (100 µM) in 270 µl *Aqua bidest.* und bis zur weiteren Verwendung bei - 80 °C eingelagert (verwendete Primer s. Kap. 2.7).

2.14.5 Auswahl der Referenzgene

Zur Bestimmung der relativen Quantifizierung von Genexpressionen sind Referenzgene (engl. *housekeeping genes*) von grundlegender Bedeutung. Der cDNA-Gehalt des gesuchten Gens wird dabei in Verhältnis zu den Referenzgenen gesetzt, sodass eine Aussage über den relativen cDNA-Gehalt ermöglicht wird. Ebenfalls dienen diese dazu Ungenauigkeiten bei Volumen- und Konzentrationsmessungen zu kontrollieren. Dazu ist es jedoch notwendig, dass die Referenzgene stabil exprimiert und nicht durch experimentelle Eingriffe verändert werden. Anhand der verfügbaren und in der Literatur beschriebenen Gene wurde eine Vorauswahl getroffen, welche die Gene *B2M*, *HPRT* und *RPL32* beinhaltet.¹⁷ Um den Einfluss eines einzelnen Referenzgens zu mindern, wurde in der späteren Auswertung der Mittelwert aller drei genannten Referenzgene zur Bestimmung der relativen Genexpression verwendet.

2.14.6 Durchführung der qPCR

Die Reaktionsansätze für die qPCR wurden an einem separaten Arbeitsplatz auf Eis angelegt. Pro Probe wurden zwei technische Replikate angefertigt. Dazu wurden 10 µl SYBR Green PCR Master Mix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), 6,4 µl *Aqua bidest.*, 3 µl cDNA, 0,6 µl Primer (10 µM, bestehend aus einem gleichen Verhältnis von Forward Primer und Reverse Primer) in einem Reaktionsgefäß angesetzt. Zur Detektion von Verunreinigungen wurden ebenfalls pro Durchlauf zwei Leerproben angesetzt, die keine cDNA enthielten. Alle weiteren Schritte erfolgten am Thermocycler. Nach einer

Initiationsphase von 15 Minuten bei 95 °C wurde die cDNA über 45 Zyklen (30 Sekunden Denaturierung bei 95 °C, 30 Sekunden Annealing bei primerspezifischer Temperatur, 30 Sekunden Elongation bei 72 °C) amplifiziert und in jedem Zyklus das Fluoreszenzsignal von SYBR Green erfasst. Im Anschluss an die 45 Zyklen folgte eine Temperaturerhöhung auf 100 °C in Schritten von 0,5 °C für zehn Sekunden bis es zu einem Zerfall des Amplifikationsproduktes kam. Der Zerfall, der zu einem plötzlichen Freiwerden von großen Mengen SYBR Green führte, konnte durch die Betrachtung der sog. Schmelzkurve festgestellt werden. Hierbei zeigte sich als Zeichen der spezifischen Amplifikation ein einzelner Peak. Das Auftreten von unspezifischen Nebenprodukten wäre an mehreren Peaks in der Schmelzkurve zu erkennen gewesen, was ein Verwerfen der Probe zur Folge gehabt hätte.

2.14.7 Auswertung

Für die Auswertung wurden die C_T -Werte (engl. *cycle of threshold*) herangezogen, welche die benötigte Anzahl an Amplifikationszyklen wiedergeben, ab derer ein exponentielles Vervielfältigen der cDNA erreicht wurde. Eine hohe Ausgangskonzentration an cDNA in der Probe geht demnach mit einem niedrigen C_T -Wert einher und umgekehrt – es besteht ein inverses Verhältnis. Die Bestimmung der C_T -Werte erfolgte automatisiert durch die Herstellersoftware CFX Maestro. Da zuvor für jedes biologische Replikat zwei technische Replikate angelegt wurden, wurde für die folgende Auswertung der Mittelwert beider C_T -Werte gebildet, sodass jetzt für jedes biologische Replikat ein C_T -Wert vorlag. Im weiteren Verlauf wurden die ermittelten C_T -Werte auf den cDNA-Gehalt der Probe normalisiert, indem die relative Konzentration (ΔC_T) des Zielgenes gegenüber dem Mittelwert der drei Referenzgene wie folgt berechnet wurde:

$$\Delta C_T = C_T(\text{Mittelwert der Referenzgene}) - C_T(\text{Zielgen})$$

Statistische Gruppenunterschiede wurden unter Verwendung der ΔC_T -Werte geprüft. In der weiteren graphischen Darstellung wurde auf die von Livak und Schmittgen publizierte $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode zurückgegriffen.⁸¹ Zur Bildung der $\Delta\Delta C_T$ -Werte musste die Differenz der ΔC_T -Werte zweier Gruppen, die es zu vergleichen galt, wie folgt bestimmt werden:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{Gruppe von Interesse}) - \Delta C_T(\text{Bezugsgruppe})$$

Im Anschluss wurden, sofern von Interesse, die ermittelten $\Delta\Delta C_T$ -Werte und die Grenzen der 95 %-Konfidenzintervalle (95 %-KI) zur Basis 2 potenziert, damit die sog. *fold-changes*

(FCs bzw. FC) gebildet werden konnten. Hierbei werden Änderungen der cDNA-Konzentration als n-fache Änderung angegeben. Die Potenzierung zur Basis 2 beruhte auf dem exponentiellen Vervielfältigen in der qPCR, in der unter idealen Bedingungen pro Zyklus eine Verdopplung der cDNA erfolgte. Aufgrund der logarithmierten Skala und dem damit einhergehenden Problem der Vergleichbarkeit von Hoch- (angenommene Werte von 1 bis unendlich) und Runterregulationen (angenommene Werte von 0 bis 1) wurde in den meisten Fällen auf eine Verwendung von FCs verzichtet. Eine intuitivere Vergleichbarkeit wurde durch die Verwendung der symmetrisch verteilten $\Delta\Delta C_T$ -Werte gewährleistet.

2.15 Statistik

Für die Verwaltung der Daten wurde Microsoft Excel herangezogen. Die statistische Testung und graphische Darstellung erfolgten unter Verwendung von Prism 9. Sofern nur zwei Gruppen verglichen wurden, wurde ein t-Test angewendet. Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde, sofern nur eine diskriminierende Variable vorlag, eine *one-way ANOVA* (Varianzanalyse, engl. *analysis of variance*) mit multiplem Testen unter Tukey-Korrektur (engl. *Tukey's multiple comparisons test*) angewendet. Lag neben der Gruppenzugehörigkeit eine zusätzliche diskriminierende Variable vor, so wurde eine *two-way ANOVA* mit multiplem Testen unter Šídák-Korrektur (engl. *Šídák's multiple comparisons test*) verwendet. In den Darstellungen werden, sofern nicht anders beschrieben, das arithmetische Mittel bzw. die Mittelwertsdifferenz (ΔMW) und dessen 95 %-KI abgebildet. Ein einzelnes Symbol entspricht einem biologischen Replikat (N), ein Balken dessen arithmetisches Mittel. Bei Vorliegen mehrerer technischer Replikate (n) wurde vorab das arithmetische Mittel gebildet und angegeben. Alle Dezimalzahlen wurden auf zwei, p-Werte auf vier und ausgeschriebene Prozentwerte auf null Nachkommastellen gerundet.

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse werden nachfolgend in zwei getrennte Abschnitte gegliedert. Abschnitt 1 thematisiert die Ergebnisse der *in-vitro*-Versuche, die vorwiegend an isolierten KMZ bzw. isolierten kardialen Mitochondrien stattfanden. Abschnitt 2 gibt die Ergebnisse der *in-vivo*-Versuche wieder, die aus Expressionsanalysen am Herzgewebe von WIS und SHR bestanden.

3.1 Abschnitt 1: *in-vitro*-Versuche

Zu Beginn war es notwendig, die Protein- und cDNA-Konzentrationen der MAOs im Herzen zu bestimmen, um die vermutete Dominanz der MAO-A im Rattenherz zu bestätigen. Im Anschluss werden die Ergebnisse der Kontraktionsmessungen isolierter KMZ und der Quantifizierung von Wasserstoffperoxid an isolierten Mitochondrien aufgeführt.

3.1.1 Monoaminoxidasen im Rattenherz

Der Vergleich der Protein- (Western Blot, s. Abb. 6A) und cDNA-Konzentrationen (qPCR, s. Abb. 6B) beider Isoformen der MAO erfolgte an Proben 6 Wochen alter WIS. Im Western Blot diente der Nachweis der Proteine im Lebergewebe als Positivkontrolle. Die Ladekontrolle erfolgte durch Proteinbestimmung von GAPDH. Im Herzgewebe und in KMZ wurde MAO-A nachgewiesen, wobei die detektierten Proteinbanden in Herzgewebeproben deutlicher ausfielen. Es konnte keine MAO-B in KMZ nachgewiesen werden, wohingegen im Herzgewebe schwache Banden detektierbar waren. Die cDNA-Konzentration wurde mittels qPCR an Herzgewebeproben von WIS bestimmt. Es zeigten sich signifikant höhere cDNA-Konzentrationen für die MAO-A im Vergleich zur MAO-B (FC: 23,75, $\Delta\Delta C_T$: 4,57, 95 %-KI: 3,97 – 5,16, $p < 0,0001$).

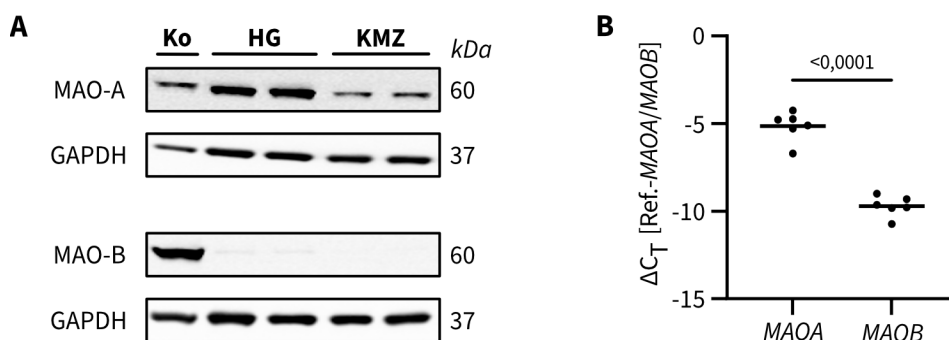


Abbildung 6: Vergleich der Protein- und cDNA-Konzentration von Monoaminoxidasen im Herzen.

A Im Western Blot wurden MAO-A und MAO-B auf Proteinebene am Herzgewebe (HG) und an isolierten KMZ von zwei 6 Wochen alten WIS untersucht (N = 2). Als Positivkontrolle diente homogenisiertes Lebergewebe beider Replikate (Ko). Die Ladekontrolle erfolgte durch Bestimmung von GAPDH. **B** In der qPCR wurde die relative Genexpression für *MAOA* und *MAOB* am HG von je sechs WIS bei einem Alter von 6 Wochen

verglichen (N = 6). Dargestellt sind die einzelnen ΔC_T -Werte (Punkte) und deren arithmetisches Mittel (Balken). Es liegt ein signifikanter Gruppenunterschied im zweiseitigen, gepaarten t-Test vor ($p < 0,0001$).

3.1.2 Einfluss von Serotonin auf die Kontraktilität von Kardiomyozyten

Die kontraktile Funktion wurde an isolierten ventrikulären KMZ von 6 Wochen alten WIS nach Substratinkubation untersucht. Betrachtet wurde die Veränderung der relativen Zellverkürzung als Hauptparameter der Kontraktilität. Es wurden verschiedene Konzentrationen von Serotonin und Clg eingesetzt. Clg wurde vorab in aufsteigenden Konzentrationen von 0,01 μM bis 10 μM an isolierten KMZ getestet. Unter Inkubation mit 10 μM Clg konnte eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Abnahme der Kontraktionsparameter beobachtet werden, sodass für alle weiteren Versuche Clg in einer Konzentration von 1 μM eingesetzt wurde (s. Kap. 7.1 im Anhang).

3.1.2.1 Kurzfristige Effekte unter Einfluss von Serotonin

Bei der Untersuchung kurzfristiger Effekte wurde die Messung mit einer Latenz von fünf Minuten nach Substanzzugabe begonnen. Untersucht wurde der Effekt von Serotonin in aufsteigenden Konzentrationen von 0,1 μM bis 10 μM jeweils mit und ohne 1 μM Clg an isolierten KMZ (s. Abb. 7A). Je Gruppe wurden 81 KMZ aus drei Herzpräparationen ($n = 81$, $N = 3$) gemessen und, sofern nicht anders angegeben, mit der Kontrollgruppe verglichen. Als Kontrollgruppe diente in allen Fällen die äquivalente Zugabe von *Aqua bidest*. Unter alleiniger Inkubation mit 1 μM Clg konnte keine signifikante Änderung beobachtet werden (ΔMW : 0,57, 95 %-KI: - 0,65 – 1,79, $p = 0,8472$). Die Zugabe von Serotonin zeigte in der niedrigsten Konzentration von 0,1 μM ebenfalls keinen signifikanten Einfluss (ΔMW : - 0,99, 95 %-KI: - 2,07 – 0,09, $p = 0,1021$). Eine Konzentration von 1 μM Serotonin konnte die relative Zellverkürzung hingegen signifikant reduzieren (ΔMW : - 1,36, 95 %-KI: - 2,44 – - 0,28, $p = 0,0036$). Bei einer weiteren Erhöhung der Konzentration von Serotonin auf 10 μM konnte zwar ebenfalls eine signifikante Reduktion der relativen Zellverkürzung verzeichnet werden, jedoch verblieb der Effekt auf einem ähnlichen Niveau wie unter Einfluss von 1 μM Serotonin (ΔMW : - 1,35, 95 %-KI: - 2,43 – - 0,27, $p = 0,0040$). Unter der Zugabe von 1 μM Clg und 0,1 μM Serotonin reduzierte sich die relative Zellverkürzung nochmals signifikant, sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe (ΔMW : - 2,41, 95 %-KI: - 3,64 – - 1,20, $p < 0,0001$), als auch zur Gruppe mit 0,1 μM Serotonin ohne Zugabe von Clg (ΔMW : - 1,43, 95 %-KI: - 2,76 – - 0,10, $p = 0,0247$). Bei höheren Konzentrationen von Serotonin in Gegenwart von 1 μM Clg konnte zwar immer eine signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden, jedoch auf

einem ähnlichen Niveau wie bereits unter 0,1 μM Serotonin und 1 μM Clg (1 μM Serotonin und 1 μM Clg: ΔMW : - 1,76, 95 %-KI: - 2,98 – - 0,54, $p = 0,0004$; 10 μM Serotonin und 1 μM Clg: ΔMW : - 1,87, 95 %-KI: - 3,09 – - 0,65, $p = 0,0001$).

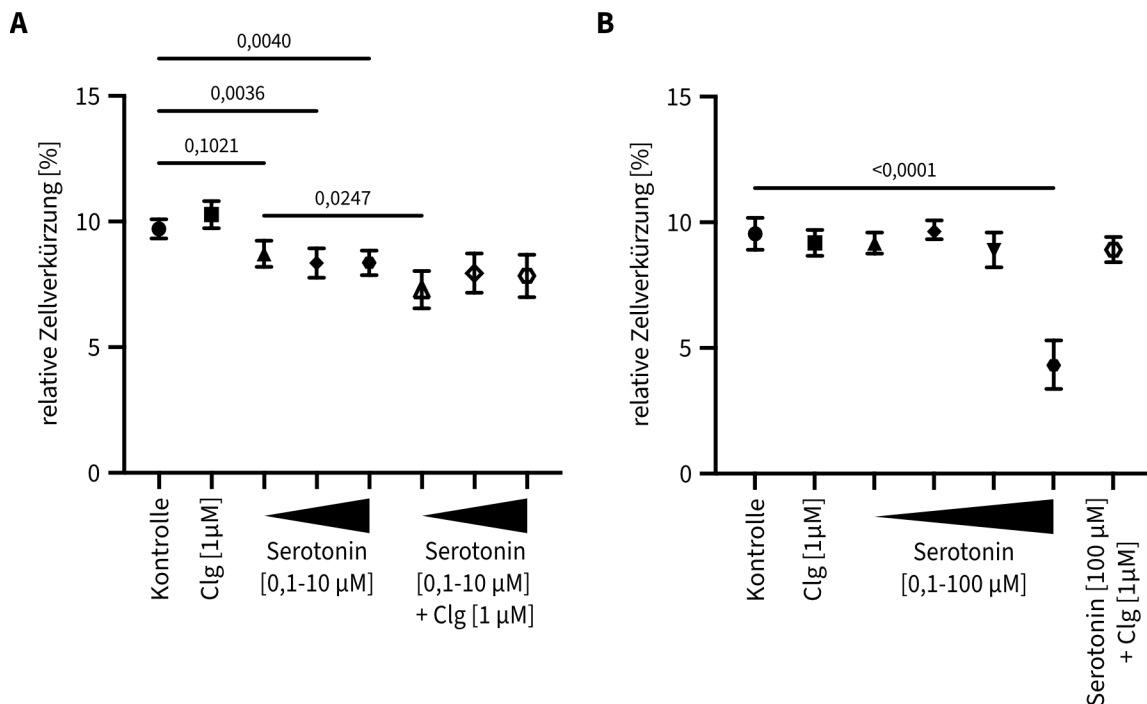


Abbildung 7: Relative Zellverkürzung unter kurzfristigem und langfristigem Einfluss von Serotonin und Clg. **A** Dargestellt sind die kurzfristigen Effekte von Serotonin und Clg auf die relative Zellverkürzung von KMZ in % unter aufsteigenden Konzentrationen von Serotonin (0,1 μM , 1 μM , 10 μM) jeweils mit und ohne Zugabe von Clg in einer Konzentration von 1 μM . Die aufsteigenden Konzentrationen von Serotonin sind durch horizontale Dreiecke abgebildet. Isolierte KMZ von drei biologischen Replikaten ($N = 3$) wurden gleichmäßig auf die Gruppen verteilt. Je Gruppe erfolgte die Bestimmung der Kontraktionsparameter an 81 KMZ ($n = 81$). **B** Dargestellt sind die langfristigen Effekte von Serotonin und Clg auf die relative Zellverkürzung von KMZ in % unter ansteigenden Konzentrationen von Serotonin (0,1 μM , 1 μM , 10 μM , 100 μM), wobei die höchste Konzentrationsstufe von 100 μM Serotonin jeweils mit und ohne Zugabe von Clg in einer Konzentration von 1 μM untersucht wurde. Die aufsteigenden Konzentrationen an Serotonin sind durch horizontale Dreiecke abgebildet. Isolierte KMZ von zwei biologischen Replikaten ($N = 2$) wurden gleichmäßig auf die Gruppen verteilt. Je Gruppe erfolgte die Bestimmung der Kontraktionsparameter an 54 KMZ ($n = 54$). **A und B** Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte je Gruppe (Symbol) und deren 95 %-KI (Fehlerbalken). Die statistische Testung erfolgte durch Anwendung eines *one-way ANOVAs* mit multiplem Testen unter Tukey-Korrektur. Ausgewählte p -Werte sind zwischen den zu vergleichenden Gruppen angegeben und finden sich oberhalb der verbindenden Linien. Die Kontrollgruppe wurde durch die äquivalente Zugabe von *Aqua bidest.* definiert.

3.1.2.2 Langfristige Effekte unter Einfluss von Serotonin

Langfristige Effekte wurden untersucht, indem die Kontraktionsmessung mit einer Latenz von mindestens 20 bis maximal 24 Stunden nach Substanzzugabe erfolgte. Es wurden aufsteigende Konzentrationen von Serotonin von 0,1 μM bis 100 μM , jeweils mit und ohne 1 μM Clg, an isolierten KMZ untersucht (s. Abb. 7B). Je Gruppe wurden 54 KMZ aus zwei Herzpräparationen ($n = 54$, $N = 2$) gemessen und, sofern nicht anders angegeben, zur

Kontrollgruppe verglichen. Als Kontrollgruppe diente in allen Fällen die äquivalente Zugabe von *Aqua bidest.* Es konnte kein signifikanter Einfluss unter 1 μM Clg auf die relative Zellverkürzung festgestellt werden (ΔMW : - 0,36, 95 %-KI: - 1,50 – 0,79, $p = 0,9679$). Ebenfalls zeigten niedrige Konzentrationen von Serotonin bei 0,1 μM , 1 μM und 10 μM keinen Einfluss (0,1 μM Serotonin: ΔMW : - 0,36, 95 %-KI: - 1,56 – 0,83, $p = 0,9712$; 1 μM Serotonin: ΔMW : 0,16, 95 %-KI: - 1,03 – 1,36, $p = 0,9997$; 10 μM Serotonin: ΔMW : - 0,64, 95 %-KI: - 1,84 – 0,55, $p = 0,6844$). Erst eine Konzentration von 100 μM Serotonin konnte die relative Zellverkürzung signifikant um 55 % verringern (MW Kontrolle: 9,54, MW 100 μM Serotonin: 4,33; ΔMW : - 5,21, 95 %-KI: - 6,57 – - 3,85, $p < 0,0001$). In Gegenwart von 1 μM Clg konnte die Reduktion vollständig aufgehoben werden, indem kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe vorlag (ΔMW : - 0,63, 95 %-KI: - 1,77 – 0,52, $p = 0,6630$).

3.1.3 Quantifizierung von Wasserstoffperoxid in isolierten kardialen Mitochondrien

Die Quantifizierung von Wasserstoffperoxid wurde an isolierten Mitochondrien aus dem Herzgewebe von 6 Wochen alten WIS unter Zugabe von Serotonin und Clg vorgenommen (s. Abb. 8). Durchgeführt wurden die Messungen an vier biologischen Replikaten ($N = 4$), wobei die isolierten Mitochondrien gleichmäßig auf sechs Gruppen verteilt wurden. Gruppenvergleiche wurden unter Verwendung der Steigung der Fluoreszenzintensität in absoluten Einheiten pro Minute (a.u./min) berechnet und, sofern nicht anders angegeben, in Bezug zur Kontrollgruppe gesetzt. Als Kontrollgruppe diente in allen Fällen die äquivalente Zugabe von *Aqua bidest.* Es zeigte sich, dass 1 μM Clg, ebenso wie bei den Kontraktionsmessungen, keine signifikante Änderung bewirkte (ΔMW : - 0,01, 95 %-KI: - 0,22 – 0,21, $p > 0,9999$). Unter Einfluss von 10 μM Serotonin kam es zu einem leichten Anstieg der Fluoreszenzintensität, welcher jedoch nicht signifikant ausfiel (ΔMW : 0,08, 95 %-KI: - 0,17 – 0,32, $p = 0,8993$). In Gegenwart von 1 μM Clg sank die gemessene Fluoreszenzintensität unter das Niveau der Kontrollgruppe, wobei auch diese Veränderung nicht signifikant war (ΔMW : - 0,10, 95 %-KI: - 0,34 – 0,14, $p = 0,7643$). Serotonin führte erst in hoher Konzentration von 100 μM zu einer signifikanten Erhöhung der Fluoreszenzintensität (ΔMW : 0,38, 95 %-KI: 0,13 – 0,62, $p = 0,0017$). Es ließ sich unter Zugabe von 1 μM Clg eine Reduktion der Fluoreszenzintensität auf ein Niveau unterhalb der Kontrollgruppe erzielen, welches sich von dieser jedoch nicht signifikant unterschied (ΔMW : - 0,07; 95 %-KI: - 0,32 – 0,17, $p = 0,9155$). Die Reduktion war allerdings im

Vergleich zur alleinigen Gabe von 100 μM Serotonin signifikant (ΔMW : - 0,45, 95 %-KI: - 0,69 – - 0,21, $p = 0,0003$).

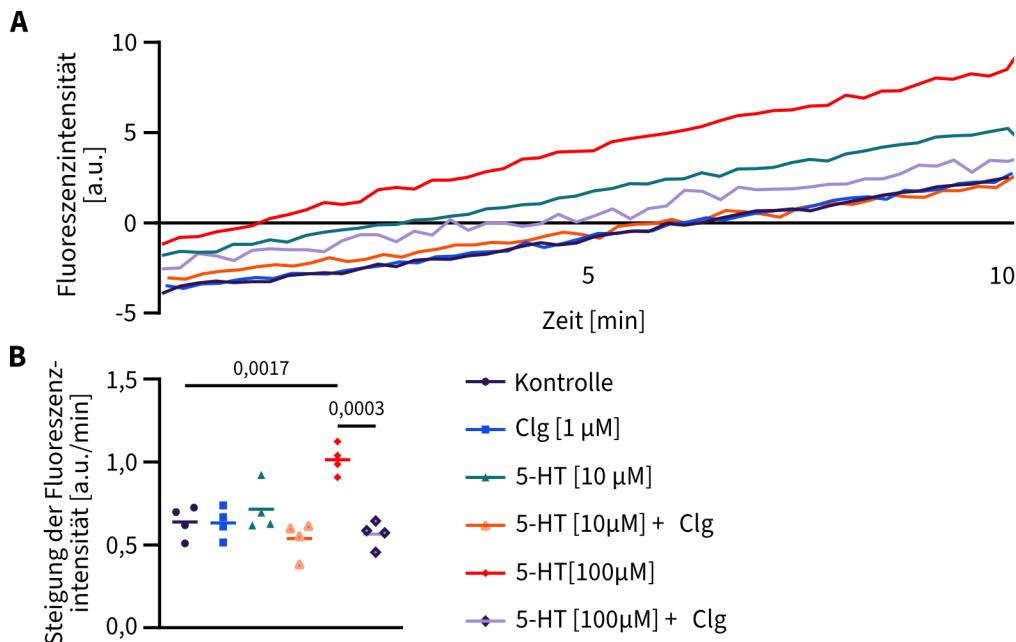


Abbildung 8: Quantifizierung von Wasserstoffperoxid in isolierten kardialen Mitochondrien unter Inkubation mit Serotonin. **A** Zu sehen sind die Gruppenverläufe der ermittelten Fluoreszenzintensität in absoluten Einheiten (a.u.) über einen Zeitraum von zehn Minuten unter Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an Serotonin (10 μM und 100 μM) jeweils mit und ohne Zugabe von 1 μM Clg. Isolierte kardiale Mitochondrien von vier biologischen Replikaten ($N = 4$) wurden gleichmäßig auf sechs Gruppen verteilt. Die dargestellten Kurven entsprechen den arithmetischen Mittelwerten aus Fluoreszenzintensität und Zeit. **B** Die Steigung der Fluoreszenzintensität (a.u./min) wurde für jede Gruppe und jedes biologische Replikat ermittelt. Dargestellt sind die Einzelwerte eines jeden Replikates (Symbole) und das arithmetische Mittel der Gruppe (Balken). Die Gruppenzugehörigkeit ist der rechtsstehenden Legende zu entnehmen. Es besteht eine farbliche Gruppenbindung in A und B. Sofern zwei Substrate eingesetzt wurden, erfolgte die Zugabe von Clg zeitlich vor der Zugabe von Serotonin. Die Kontrollgruppe wurde durch die äquivalente Zugabe von *Aqua bidest.* definiert. Gruppenvergleiche wurden mittels *one-way ANOVA* unter Tukey-Korrektur geprüft und sind, sofern sie signifikant waren, als p -Wert oberhalb der verbindenden Linien angegeben.

3.2 Abschnitt 2: *in-vivo*-Versuche

Alle folgenden Expressionsanalysen wurden mittels qPCR an Herzgewebeproben durchgeführt. Neben der Expression der MAO-A (kodiert durch *MAOA*) und MAO-B (kodiert durch *MAOB*) wurden folgende Serotoninstoffwechsel-assoziierte Gene untersucht: Serotonintransporter (SERT, kodiert durch *SLC6A4*), Aldehyddehydrogenase-2 (ALDH2, kodiert durch *ALDH2*) und Katalase (kodiert durch *CAT*). Zusätzlich wurden die Gene folgender Serotoninrezeptoren analysiert: Serotoninrezeptor-2A (5-HT_{2A}R, kodiert durch *HTR2A*) und Serotoninrezeptor-2B (5-HT_{2B}R, kodiert durch *HTR2B*). Betrachtet wurden altersabhängige Effekte der Genexpression bei WIS und SHR bei einem Tieralter von 6, 30 und 46 Wochen bzw. der Einfluss körperlicher Aktivität auf die Expression ausgewählter

Gene bei 6, 12, 22 und 30 Wochen alten SHR (*MAOA*, *MAOB*, *ALDH2*, *CAT*, *SLC6A4*). Verglichen wurden die Expressionsveränderungen zwischen WIS und SHR bzw. Kontroll- und Interventionsgruppe hinsichtlich der körperlichen Aktivität (nachfolgend als SHR-Kontrolle und SHR-Läufer bezeichnet). Gruppenvergleiche wurden anhand der ΔC_T -Werte geprüft und sind als Differenz des arithmetischen Mittelwerts zwischen SHR und WIS bzw. SHR-Läufer und SHR-Kontrolle ($\Delta\Delta C_T$ -Wert) angegeben. Expressionsveränderungen wurden innerhalb der einzelnen Gruppen, sofern nicht anders angegeben, in Bezug zum jeweiligen Startkollektiv mit einem Alter von 6 Wochen betrachtet. Sofern es von Interesse war, sind die $\Delta\Delta C_T$ -Werte um die Angabe der FCs ergänzt worden.

3.2.1 Altersabhängige Expression der Monoaminoxidase-A

Die Expression der MAO-A zeigte sowohl bei WIS als auch bei SHR einen altersabhängigen Anstieg. Beim direkten Vergleich der ΔC_T -Werte von WIS und SHR konnte lediglich bei einem Alter von 30 Wochen ein signifikanter Gruppenunterschied erreicht werden (s. Abb. 9A). Das arithmetische Mittel der ΔC_T -Werte von SHR lag um 2,23 über dem von WIS (FC: 4,69, $\Delta\Delta C_T$: 2,23, 95 %-KI: 1,50 – 2,96, $p < 0,0001$). Bei einem Alter von 6 und 46 Wochen konnten keine signifikanten Gruppenunterschiede registriert werden (6 Wochen: $\Delta\Delta C_T$: 0,69, 95 %-KI: - 0,03 – 1,42, $p = 0,0657$; 46 Wochen: $\Delta\Delta C_T$: 0,18, 95 %-KI: - 0,55 – 0,91, $p = 0,8971$). Die Expression der MAO-A stieg demnach bei SHR signifikant früher an als bei WIS, verblieb aber ab diesem Zeitpunkt auf einem ähnlich hohen Niveau. Innerhalb der WIS- wie auch der SHR-Gruppe konnte bei einem Alter von 30 und 46 Wochen eine signifikant erhöhte Expression festgestellt werden (s. Abb. 9B-C). So betrug der $\Delta\Delta C_T$ -Wert 0,72 bei 30 Wochen alten WIS (FC: 1,65, $\Delta\Delta C_T$: 0,72, 95 %-KI: 0,01 – 1,43, $p = 0,0449$). Deutlicher fiel die erhöhte Expression bei 46 Wochen alten WIS mit einem $\Delta\Delta C_T$ -Wert von 2,82 aus (FC: 7,06, $\Delta\Delta C_T$: 2,82, 95 %-KI: 2,12 – 3,53, $p < 0,0001$). SHR zeigten einen ähnlichen Trend, wobei diese bereits bei einem Alter von 30 Wochen einen $\Delta\Delta C_T$ -Wert von 2,26 aufwiesen (FC: 4,80, $\Delta\Delta C_T$: 2,26, 95 %-KI: 1,55 – 2,96, $p < 0,0001$). Auf der Stufe von 46 Wochen blieb der $\Delta\Delta C_T$ -Wert nahezu unverändert bei 2,31 (FC: 4,96, $\Delta\Delta C_T$: 2,31, 95 %-KI: 1,61 – 3,02, $p < 0,0001$).

3.2.2 Altersabhängige Expression der Monoaminoxidase-A unter körperlicher Aktivität

Zwischen SHR-Kontrolle und SHR-Läufer konnte lediglich bei einem Alter von 22 Wochen ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (s. Abb. 9D). Das arithmetische Mittel der ΔC_T -Werte der SHR-Läufer lag hier um 0,79 über dem der SHR-Kontrolle (FC: 1,73, $\Delta\Delta C_T$:

0,79, 95 %-KI: 0,09 – 1,49, $p = 0,0237$). Bei allen weiteren Altersstufen konnten keine signifikanten Gruppenunterschiede beobachtet werden (12 Wochen: $\Delta\Delta C_T$: - 0,27, 95 %-KI: - 0,97 – 0,43, $p = 0,7180$; 30 Wochen: $\Delta\Delta C_T$: 0,26, 95 %-KI: - 0,44 – 0,96, $p = 0,7376$). Innerhalb der SHR-Kontrollgruppe kam es zu einer anfänglichen Minderung der Expression bei einem Alter von 12 Wochen, welche jedoch nicht signifikant ausfiel ($\Delta\Delta C_T$: - 0,33, 95 %-KI: - 0,97 – 0,30, $p = 0,4728$, s. Abb. 9E). Bei einem Alter von 22 Wochen konnte eine signifikante Minderung der Expression verzeichnet werden ($\Delta\Delta C_T$: - 0,79, 95 %-KI: - 1,42 – - 0,15, $p = 0,0112$). Mit einem Alter von 30 Wochen kehrte sich der Trend um und es wurde eine Expressionssteigerung registriert, die jedoch nicht signifikant ausfiel ($\Delta\Delta C_T$: 0,41, 95 %-KI: - 0,22 – 1,05, $p = 0,2894$). Innerhalb der SHR-Läufergruppe konnte ebenfalls zu Beginn, bei einem Alter von 12 Wochen, eine nicht signifikante Minderung der Expression beobachtet werden ($\Delta\Delta C_T$: - 0,60, 95 %-KI: - 1,23 – 0,03, $p = 0,0699$, s. Abb. 9F). Ab diesem Alter stieg die Expression kontinuierlich an, erreichte bei einem Alter von 22 Wochen ein ähnliches Ausmaß wie das Startkollektiv ($\Delta\Delta C_T$: 0,00, 95 %-KI: - 0,63 – 0,63, $p > 0,9999$) und lag bei einem Alter von 30 Wochen signifikant über dem Startkollektiv ($\Delta\Delta C_T$: 0,67, 95 %-KI: 0,04 – 1,31, $p = 0,0343$).

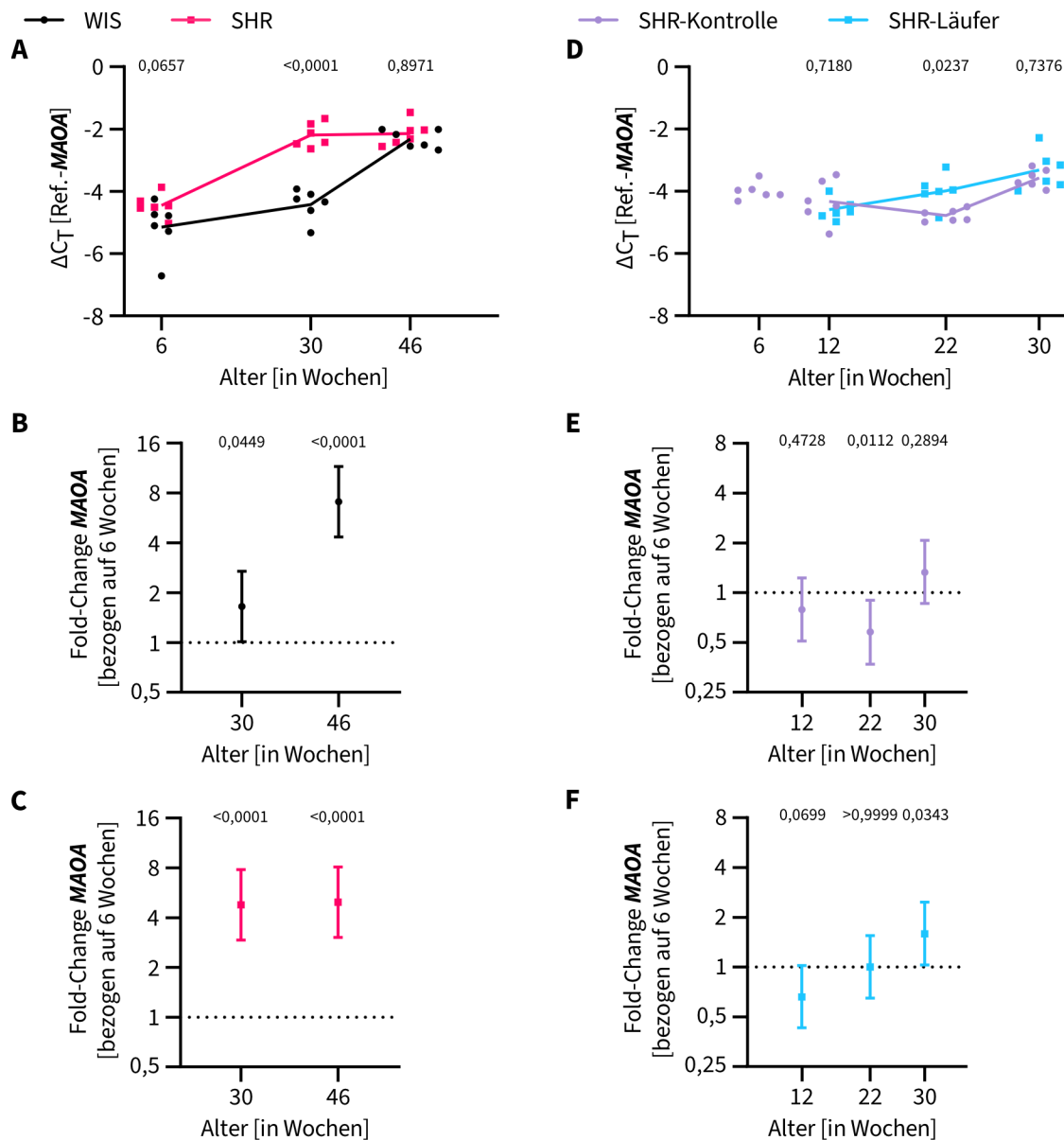


Abbildung 9: Altersabhängige Expression der MAO-A in WIS und SHR mit und ohne Möglichkeit zur körperlichen Aktivität. **A** Dargestellt sind die einzelnen ΔC_T -Werte an den Altersstufen 6, 30 und 46 Wochen. Je Gruppe und Zeitpunkt sind sechs biologische Replikate ($N = 6$) als schwarzer Kreis (WIS) und rotes Quadrat (SHR) abgebildet. Verbunden sind die arithmetischen Mittelwerte. Gruppenvergleiche zwischen WIS, SHR und innerhalb der einzelnen Gruppen wurden mittels *two-way ANOVA* und *Šidák's multiple comparisons test* geprüft und sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben. **B und C** Dargestellt sind die FCs für WIS (schwarzer Kreis) und SHR (rotes Quadrat) sowie deren 95 %-KI (Fehlerbalken) bezogen auf ein Alter von 6 Wochen (gestrichelte Linie). Gruppenvergleiche zu einem Alter von 6 Wochen sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben. **D** Dargestellt sind die einzelnen ΔC_T -Werte an den Altersstufen 6, 12, 22 und 30 Wochen. Ab einem Alter von 6 Wochen erhielt die Gruppe der SHR-Läufer die Möglichkeit zur körperlichen Aktivität. Je Gruppe und Zeitpunkt sind ab einem Alter von 12 Wochen sechs biologische Replikate ($N = 6$) als violetter Kreis (SHR-Kontrolle) und blaues Quadrat (SHR-Läufer) abgebildet. Verbunden sind die arithmetischen Mittelwerte. Gruppenvergleiche zwischen SHR-Kontrolle, SHR-Läufer und innerhalb der einzelnen Gruppen wurden mittels *two-way ANOVA* und *Šidák's multiple comparisons test* geprüft und sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben. **E und F** Dargestellt sind die FCs für SHR-Kontrolle (violetter Kreis) und SHR-Läufer (blaues Quadrat) sowie deren 95 %-KI (Fehlerbalken) bezogen auf das 6 Wochen alte Startkollektiv (gestrichelte Linie). Gruppenvergleiche zu einem Alter von 6 Wochen sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben.

3.2.3 Altersabhängige Expression der Monoaminoxidase-B

Die Expression der MAO-B zeigte über alle Altersstufen hinweg keine signifikanten Gruppenunterschiede zwischen WIS und SHR (6 Wochen: $\Delta\Delta C_T$: 0,11, 95 %-KI: - 0,50 – 0,73, $p = 0,9530$; 30 Wochen: $\Delta\Delta C_T$: - 0,37, 95 %-KI: - 0,99 – 0,24, $p = 0,3488$; 46 Wochen: $\Delta\Delta C_T$: - 0,07, 95 %-KI: - 0,68 – 0,55, $p = 0,9907$, s. Abb. 10A). Innerhalb der Gruppe der WIS konnten bei einem Alter von 30 und 46 Wochen keine signifikanten Unterschiede verzeichnet werden (30 Wochen: $\Delta\Delta C_T$: - 0,13, 95 %-KI: - 0,72 – 0,46, $p = 0,8405$; 46 Wochen: $\Delta\Delta C_T$: 0,03, 95 %-KI: - 0,56 – 0,62, $p = 0,9891$, s. Abb. 10B). Innerhalb der Gruppe der SHR konnte bei einem Alter von 30 Wochen eine signifikante Minderung der Expression registriert werden (FC: 0,65, $\Delta\Delta C_T$: - 0,62, 95 %-KI: - 1,21 – - 0,03, $p = 0,0391$, s. Abb. 10C). Bei einem Alter von 46 Wochen war jedoch keine signifikante Änderung der Expression feststellbar ($\Delta\Delta C_T$: - 0,15, 95 %-KI: - 0,74 – 0,44, $p = 0,7997$).

3.2.4 Altersabhängige Expression der Monoaminoxidase-B unter körperlicher Aktivität

Die Expression der MAO-B zeigte über alle Altersstufen hinweg keine signifikanten Gruppenunterschiede zwischen SHR-Kontrolle und SHR-Läufer (12 Wochen: $\Delta\Delta C_T$: - 0,16, 95 %-KI: - 1,18 – 0,86, $p = 0,9734$; 22 Wochen: $\Delta\Delta C_T$: - 0,01, 95 %-KI: - 1,03 – 1,01, $p > 0,9999$; 30 Wochen: $\Delta\Delta C_T$: - 0,67, 95 %-KI: - 1,69 – 0,35, $p = 0,2924$, s. Abb. 10D). Innerhalb der Gruppe der SHR-Kontrolle konnte eine Expressionszunahme an allen Altersstufen beobachtet werden (s. Abb. 10E), welche bei einem Alter von 12 und 22 Wochen am höchsten ausfiel (12 Wochen: FC: 3,61, $\Delta\Delta C_T$: 1,85, 95 %-KI: 0,96 – 2,73, $p < 0,0001$; 22 Wochen: FC: 3,66, $\Delta\Delta C_T$: 1,87, 95 %-KI: 0,98 – 2,75, $p < 0,0001$). Bei einem Alter von 30 Wochen nahm die Expression etwas ab, lag aber weiterhin signifikant über dem Niveau der Kontrollgruppe (FC: 2,06, $\Delta\Delta C_T$: 1,04, 95 %-KI: 0,15 – 1,92, $p = 0,0174$). Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich auch in der Gruppe der SHR-Läufer (s. Abb. 10F). Es konnte eine anfängliche Zunahme der Expression bei einem Alter von 12 und 22 Wochen registriert werden (12 Wochen: FC: 3,23, $\Delta\Delta C_T$: 1,69, 95 %-KI: 0,81 – 2,57, $p = 0,0001$; 22 Wochen: FC: 3,63, $\Delta\Delta C_T$: 1,86, 95 %-KI: 0,97 – 2,74, $p < 0,0001$). Bei einem Alter von 30 Wochen zeigte sich hingegen keine signifikante Expressionsveränderung ($\Delta\Delta C_T$: 0,37, 95 %-KI: - 0,51 – 1,26, $p = 0,6498$).

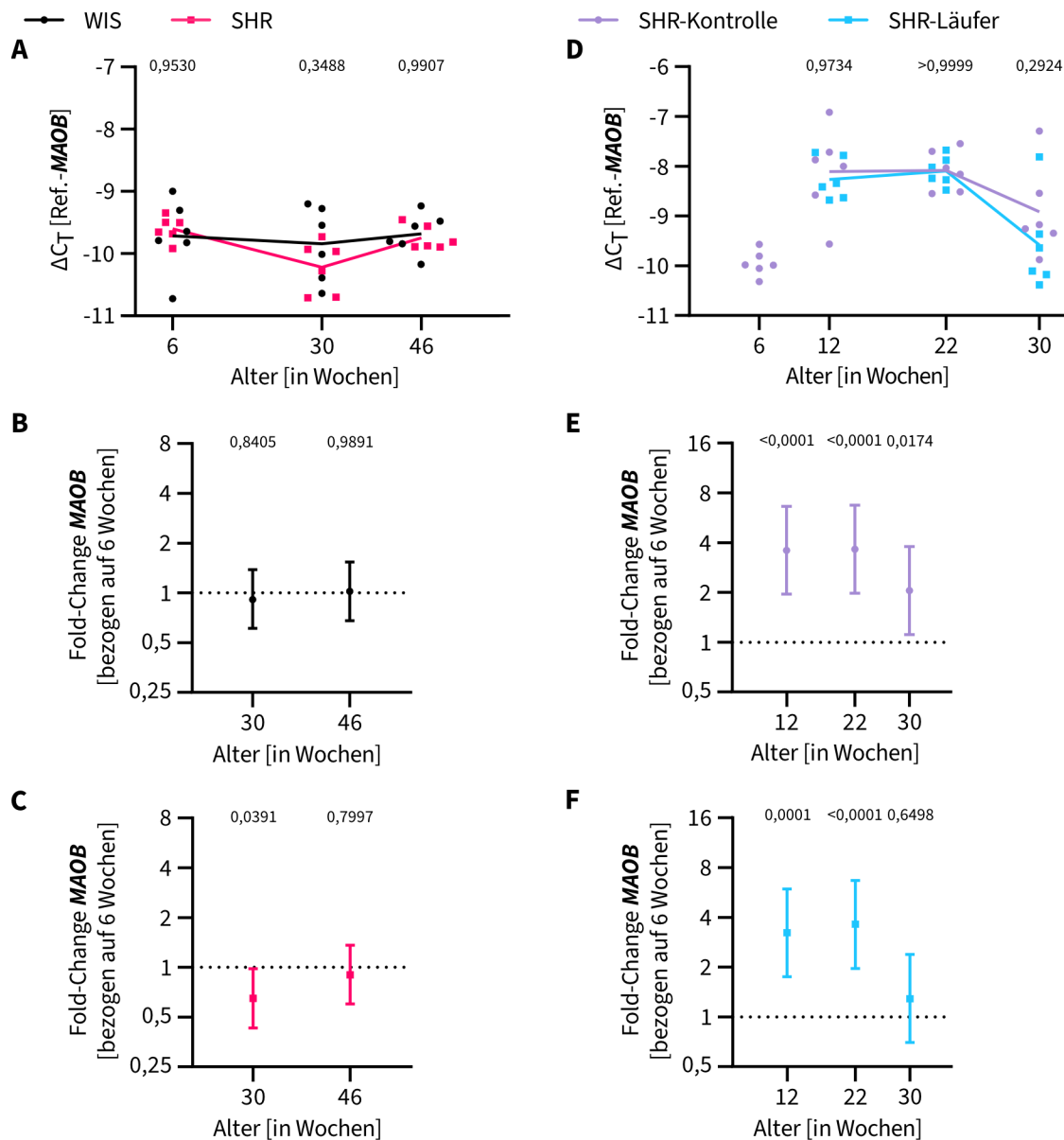


Abbildung 10: Altersabhängige Expression der MAO-B in WIS und SHR mit und ohne Möglichkeit zur körperlichen Aktivität. **A** Dargestellt sind die einzelnen ΔC_T -Werte an den Altersstufen 6, 30 und 46 Wochen. Je Gruppe und Zeitpunkt sind sechs biologische Replikate ($N = 6$) als schwarzer Kreis (WIS) und rotes Quadrat (SHR) abgebildet. Verbunden sind die arithmetischen Mittelwerte. Gruppenvergleiche zwischen WIS, SHR und innerhalb der einzelnen Gruppen wurden mittels *two-way ANOVA* und *Šidák's multiple comparisons test* geprüft und sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben. **B und C** Dargestellt sind die FCs für WIS (schwarzer Kreis) und SHR (rotes Quadrat) sowie deren 95 %-KI (Fehlerbalken) bezogen auf ein Alter von 6 Wochen (gestrichelte Linie). Gruppenvergleiche zu einem Alter von 6 Wochen sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben. **D** Dargestellt sind die einzelnen ΔC_T -Werte an den Altersstufen 6, 12, 22 und 30 Wochen. Ab einem Alter von 6 Wochen erhielt die Gruppe der SHR-Läufer die Möglichkeit zur körperlichen Aktivität. Je Gruppe und Zeitpunkt sind ab einem Alter von 12 Wochen sechs biologische Replikate ($N = 6$) als violetter Kreis (SHR-Kontrolle) und blaues Quadrat (SHR-Läufer) abgebildet. Verbunden sind die arithmetischen Mittelwerte. Gruppenvergleiche zwischen SHR-Kontrolle, SHR-Läufer und innerhalb der einzelnen Gruppen wurden mittels *two-way ANOVA* und *Šidák's multiple comparisons test* geprüft und sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben. **E und F** Dargestellt sind die FCs für SHR-Kontrolle (violetter Kreis) und SHR-Läufer (blaues Quadrat) sowie deren 95 %-KI (Fehlerbalken) bezogen auf das 6 Wochen alte Startkollektiv (gestrichelte Linie). Gruppenvergleiche zu einem Alter von 6 Wochen sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben.

3.2.5 Altersabhängige Expression des Serotonin-Transporters

Die Expression des SERTs lag bei SHR über allen Altersstufen hinweg signifikant unter dem Niveau von WIS (s. Abb. 11A). So betrug der $\Delta\Delta C_T$ -Wert bei einem Alter von 6 Wochen - 3,53 (FC: 0,09, 95 %-KI: - 4,79 – - 2,26, $p < 0,0001$), bei 30 Wochen - 4,67 (FC: 0,04, 95 %-KI: - 5,94 – - 3,40, $p < 0,0001$) und bei 46 Wochen - 2,84 (FC: 0,14, 95 %-KI: - 4,11 – - 1,57, $p < 0,0001$). Innerhalb der Gruppe der WIS zeigte sich bei einem Alter von 46 Wochen eine deutliche Minderung der Expression (FC: 0,16, $\Delta\Delta C_T$: - 2,63, 95 %-KI: - 4,00 – - 1,26, $p = 0,0003$), wohingegen bei einem Alter von 30 Wochen keine signifikante Änderung festgestellt werden konnten ($\Delta\Delta C_T$: 0,40, 95 %-KI: - 0,97 – 1,77, $p = 0,7359$, s. Abb. 11B). Bei SHR zeigte sich ein ähnlicher Trend mit einer Expressionsminderung bei einem Alter von 46 Wochen (FC: 0,26, $\Delta\Delta C_T$: - 1,95, 95 %-KI: - 3,31 – - 0,58, $p = 0,0052$) und einer nicht signifikanten Änderung bei einem Alter von 30 Wochen ($\Delta\Delta C_T$: - 0,74, 95 %-KI: - 2,11 – 0,63, $p = 0,3685$, s. Abb. 11C).

3.2.6 Altersabhängige Expression des Serotonin-Transporters unter körperlicher Aktivität

Der Vergleich zwischen SHR-Kontrolle und SHR-Läufer zeigte eine Abnahme der Expression in der Gruppe der SHR-Läufer bei einem Alter von 22 und 30 Wochen, wobei die Abnahme lediglich bei einem Alter von 30 Wochen signifikant ausfiel (22 Wochen: FC: 0,60, $\Delta\Delta C_T$: - 0,73, 95 %-KI: - 2,01 – 0,56, $p = 0,4171$; 30 Wochen: FC: 0,27, $\Delta\Delta C_T$: - 1,91, 95 %-KI: - 3,20 – - 0,62, $p = 0,0023$, s. Abb. 11D). Zu Beginn konnte bei einem Alter von 12 Wochen kein signifikanter Gruppenunterschied festgestellt werden ($\Delta\Delta C_T$: - 0,16, 95 %-KI: - 1,45 – 1,13, $p = 0,9857$). Innerhalb der Gruppe der SHR-Kontrolle konnte an allen Altersstufen eine signifikante Expressionszunahme registriert werden (12 Wochen: FC: 7,36, $\Delta\Delta C_T$: 2,88, 95 %-KI: 1,74 – 4,03, $p < 0,0001$; 22 Wochen: FC: 7,73, $\Delta\Delta C_T$: 2,95, 95 %-KI: 1,80 – 4,09, $p < 0,0001$; 30 Wochen: FC: 7,94, $\Delta\Delta C_T$: 2,99, 95% KI: 1,84 – 4,13, $p < 0,0001$, s. Abb. 11E). Auch in der Gruppe der SHR-Läufer zeigte sich eine anfänglich signifikante Expressionszunahme bei einem Alter von 12 und 22 Wochen (12 Wochen: FC: 6,59, $\Delta\Delta C_T$: 2,72, 95 %-KI: 1,58 – 3,87, $p < 0,0001$; 22 Wochen: FC: 4,66, $\Delta\Delta C_T$: 2,22, 95 %-KI: 1,08 – 3,37, $p < 0,0001$, s. Abb. 11F). Bei einem Alter von 30 Wochen lag jedoch kein signifikanter Gruppenunterschied vor ($\Delta\Delta C_T$: 1,08, 95 %-KI: - 0,07 – 2,22, $p = 0,0702$).

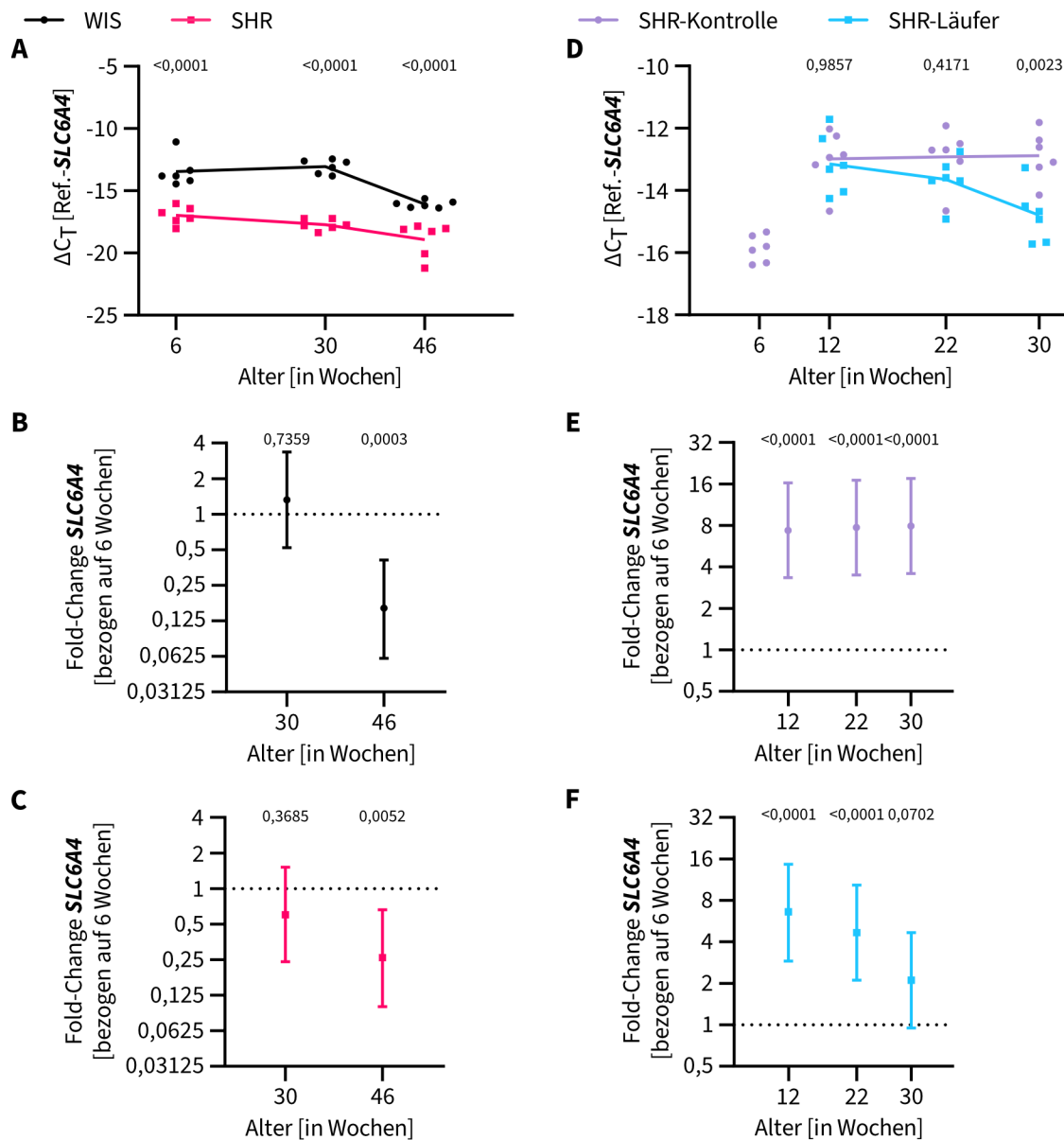


Abbildung 11: Altersabhängige Expression des SERTs in WIS und SHR mit und ohne Möglichkeit zur körperlichen Aktivität. **A** Dargestellt sind die einzelnen ΔC_T -Werte an den Altersstufen 6, 30 und 46 Wochen. Je Gruppe und Zeitpunkt sind sechs biologische Replikate ($N = 6$) als schwarzer Kreis (WIS) und rotes Quadrat (SHR) abgebildet. Verbunden sind die arithmetischen Mittelwerte. Gruppenvergleiche zwischen WIS, SHR und innerhalb der einzelnen Gruppen wurden mittels *two-way ANOVA* und *Šidák's multiple comparisons test* geprüft und sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben. **B und C** Dargestellt sind die FCs für WIS (schwarzer Kreis) und SHR (rotes Quadrat) sowie deren 95 %-KI (Fehlerbalken) bezogen auf ein Alter von 6 Wochen (gestrichelte Linie). Gruppenvergleiche zu einem Alter von 6 Wochen sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben. **D** Dargestellt sind die einzelnen ΔC_T -Werte an den Altersstufen 6, 12, 22 und 30 Wochen. Ab einem Alter von 6 Wochen erhielt die Gruppe der SHR-Läufer die Möglichkeit zur körperlichen Aktivität. Je Gruppe und Zeitpunkt sind ab einem Alter von 12 Wochen sechs biologische Replikate ($N = 6$) als violetter Kreis (SHR-Kontrolle) und blaues Quadrat (SHR-Läufer) abgebildet. Verbunden sind die arithmetischen Mittelwerte. Gruppenvergleiche zwischen SHR-Kontrolle, SHR-Läufer und innerhalb der einzelnen Gruppen wurden mittels *two-way ANOVA* und *Šidák's multiple comparisons test* geprüft und sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben. **E und F** Dargestellt sind die FCs für SHR-Kontrolle (violetter Kreis) und SHR-Läufer (blaues Quadrat) sowie deren 95 %-KI (Fehlerbalken) bezogen auf das 6 Wochen alte Startkollektiv (gestrichelte Linie). Gruppenvergleiche zu einem Alter von 6 Wochen sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben.

3.2.7 Altersabhängige Expression der Aldehyddehydrogenase-2

Die Expression der ALDH2 unterschied sich lediglich an den letzten beiden Altersstufen, bei 30 und 46 Wochen, signifikant zwischen WIS und SHR (s. Abb. 12A). Bei einem Alter von 30 Wochen konnte eine Expressionsabnahme bei SHR beobachtet werden, wohingegen es bei einem Alter von 46 Wochen zu einer Expressionszunahme kam (30 Wochen: FC: 0,67, $\Delta\Delta C_T$: - 0,58, 95 %-KI: - 1,16 – - 0,00, $p = 0,0498$; 46 Wochen: FC: 1,60, $\Delta\Delta C_T$: 0,68, 95 %-KI: 0,10 – 1,26, $p = 0,0174$). Bei einem Alter von 6 Wochen lag kein signifikanter Gruppenunterschied vor ($\Delta\Delta C_T$: - 0,31, 95 %-KI: - 0,89 – 0,27, $p = 0,4670$). Innerhalb der Gruppe der WIS zeigte sich bei einem Alter von 30 Wochen kein signifikanter Unterschied ($\Delta\Delta C_T$: 0,12, 95 %-KI: - 0,51 – 0,75, $p = 0,8825$), wohingegen bei einem Alter von 46 Wochen eine signifikante Minderung der Expression verzeichnet werden konnte (FC: 0,62, $\Delta\Delta C_T$: - 0,68, 95 %-KI: - 1,30 – - 0,05, $p = 0,0341$, s. Abb. 12B). Bei SHR konnten für beide Altersstufen, bei 30 und 46 Wochen, keine signifikanten Expressionsänderungen festgestellt werden (30 Wochen: $\Delta\Delta C_T$: - 0,16, 95 %-KI: - 0,78 – 0,47, $p = 0,8021$; 46 Wochen: $\Delta\Delta C_T$: 0,32, 95 %-KI: - 0,31 – 0,94, $p = 0,4188$, s. Abb. 12C).

3.2.8 Altersabhängige Expression der Aldehyddehydrogenase-2 unter körperlicher Aktivität

Die Expression der ALDH2 zeigte über alle Altersstufen hinweg keine signifikanten Gruppenunterschiede zwischen SHR-Kontrolle und SHR-Läufer (12 Wochen: $\Delta\Delta C_T$: 0,11, 95 %-KI: - 0,79 – 1,01, $p = 0,9872$; 22 Wochen: $\Delta\Delta C_T$: 0,65, 95 %-KI: - 0,26 – 1,55, $p = 0,2226$; 30 Wochen: $\Delta\Delta C_T$: 0,11, 95 %-KI: - 0,80 – 1,01, $p = 0,9877$, s. Abb. 12D). Innerhalb der Gruppe der SHR-Kontrolle konnte zu Beginn, bei einem Alter von 12 und 22 Wochen, eine deutliche Expressionsminderung registriert werden (12 Wochen: FC: 0,12, $\Delta\Delta C_T$: - 3,05, 95 %-KI: - 3,83 – - 2,26, $p < 0,0001$; 22 Wochen: FC: 0,14, $\Delta\Delta C_T$: - 2,87, 95 %-KI: - 3,66 – - 2,09, $p < 0,0001$, s. Abb. 12E). Im Alter von 30 Wochen kam es zu einer Expressionszunahme, die jedoch nicht signifikant ausfiel ($\Delta\Delta C_T$: 0,73, 95 %-KI: - 0,06 – 1,52, $p = 0,0748$). Bei der Gruppe der SHR-Läufer konnten ähnliche Veränderungen beobachtet werden (s. Abb. 12F). Es zeigte sich anfänglich eine deutliche Abnahme der Expression im Alter von 12 und 22 Wochen (12 Wochen: FC: 0,13, $\Delta\Delta C_T$: - 2,94, 95 %-KI: - 3,73 – - 2,15, $p < 0,0001$; 22 Wochen: FC: 0,21, $\Delta\Delta C_T$: - 2,23, 95 %-KI: - 3,02 – - 1,44, $p < 0,0001$), wohingegen es zu einer signifikanten Zunahme der Expression bei einem Alter von 30 Wochen kam (FC: 1,79, $\Delta\Delta C_T$: 0,84, 95 %-KI: 0,05 – 1,63, $p = 0,0344$).

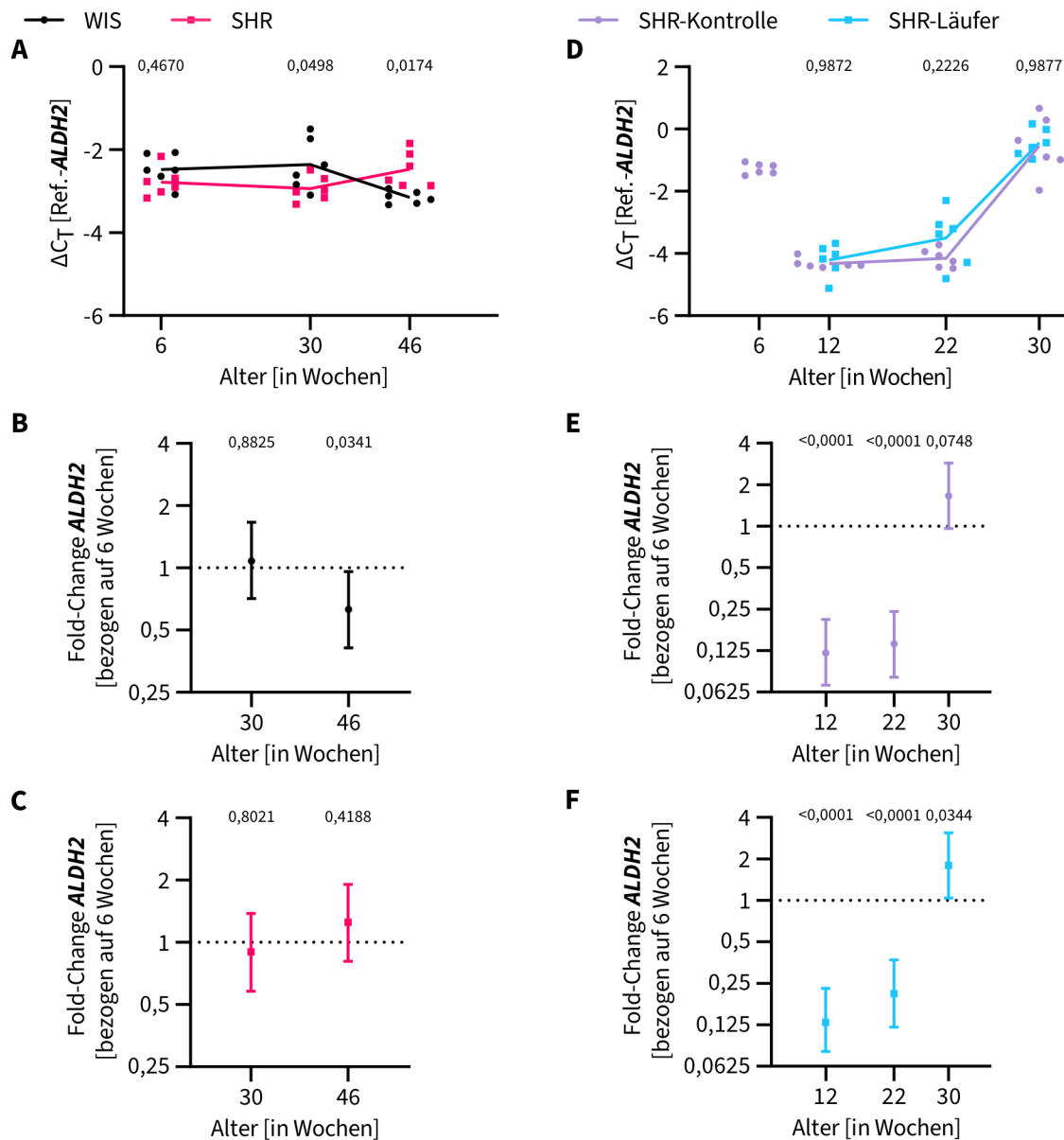


Abbildung 12: Altersabhängige Expression der ALDH2 in WIS und SHR mit und ohne Möglichkeit zur körperlichen Aktivität. **A** Dargestellt sind die einzelnen ΔC_T -Werte an den Altersstufen 6, 30 und 46 Wochen. Je Gruppe und Zeitpunkt sind sechs biologische Replikate ($N = 6$) als schwarzer Kreis (WIS) und rotes Quadrat (SHR) abgebildet. Verbunden sind die arithmetischen Mittelwerte. Gruppenvergleiche zwischen WIS, SHR und innerhalb der einzelnen Gruppen wurden mittels *two-way ANOVA* und *Šidák's multiple comparisons test* geprüft und sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben. **B und C** Dargestellt sind die FCs für WIS (schwarzer Kreis) und SHR (rotes Quadrat) sowie deren 95 %-KI (Fehlerbalken) bezogen auf ein Alter von 6 Wochen (gestrichelte Linie). Gruppenvergleiche zu einem Alter von 6 Wochen sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben. **D** Dargestellt sind die einzelnen ΔC_T -Werte an den Altersstufen 6, 12, 22 und 30 Wochen. Ab einem Alter von 6 Wochen erhielt die Gruppe der SHR-Läufer die Möglichkeit zur körperlichen Aktivität. Je Gruppe und Zeitpunkt sind ab einem Alter von 12 Wochen sechs biologische Replikate ($N = 6$) als violetter Kreis (SHR-Kontrolle) und blaues Quadrat (SHR-Läufer) abgebildet. Verbunden sind die arithmetischen Mittelwerte. Gruppenvergleiche zwischen SHR-Kontrolle, SHR-Läufer und innerhalb der einzelnen Gruppen wurden mittels *two-way ANOVA* und *Šidák's multiple comparisons test* geprüft und sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben. **E und F** Dargestellt sind die FCs für SHR-Kontrolle (violetter Kreis) und SHR-Läufer (blaues Quadrat) sowie deren 95 %-KI (Fehlerbalken) bezogen auf das 6 Wochen alte Startkollektiv (gestrichelte Linie). Gruppenvergleiche zu einem Alter von 6 Wochen sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben.

3.2.9 Altersabhängige Expression der Katalase

Die Expression der Katalase unterschied sich an allen Altersstufen signifikant zwischen WIS und SHR (s. Abb. 13A). Die Gruppe der SHR zeigte kontinuierlich ein höheres Expressionsniveau im Vergleich zur Gruppe der WIS auf (6 Wochen: FC: 2,17, $\Delta\Delta C_T$: 1,12, 95 %-KI: 0,73 – 1,50, $p < 0,0001$; 30 Wochen: FC: 2,11, $\Delta\Delta C_T$: 1,08, 95 %-KI: 0,70 – 1,47, $p < 0,0001$; 46 Wochen: FC: 1,42, $\Delta\Delta C_T$: 0,51, 95 %-KI: 0,13 – 0,90, $p < 0,0064$). Innerhalb der Gruppe der WIS zeigte sich bei einem Alter von 30 Wochen kein signifikanter Unterschied ($\Delta\Delta C_T$: - 0,08, 95 %-KI: - 0,45 – 0,29, $p = 0,8459$), wohingegen eine signifikante Steigerung der Expression bei einem Alter von 46 Wochen verzeichnet werden konnte (FC: 1,37, $\Delta\Delta C_T$: 0,45, 95 %-KI: 0,08 – 0,83, $p = 0,0161$, s. Abb. 13B). In der Gruppe der SHR konnten sowohl für ein Alter von 30 Wochen als auch für 46 Wochen keine signifikanten Expressionsänderungen festgestellt werden (30 Wochen: $\Delta\Delta C_T$: - 0,11, 95 %-KI: - 0,49 – 0,26, $p = 0,7159$; 46 Wochen: $\Delta\Delta C_T$: - 0,15, 95 %-KI: - 0,52 – 0,23, $p = 0,5775$, s. Abb. 13C).

3.2.10 Altersabhängige Expression der Katalase unter körperlicher Aktivität

Die Expression der Katalase lag in der Gruppe der SHR-Läufer an allen Altersstufen unterhalb der Expression der SHR-Kontrolle, wobei die Unterschiede nicht signifikant ausfielen (12 Wochen: $\Delta\Delta C_T$: - 0,46, 95 %-KI: - 1,17 – 0,25, $p = 0,2944$; 22 Wochen: $\Delta\Delta C_T$: - 0,21, 95 %-KI: - 0,92 – 0,50, $p = 0,8495$; 30 Wochen: $\Delta\Delta C_T$: - 0,40, 95 %-KI: - 1,12 – 0,31, $p = 0,4102$, s. Abb. 13D). Innerhalb der Gruppe der SHR-Kontrolle konnte eine zunehmende Expressionsminderung bei einem Alter von 12 und 22 Wochen registriert werden (12 Wochen: FC: 0,50, $\Delta\Delta C_T$: - 1,01, 95 %-KI: - 1,67 – - 0,35, $p = 0,0016$; 22 Wochen: FC: 0,37, $\Delta\Delta C_T$: - 1,43, 95 %-KI: - 2,09 – - 0,76, $p < 0,0001$, s. Abb. 13E). Bei einem Alter von 30 Wochen lag hingegen kein signifikanter Unterschied mehr vor ($\Delta\Delta C_T$: - 0,37, 95 %-KI: - 1,03 – 0,29, $p = 0,4231$). Ähnliche Veränderungen konnten auch in der Gruppe der SHR-Läufer beobachtet werden (s. Abb. 13F). Es kam zu einer anfänglichen Expressionsminderung bei einem Alter von 12 und 22 Wochen (12 Wochen: FC: 0,36, $\Delta\Delta C_T$: - 1,47, 95 %-KI: - 2,14 – - 0,81, $p < 0,0001$; 22 Wochen: FC: 0,32, $\Delta\Delta C_T$: - 1,63, 95 %-KI: - 2,29 – - 0,97, $p < 0,0001$). Bei einem Alter von 30 Wochen nahm die Expression zwar zu, lag aber weiterhin signifikant unterhalb der Expression der Kontrollgruppe (FC: 0,59, $\Delta\Delta C_T$: - 0,77, 95 %-KI: - 1,43 – - 0,11, $p = 0,0178$).

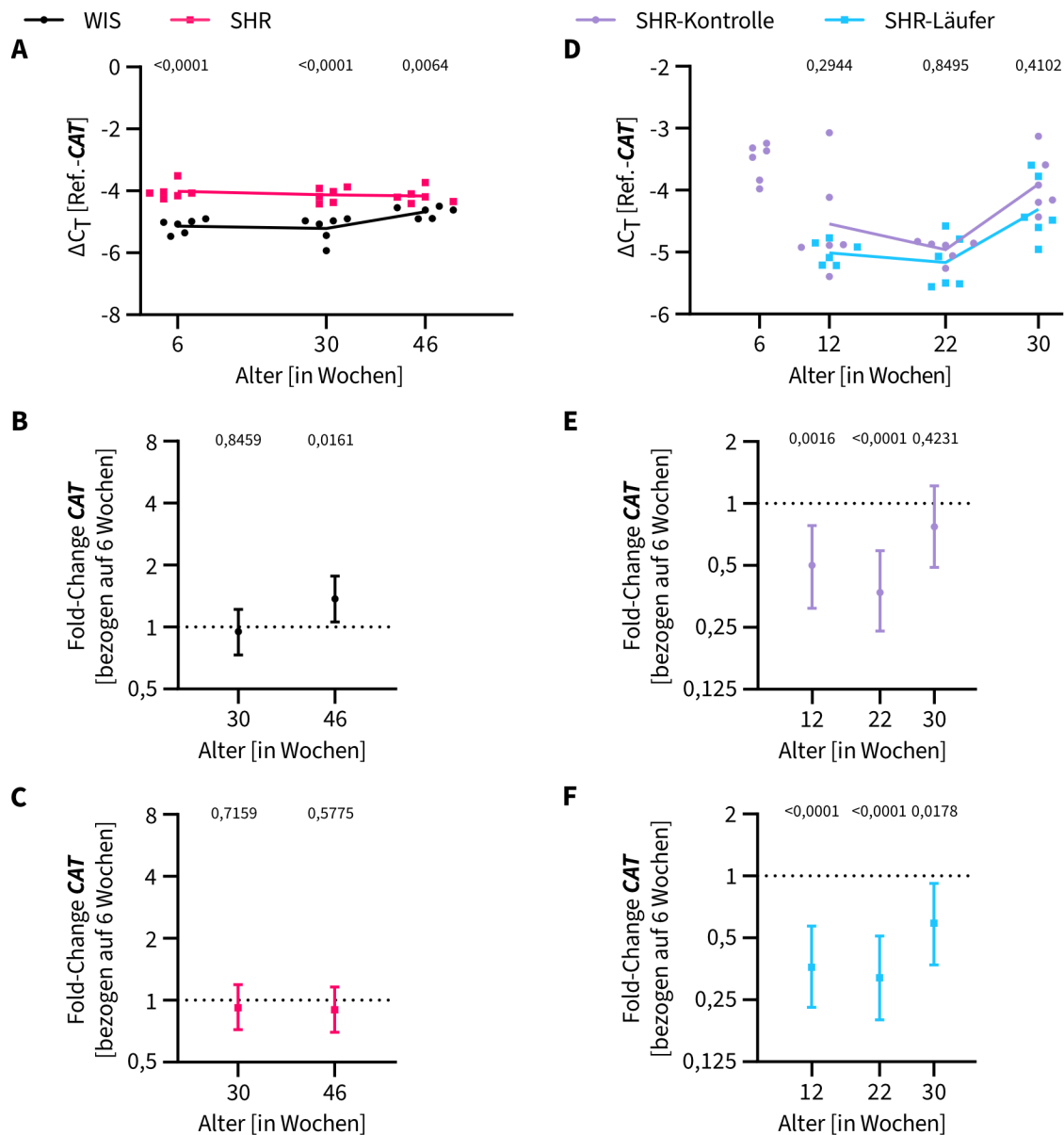


Abbildung 13: Altersabhängige Expression der Katalase in WIS und SHR mit und ohne Möglichkeit zur körperlichen Aktivität. **A** Dargestellt sind die einzelnen ΔC_T -Werte an den Altersstufen 6, 30 und 46 Wochen. Je Gruppe und Zeitpunkt sind sechs biologische Replikate ($N = 6$) als schwarzer Kreis (WIS) und rotes Quadrat (SHR) abgebildet. Verbunden sind die arithmetischen Mittelwerte. Gruppenvergleiche zwischen WIS, SHR und innerhalb der einzelnen Gruppen wurden mittels *two-way ANOVA* und *Šidák's multiple comparisons test* geprüft und sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben. **B und C** Dargestellt sind die FCs für WIS (schwarzer Kreis) und SHR (rotes Quadrat) sowie deren 95 %-KI (Fehlerbalken) bezogen auf ein Alter von 6 Wochen (gestrichelte Linie). Gruppenvergleiche zu einem Alter von 6 Wochen sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben. **D** Dargestellt sind die einzelnen ΔC_T -Werte an den Altersstufen 6, 12, 22 und 30 Wochen. Ab einem Alter von 6 Wochen erhielt die Gruppe der SHR-Läufer die Möglichkeit zur körperlichen Aktivität. Je Gruppe und Zeitpunkt sind ab einem Alter von 12 Wochen sechs biologische Replikate ($N = 6$) als violetter Kreis (SHR-Kontrolle) und blaues Quadrat (SHR-Läufer) abgebildet. Verbunden sind die arithmetischen Mittelwerte. Gruppenvergleiche zwischen SHR-Kontrolle, SHR-Läufer und innerhalb der einzelnen Gruppen wurden mittels *two-way ANOVA* und *Šidák's multiple comparisons test* geprüft und sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben. **E und F** Dargestellt sind die FCs für SHR-Kontrolle (violetter Kreis) und SHR-Läufer (blaues Quadrat) sowie deren 95 %-KI (Fehlerbalken) bezogen auf das 6 Wochen alte Startkollektiv (gestrichelte Linie). Gruppenvergleiche zu einem Alter von 6 Wochen sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben.

3.2.11 Altersabhängige Expression des Serotonin-Rezeptors-2A

Die Expression des 5-HT_{2A}Rs zeigte über alle Altersstufen hinweg keine signifikanten Gruppenunterschiede zwischen WIS und SHR (6 Wochen: $\Delta\Delta C_T$: 0,91, 95 %-KI: - 0,21 – 2,04, $p = 0,1402$; 30 Wochen: $\Delta\Delta C_T$: - 0,41, 95 %-KI: - 1,53 – 0,71, $p = 0,7433$; 46 Wochen: $\Delta\Delta C_T$: 0,33, 95 %-KI: - 0,79 – 1,45, $p = 0,8458$, s. Abb. 14A). Innerhalb der Gruppe der WIS konnte zwar eine tendenzielle Abnahme der Expression verzeichnet werden, die jedoch nicht signifikant ausfiel (30 Wochen: $\Delta\Delta C_T$: - 0,92, 95 %-KI: - 2,00 – 0,15, $p = 0,0985$; 46 Wochen: $\Delta\Delta C_T$: - 1,02, 95 %-KI: - 2,10 – 0,05, $p = 0,0630$, s. Abb. 14B). Bei SHR hingegen kam es bei einem Alter von 30 und 46 Wochen zu einer signifikanten Abnahme der Expression (30 Wochen: FC: 0,21, $\Delta\Delta C_T$: - 2,24, 95 %-KI: - 3,32 – - 1,17, $p = 0,0001$; 46 Wochen: FC: 0,33, $\Delta\Delta C_T$: - 1,61, 95 %-KI: - 2,68 – - 0,53, $p = 0,0035$, s. Abb. 14C).

3.2.12 Altersabhängige Expression des Serotonin-Rezeptors-2B

Die Expression des 5-HT_{2B}Rs zeigte über alle Altersstufen hinweg eine tendenziell geringere Expression in SHR im Vergleich zu WIS, welche bei einem Alter von 30 und 46 Wochen signifikant ausfiel (6 Wochen: $\Delta\Delta C_T$: - 0,61, 95 %-KI: - 1,23 – 0,00, $p = 0,0503$; 30 Wochen: FC: 0,33, $\Delta\Delta C_T$: - 1,58, 95 %-KI: - 2,19 – - 0,96, $p < 0,0001$; 46 Wochen: FC: 0,61, $\Delta\Delta C_T$: - 0,71, 95 %-KI: - 1,33 – - 0,10, $p = 0,0194$, s. Abb. 14D). Innerhalb der Gruppe der WIS zeigten sich keine signifikanten Änderungen in der Expression (30 Wochen: $\Delta\Delta C_T$: 0,41, 95 %-KI: - 0,20 – 1,02, $p = 0,2197$; 46 Wochen: $\Delta\Delta C_T$: - 0,06, 95 %-KI: - 0,67 – 0,55, $p = 0,9635$, s. Abb. 14E). Bei SHR konnten trotz einer anfänglichen Expressionsabnahme keine signifikanten Änderungen in der Expression verzeichnet werden (30 Wochen: $\Delta\Delta C_T$: - 0,55, 95 %-KI: - 1,16 – 0,06, $p = 0,0831$; 46 Wochen: $\Delta\Delta C_T$: - 0,16, 95 %-KI: - 0,77 – 0,45, $p = 0,7845$, s. Abb. 14F).

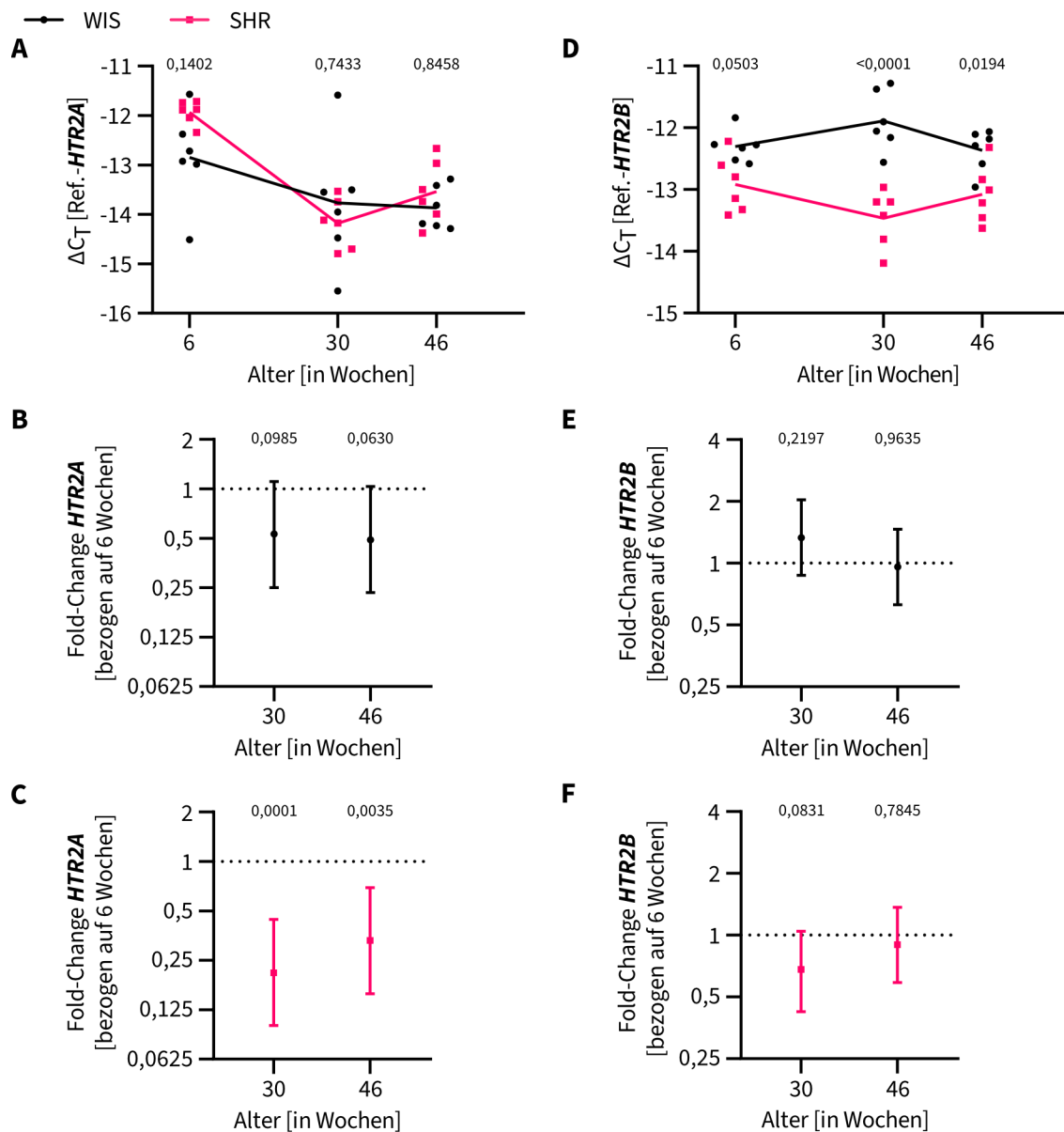


Abbildung 14: Altersabhängige Expression des 5-HT_{2A}Rs und 5-HT_{2B}Rs in WIS und SHR. A-C beziehen sich auf Analysen des 5-HT_{2A}Rs. D-F beziehen sich auf Analysen des 5-HT_{2B}Rs. A und D Dargestellt sind die einzelnen ΔC_T -Werte an den Altersstufen 6, 30 und 46 Wochen. Je Gruppe und Zeitpunkt sind sechs biologische Replikate (N = 6) als schwarzer Kreis (WIS) und rotes Quadrat (SHR) abgebildet. Verbunden sind die arithmetischen Mittelwerte. Gruppenvergleiche zwischen WIS und SHR und innerhalb der einzelnen Gruppen wurden mittels *two-way ANOVA* und *Šídák's multiple comparisons test* geprüft und sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben. B, C, E und F Dargestellt sind die FCs für WIS (schwarzer Kreis) und SHR (rotes Quadrat) sowie deren 95 %-KI (Fehlerbalken) bezogen auf das Startkollektiv mit einem Alter von 6 Wochen (gestrichelte Linie). Gruppenvergleiche zu einem Alter von 6 Wochen sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben.

3.2.13 Zusammenfassung der Expressionsanalysen

Die Expressionsanalysen für WIS und SHR bzw. SHR-Kontrolle und SHR-Läufer werden nachfolgend für jedes zuvor beschriebene Gen zusammengefasst. Eine graphische Zusammenfassung der Expressionsanalysen ist als *Heatmap* dargestellt (s. Abb. 15).

MAOA: WIS als auch SHR zeigten eine signifikante altersabhängige Zunahme der Expression, die in SHR zeitlich früher, mit einem Alter von 30 Wochen, auftrat. Es handelte sich bei den Expressionsveränderungen um die stärksten beobachteten Expressionszunahmen in der Gruppe der WIS und SHR.

Bei SHR-Kontrolle und SHR-Läufer kam es zu einer anfänglichen Abnahme der Expression (signifikant für SHR-Kontrolle bei einem Alter von 22 Wochen). SHR-Läufer zeigten bei einem Alter von 30 Wochen eine signifikante Expressionszunahme.

MAOB: Es konnten abseits einer signifikanten Abnahme der Expression bei 30 Wochen alten SHR keine relevanten Expressionsveränderungen bei WIS und SHR registriert werden. SHR-Kontrolle und SHR-Läufer zeigten eine signifikante Expressionszunahme bei einem Alter von 12 und 22 Wochen, die bei SHR-Kontrolle auch bei einem Alter von 30 Wochen persistierte.

SLC6A4: Bei WIS konnte an allen Altersstufen eine signifikant höhere Expression im Vergleich zu SHR festgestellt werden. Die Expression nahm bei 46 Wochen alten WIS und SHR signifikant ab. Es handelte sich um die stärkste beobachtete Expressionsabnahme in der Gruppe der WIS und SHR.

Bei SHR-Kontrolle und SHR-Läufer konnte hingegen eine signifikante Expressionszunahme beobachtet werden, die bei SHR-Läufern altersabhängig abnahm und lediglich bei einem Alter von 12 und 22 Wochen signifikant ausfiel.

ALDH2: Die Expression lag bei 30 Wochen alten SHR signifikant unter dem Niveau der WIS, was sich bei einem Alter von 46 Wochen umkehrte. Die Expressionsabnahme war bei 46 Wochen alten WIS signifikant.

SHR-Kontrolle und SHR-Läufer zeigten hingegen eine anfängliche signifikante Abnahme, die sich an der letzten Altersstufe bei 30 Wochen umkehrte und bei SHR-Läufer signifikant höher ausfiel.

CAT: Bei SHR konnte an allen Altersstufen eine signifikant höhere Expression im Vergleich zu WIS festgestellt werden. Bei SHR zeigte sich im zeitlichen Verlauf kein signifikanter Unterschied, wohingegen 46 Wochen alte WIS eine signifikante Expressionszunahme aufwiesen.

Es kam zu einer signifikanten Expressionsabnahme bei SHR-Kontrolle (12 und 22 Wochen) und SHR-Läufer (alle Altersstufen).

HTR2A: Es lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen WIS und SHR vor. Lediglich in SHR konnte eine signifikante Expressionsabnahme bei einem Alter von 30 und 46 Wochen aufgezeigt werden.

HTR2B: Die Expression lag bei 30 Wochen alten WIS signifikant höher als bei SHR. Darüber hinaus zeigten sich keine signifikanten Unterschiede innerhalb der WIS- und SHR-Gruppe.

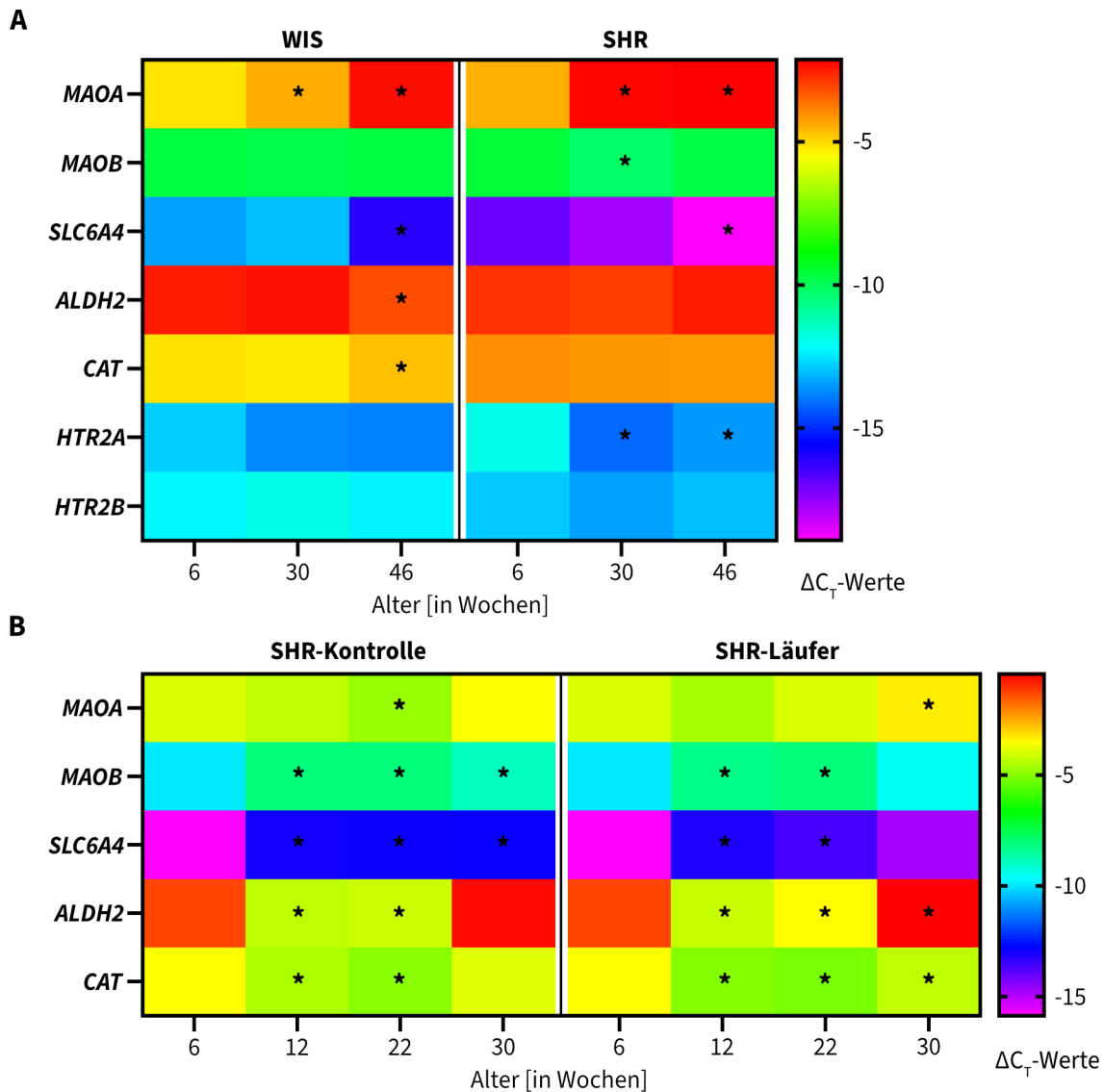


Abbildung 15: Heatmap-Diagramm der Expressionsanalysen im Herzgewebe. **A** Dargestellt ist der altersabhängige Verlauf der Genexpression bei WIS und SHR. **B** Dargestellt ist der altersabhängige Verlauf der Genexpression bei SHR-Kontrolle und SHR-Läufer. **A und B** Dargestellt sind die als Farbcode kodierten arithmetischen Mittelwerte der ΔC_T -Werte von sechs biologischen Replikaten ($N = 6$) je Gen (Y-Achse) und Altersstufe (X-Achse). Unterschiede in der relativen Genexpression über die Zeit können dem Farbcode entnommen werden. Niedrige ΔC_T -Werte entsprechen einer abnehmenden Expression, hohe ΔC_T -Werte zeigen dementsprechend eine zunehmende Expression an. Die Zuteilung der Farben zu den entsprechenden ΔC_T -Werten ist der rechtsstehenden Legende zu entnehmen. Gruppenvergleiche innerhalb der einzelnen Gruppen wurden stets in Bezug zum 6 Wochen alten Startkollektiv mittels *two-way ANOVA* und *Šidák's multiple comparisons test* geprüft. Signifikante Ergebnisse (p -Wert $< 0,05$) sind als Stern (*) markiert angegeben.

4 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden nachfolgend anhand der zwei Abschnitte, die sich aus der Gliederung der Ergebnisse ergeben, diskutiert und in Bezug zum aktuellen Forschungsstand gesetzt.

4.1 Abschnitt 1: *in-vitro*-Versuche

Der erste Abschnitt der Arbeit beschäftigte sich überwiegend mit Untersuchungen an isolierten KMZ von WIS. Zu Beginn wurden die Protein- und cDNA-Konzentrationen der MAOs im Herzen bestimmt. Im Anschluss wurde der Einfluss von Serotonin auf die Kontraktilität isolierter KMZ untersucht. Darüber hinaus erfolgte die Quantifizierung von Wasserstoffperoxid an isolierten Mitochondrien unter dem Einfluss von Serotonin.

4.1.1 Dominanz der Monoaminoxidase-A im Rattenherz

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass MAO-A die dominierende Isoform der MAOs im Rattenherz von WIS, sowohl auf Ebene der Proteine (Western Blot) als auch auf Ebene der RNA (qPCR), darstellt (s. Abb. 6). Unterschieden wurde der Proteingehalt im Herzgewebe und in isolierten KMZ. Lebergewebe diente als Positivkontrolle, da dort ein Vorkommen beider Isoformen bekannt ist.¹³⁴ Die Banden für MAO-A und MAO-B konnten jeweils bei ca. 60 kDa detektiert werden, was dem beschriebenen Molekulargewicht beider Isoformen entspricht.⁷ Es zeigte sich, dass der Proteingehalt von MAO-A im Herzgewebe und in KMZ überwiegt. Für MAO-B konnte lediglich ein schwacher Nachweis im Herzgewebe erfolgen. MAO-B scheint demnach als Protein in KMZ, zumindest im Rahmen der Nachweisgrenze des durchgeführten Western Blots, nicht vorzukommen. Der schwache Nachweis im Herzgewebe steht vermutlich im Zusammenhang mit nicht-kardiomyozytären Zellen. Auf Genexpressionsebene kam es zu einem signifikanten Unterschied zwischen MAO-A und MAO-B im Herzgewebe. Im Einklang mit der bisherigen Literatur konnte somit auch für die WIS-Kohorte, welche die Grundlage dieser Arbeit darstellte, eine Dominanz der MAO-A im Herzen als auch in isolierten KMZ bestätigt werden.^{38,90} Interessanterweise konnte in Mäusen eine kardiale Dominanz für MAO-B festgestellt werden, wohingegen eine äquivalente Expression beider Isoformen im humanen Herzen beschrieben wurde.^{66,132}

4.1.2 Abnahme der kontraktiven Funktion von Kardiomyozyten unter Einfluss von Serotonin

Der Einfluss von Serotonin auf die Kontraktilität isolierter KMZ von WIS wurde in zwei getrennten Versuchen hinsichtlich einer zeitlichen Komponente untersucht. Unterschieden wurden einerseits kurzfristige Effekte von Serotonin, die im Bereich weniger Minuten lagen und andererseits langfristige Effekte, die den Einfluss von Serotonin über einen Zeitraum von 20 bis 24 Stunden abbildeten. Die Wirkung von Serotonin auf KMZ kann auf vielfältige Weise erfolgen. Unterschieden werden muss die extrazelluläre Rezeptor-vermittelte Wirkung über 5-HTR von einer intrazellulären MAO-A-vermittelten Wirkung durch die Entstehung reaktiver Abbauprodukte. Bereits im Jahre 1967 konnten Buccino *et al.* einen positiven inotropen Effekt durch Serotonin auf isolierte Papillarmuskel von Katzen und Hunden beobachten.¹⁸ Mehrere Untersuchungen belegten ebenfalls einen positiven inotropen Effekt von Serotonin auf KMZ des linken Vorhofes von Ratten, der vermutlich durch eine Rezeptor-vermittelte Wirkung über 5-HTR zu Stande kam.^{10,74} Auf KMZ aus Papillarmuskeln der Ratte konnte ein positiver inotroper Effekt hingegen nicht festgestellt werden.⁷⁴ Unter pathophysiologischen Bedingungen scheint es jedoch einen positiven inotropen Effekt auf KMZ der Ratte zu geben: Birkeland *et al.* konnten an ventrikulären KMZ aus einem Herzinsuffizienzmodell einen Effekt über 5-HT₄R nachweisen.¹³ Neben den Einflüssen auf die Kontraktilität existieren auch weitere 5-HTR, die über G-Proteingekoppelte Mechanismen eine kardiomyozytäre Hypertrophie bewirken können.⁴⁸

Interessanterweise stehen die beschriebenen prokontraktilen Effekte von Serotonin auf ventrikuläre KMZ im Widerspruch zu denen in dieser Arbeit beobachteten kurzfristigen Effekten von Serotonin. Im Gegensatz zu einer positiven Inotropie konnte unter Einfluss von Serotonin eine Abnahme der Inotropie (in Form einer reduzierten relativen Zellverkürzung) registriert werden, die keine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung zeigte. So führte kurzzeitige Inkubation mit Serotonin in aufsteigenden Konzentrationen (0,1 µM, 1 µM, 10 µM) zu einer relevanten Abnahme der relativen Zellverkürzung im Vergleich zur Kontrollgruppe um jeweils 10 % (nicht signifikant), 14 % und 14 % (s. Abb. 7A). Betrachtet man die Rezeptor-unabhängigen Effekte von Serotonin auf KMZ, so wäre eine Abnahme der kontraktiven Funktion durch die schädigende Wirkung der MAO-A-Metabolite zu erklären. Bianchi *et al.* konnten bereits im Jahr 2005 zeigen, dass Serotonin den intrazellulären oxidativen Stress MAO-A-vermittelt erhöht und dadurch zur Apoptose von KMZ beitragen kann.¹¹ In der erwähnten Studie von Bianchi *et al.* wurde die kontraktile Funktion der KMZ nicht untersucht, aber die Aktivierung einer proapoptotischen Kaskade

aufgezeigt. Eine Verbindung zwischen erhöhter MAO-A-Aktivität und zunehmendem Zelltod konnte auch von Santin *et al.* an KMZ der Maus nachgewiesen werden. Das Autorenteam sprach in diesem Zusammenhang von der sog. MAO-A/H₂O₂-Achse.¹¹⁷ Ausgehend hiervon darf eine konsekutive Schädigung des kontraktiven Apparates angenommen werden, die letztlich in einer Abnahme der Kontraktilität resultiert. Dass ROS in der Lage sind, Proteine des kontraktiven Apparates zu schädigen, konnte durch Menazza *et al.* an einem Tiermodell mit muskulärer Dystrophie belegt werden.⁹² Um mögliche MAO-A-vermittelte Effekte von Serotonin aufzuzeigen, wurde in unseren Untersuchungen den aufsteigenden Konzentrationen an Serotonin (0,1 µM, 1 µM, 10 µM) der spezifische MAO-A-Inhibitor Clg in einer Konzentration von 1 µM zugegeben. Hierunter zeigte sich die relative Zellverkürzung weiterhin um, im Vergleich zur Kontrollgruppe, jeweils 25 %, 18 % und 19 % reduziert (s. Abb. 7A). Die relative Zellverkürzung fiel bei einer Konzentration von 0,1 µM Serotonin und 1 µM Clg im Vergleich zur alleinigen Gabe von 0,1 µM Serotonin signifikant um 16 % geringer aus. In Anbetracht unserer Ergebnisse kann eine MAO-A-vermittelte Abnahme der kontraktiven Funktion durch kurzfristige Inkubation mit Serotonin nicht angenommen werden. Möglicherweise ist der Effekt durch einen bisher nicht beschriebenen 5-HTR zu erklären. Im kardiovaskulären System sind derzeit sieben Typen von 5-HTR hinsichtlich ihrer Funktion charakterisiert worden.⁶⁸ Es ist zum aktuellen Zeitpunkt jedoch kein 5-HTR beschrieben, der eine Verminderung der Kontraktilität bei ventrikulären KMZ bewirken könnte.⁶⁸ Andererseits muss auch unser Versuchsprotokoll insofern hinterfragt werden, als dass die Zugabe von Serotonin lediglich wenige Sekunden nach der von Clg erfolgt ist. Betrachtet man die Untersuchungen von Bianchi *et al.*, so wurde dort eine Latenz von 30 Minuten zwischen der Behandlung mit Clg und der Intervention gewählt.¹¹ Pönicke *et al.* untersuchten Homogenate von Mausherzen mit einer Latenz von 60 Minuten nach der Inkubation mit Clg.¹⁰⁶ Eine Ausweitung der zeitlichen Latenz wie in den obigen Beispielen, könnte Rückschlüsse auf den Einfluss der MAO-A geben. Eine MAO-A-vermittelte Abnahme der kontraktiven Funktion müsste jedoch mit einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung einhergehen. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich eine solche Beziehung, zumindest auf Ebene der kurzfristigen Effekte, nicht ableiten. Betrachtet man die Effekte einer langfristigen Inkubation mit Serotonin über 20 bis 24 Stunden auf die kontraktive Funktion von KMZ, so zeigte sich hier keine signifikante Abnahme der relativen Zellverkürzungen für eine Konzentration von 0,1 µM, 1 µM und 10 µM Serotonin (s. Abb. 7B). Eine Konzentration von 100 µM Serotonin führte jedoch zu einer signifikanten Reduktion der relativen Zellverkürzung um 55 % im Vergleich zur

Kontrollgruppe. Zur Überprüfung eines MAO-A-vermittelten Effekts erfolgte die Zugabe von 1 μ M Clg. Hierunter zeigte sich eine Normalisierung der relativen Zellverkürzung bis auf das Niveau der Kontrollgruppe. Bezugnehmend auf die zuvor berichteten Ergebnisse von Bianchi *et al.* und Santin *et al.* kann ein MAO-A-vermittelter Effekt angenommen werden.^{11,12,117} Serotonin ist demnach in der Lage die kontraktile Funktion von KMZ, zumindest bei langfristiger Inkubation, MAO-A-abhängig zu schädigen.

4.1.3 Serotonin bewirkt eine Monoaminoxidase-A-vermittelte Produktion von Wasserstoffperoxid

Da in den vorherigen Kontraktionsversuchen eine MAO-A-vermittelte Abnahme der kontraktilen Funktion durch Serotonin, zumindest bei einer langfristigen Inkubation, gezeigt werden konnten, galt es den direkten Nachweis einer ROS-Produktion (bzw. Wasserstoffperoxid als spezifischen MAO-A-Metaboliten) durch Serotonin und deren Reversibilität durch MAO-A-Inhibition mittels Clg zu bestätigen. Die mitochondriale Dysfunktion unter Gabe von MAO-Substraten konnte bereits an isolierten Mitochondrien aus Hirngewebe demonstriert werden.²⁷ In unseren Versuchen wurden isolierte Mitochondrien aus Herzgewebe mit Serotonin in aufsteigenden Konzentrationen mit und ohne spezifische MAO-A-Inhibition mittels Clg inkubiert. Es konnte ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Wasserstoffperoxid-Produktion durch Serotonin gezeigt werden, der unter der Gabe von Clg sistierte (s. Abb. 8). Die von Santin *et al.* postulierte MAO-A/H₂O₂-Achse darf somit auch auf kardiale Mitochondrien der Ratte erweitert werden, da unsere Versuche einen direkten Nachweis einer MAO-A-vermittelten Produktion von Wasserstoffperoxid durch die Metabolisierung von Serotonin an isolierten kardialen Mitochondrien erbrachten.¹¹⁷ In diesem Zusammenhang lassen sich auch die Ergebnisse der Kontraktionsversuche unter langfristiger Serotonininkubation einordnen.

4.2 Abschnitt 2: *in-vivo*-Versuche

Der zweite Abschnitt bestand aus Expressionsanalysen von Serotoninstoffwechsel-assoziierten Enzymen im Herzgewebe von WIS und SHR. Untersucht wurden altersabhängige Veränderungen in der Expression. Darüber hinaus untersuchten wir den Einfluss von körperlicher Aktivität bei SHR.

4.2.1 Tiermodell zur Erfassung altersabhängiger Effekte, dem Einfluss arterieller Hypertonie und körperlicher Aktivität

Die Grundlage der Erfassung altersabhängiger Effekte auf die Expression Serotoninstoffwechsel-assoziiierter Enzyme waren konservierte Proben aus Herzgewebe von WIS und SHR verschiedenen Alters. SHR werden als Tiermodell bereits seit den 1960iger Jahren eingesetzt.¹⁰⁰ Es handelt sich hierbei um eine Züchtung hypertensiver Ratten, die im zeitlichen Verlauf eine hypertensive Herzschädigung erleiden.^{8,100} Der Entwicklungsverlauf wird in eine prähypertensive und hypertensive Phase unterteilt, wobei der Übergang bei einem Alter von ca. 12 Wochen liegt.³⁷ Unsere Probenentnahme bei WHR und SHR mit einem Alter von 6, 30 und 46 Wochen wurde so gewählt, dass die verschiedenen Phasen der Hypertonie-bedingten Herzschädigung abgebildet wurden. Demnach kann für das Startkollektiv der 6 Wochen alten SHR eine normo- bis prähypertensive Phase angenommen werden, welche bei einem Alter von 30 Wochen bereits zu einer manifesten Hypertonie führte und letztlich bei 46 Wochen in einer hypertensiven Herzschädigung resultierte. Messungen des Blutdruckes als auch echokardiographische Untersuchungen, die in unserer Arbeitsgruppe an anderen Tierkollektiven ähnlichen Alters durchgeführt wurden, bestätigen diese Annahme.¹²⁷

Der Einfluss sportlicher Aktivität wurde ermöglicht, indem SHR ab einem Alter von 6 Wochen über Nacht ein Laufrad in den Käfig gestellt bekamen. Die Methode wurde bereits zuvor mehrmals in der Arbeitsgruppe angewendet und hinsichtlich einer hypertensiven Herzschädigung evaluiert.^{28,67,124} Trotz einer guten systolischen Herzfunktion konnte in der Gruppe der SHR-Läufer im Vergleich zur SHR-Kontrolle eine kardiale Hypertrophie, kardiale Fibrose und ein Anstieg der Expression des ANPs verzeichnet werden.¹²⁷ Die Ergebnisse von Schreckenber *et al.* deuten darauf hin, dass die Gruppe der SHR-Läufer eine fortgeschrittenere diastolische Herzschädigung aufwiesen als dies in der Kontrollgruppe der Fall war.¹²⁷ Die Probenentnahme in unserer Arbeit erfolgte bei einem Alter von 6, 12, 22 und 30 Wochen, sodass eine gezieltere Beobachtung der Übergangsphase von prähypertensiv zu hypertensiv möglich war.

4.2.2 Expressionsveränderungen der Monoaminoxidase-A, Aldehyddehydrogenase-2 und Katalase

Eine starke altersabhängige Zunahme der Expression der MAO-A in Herzen von Sprague-Dawley-Ratten wurde bereits im Jahr 2003 durch Maurel *et al.* demonstriert: Der Proteinnachweis der MAO-A lag bei einem Alter von 6 Monaten 4-fach höher, und bei 24

Monaten 6-fach höher, als im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einem Alter von einem Monat.⁹⁰ MAO-A konnte darüber hinaus als eines der am meisten hochregulierten Gene in verschiedenen Tiermodellen mit kardialer Dysfunktion wie Volumenbelastung^{59,103}, Druckbelastung⁷² oder Ischämie-Reperfusion⁶⁴ beobachtet werden. An transgenen Mäusen mit Herz-spezifischer MAO-A-Überexpression konnte der direkte Nachweis einer mitochondrialen Dysfunktion in Folge der entstehenden ROS erbracht werden.¹⁴⁷ Die Zunahme der Expression von MAOs ist auch im zentralen Nervensystem (ZNS) beschrieben und steht im Zusammenhang mit Zellalterung und neurodegenerativen Erkrankungen.^{47,122} Eine ähnlich hohe altersabhängige Zunahme der Expression wie von Maurel *et al.* beschrieben, konnten auch wir in dieser Arbeit auf Genexpressionsebene registrieren. WIS zeigten eine 1,65-fach bzw. 7,06-fach höhere Expression bei einem Alter von 30 bzw. 46 Wochen. SHR zeigten bereits eine 4,80-fach höhere Expression bei einem Alter von 30 Wochen und verblieben mit einer 4,96-fach höheren Expression bei einem Alter von 46 Wochen auf einem ähnlichen Niveau (alle in Bezug auf ein Alter von 6 Wochen, s. Abb. 9). Ob es sich bei der Hochregulierung um einen adaptiven oder maladaptiven Prozess handelt, ist bisher unklar. Bemerkenswert erscheint, dass verschiedenste kardiale Stressoren wie Alter und Druckbelastung zu einem deutlichen Anstieg der Expression führen.^{72,90} Beide Stressoren, Alter und Druckbelastung, vereinen sich in der Gruppe der SHR, was deren signifikant früheren Anstieg bei einem Alter von 30 Wochen erklären könnte. Ungeachtet dessen erreichten WIS und SHR bei einem Alter von 46 Wochen ein ähnliches Expressionsniveau, obwohl es sich um pathophysiologisch unterschiedliche Kohorten handelte. Eine mögliche Erklärung für den altersabhängigen Anstieg der MAO-A könnte sich aus einem vermehrten Angebot der MAO-A-abhängigen Substrate (v.a. Serotonin und Noradrenalin) ergeben. Eine Aktivierung der sympathischen Herznervation mit einem vermehrten Angebot an Katecholaminen ist unter pathophysiologischen Umständen des Herzens bekannt.⁴⁶ Für Serotonin konnte darüber hinaus eine Korrelation zwischen der Serumkonzentration und der linksventrikulären Hypertrophie festgestellt werden.¹¹² Ebenso konnten erhöhte Konzentrationen von Noradrenalin in humanen Serumproben gesunder Erwachsener fortgeschrittenen Alters beobachtet werden.¹¹⁹ Die beschriebenen Ergebnisse zeigen demnach, dass einerseits eine pathophysiologische Herzschädigung in der Lage ist das Substratangebot an Katecholaminen zu erhöhen, wobei andererseits auch fortschreitendes Alter dazu führen kann. Ein vermehrtes Substratangebot könnte demnach eine Geninduktion der MAO-A mit konsekutiver Expressionszunahme bewirken.

Wäre das erhöhte Substratangebot der Grund für die altersabhängige Zunahme der MAO-A-Expression, so wäre auch eine kompensatorisch höhere Expression der nachgeschalteten Enzyme ALDH2 und Katalase erwartbar, sofern es sich um einen adaptiven Prozess handelt. Hahnova *et al.* konnten in hypoxischen KMZ von SHR einerseits eine Zunahme der Expression der MAO-A und andererseits auch eine Zunahme der Expression der ALDH2 und Katalase aufzeigen.⁵⁶ Aus Versuchen von Chen *et al.* ist bekannt, dass die Aktivierung der ALDH2 zu einem geringeren postischämischen Schaden am Herzen führt, sodass eine Steigerung der Expression durchaus als protektiver Faktor betrachtet werden kann.²³ Ebenso konnte eine Expressionssteigerung der Katalase in Folge von erhöhtem oxidativem Stress beobachtet werden.³⁶ Die zuvor beschriebenen Beobachtungen sprechen für die Fähigkeit von KMZ die Expression der protektiven Enzyme ALDH2 und Katalase in bestimmten Situationen mit erhöhtem Auftreten von ROS bzw. Aldehyden zu steigern. In unseren Versuchen konnten wir lediglich eine geringe altersabhängige Zunahme der Expression der Katalase bei 46 Wochen alten WIS nachweisen, wohingegen SHR keine Expressionsveränderungen aufzeigten (s. Abb. 13). Für ALDH2 zeigte sich sogar bei 46 Wochen alten WIS eine geringe Expressionsabnahme und bei SHR eine leichte, jedoch nicht signifikante, Zunahme (s. Abb. 12). Villeneuve *et al.* konnten in einem transgenen Mausmodell mit herzspezifischer Überexpression der MAO-A eine Abnahme der Expression der Katalase beobachten, wohingegen es zu einer Zunahme der Expression der Glutathionperoxidase kam.¹⁴⁷ Möglicherweise wird unter hoher Expression der MAO-A anfallendes Wasserstoffperoxid vermehrt durch die Glutathionperoxidase und weniger durch die Katalase abgebaut. Für die MAO-A-vermittelte Produktion von Aldehyden ist es unwahrscheinlich, dass abseits der ALDH2 weitere Enzyme in den Abbau involviert sind. Es sind zwar weitere Isoformen beschrieben, jedoch stellt die ALDH2 die dominante Isoform im Herzen dar.³ Für die von uns untersuchte Kohorte lässt sich zusammenfassen, dass die erhöhte Expression der MAO-A im Alterungsprozess von WIS und SHR nicht mit einer relevant kompensatorischen Erhöhung der ALDH2 und Katalase einhergeht und demnach tendenziell einen maladaptiven Prozess darstellt.

4.2.3 Expressionsveränderung der Monoaminoxidase-A, Aldehyddehydrogenase-2 und Katalase unter Einfluss körperlicher Aktivität

Körperliche Aktivität wird regelhaft mit positiven kardialen Effekten assoziiert und ist in der ESC-Leitlinie zur Arteriellen Hypertonie aus dem Jahr 2018 unter dem Begriff der *lifestyle interventions* als Grundbaustein der Therapie subsumiert.¹⁵³ Dennoch liegen

Hinweise für einen schädigenden Einfluss unter manifester arterieller Hypertonie im Tierversuch mit SHR vor.^{124,127} Es existieren bisher nur wenige Untersuchungen über den Einfluss auf die Expression der MAO-A, ALDH2 und Katalase. Rupp *et al.* konnten eine Abnahme der MAO-A-Aktivität bei SHR nach 6-wöchiger körperlicher Aktivität in Form von Schwimmen feststellen.¹¹⁴ Kavazis *et al.* konnten eine Abnahme von MAO-A auf Proteinebene nach einwöchiger Laufbandbelastung bestätigen.⁶⁹ In beiden Fällen erfolgten die Versuche jedoch nicht an SHR. Unsere Ergebnisse zeigen, dass körperliches Training bei SHR keine Reduktion der MAO-A bewirkte. Im Gegenteil konnten wir feststellen, dass es bei 22 Wochen alten SHR-Läufer zu einer signifikant höheren MAO-A-Expression als bei SHR-Kontrolle gekommen ist (1,72-fach höhere Expression, s. Abb. 9D). An anderen Zeitpunkten konnten wir jedoch keine signifikanten Gruppenunterschiede zwischen der Kontroll- und Interventionsgruppe feststellen. Es erscheint demnach möglich, dass die Expression der MAO-A durch körperliche Aktivität beeinflusst wird und in die Übergangsphase von prähypertensiv zu hypertensiv involviert ist. Bezugnehmend auf die Ergebnisse von Schreckenber *et al.*¹²⁷ könnten demnach negative kardiale Effekte bei SHR-Läufer MAO-A-vermittelt sein.

Wir konnten darüber hinaus keinen Einfluss körperlicher Aktivität auf die Expression der ALDH2 feststellen (s. Abb. 12D). Ähnliche Beobachtungen machten Campos *et al.* an einer SHR-Kohorte mit 10-wöchiger körperlicher Aktivität in Form von Schwimmen. Sie konnten zwar eine signifikante Abnahme der ALDH2-Aktivität in der Interventionsgruppe nachweisen, auf Proteinebene zeigte sich jedoch kein Unterschied.²¹ Erstaunlich erscheint unsere Beobachtung einer deutlichen Expressionsabnahme bei SHR-Kontrolle und SHR-Läufer bei einem Alter von 12 und 22 Wochen, die erst bei 30 Wochen wieder das Niveau des Startkollektivs erreichte bzw. bei SHR-Läufer signifikant überragte (s. Abb. 12E-F). Da die genannten Veränderungen beide Gruppen gleichermaßen betraf, wurde ein Einfluss der körperlichen Aktivität verworfen. Auch für die Expression der Katalase zeigte sich kein signifikanter Einfluss körperlicher Aktivität (s. Abb. 13D). Ähnlich wie zuvor bei der Expression der ALDH2, konnten wir jedoch eine signifikante Expressionsabnahme bei einem Alter von 12 und 22 Wochen und für SHR-Läufer auch bei 30 Wochen feststellen (s. Abb. 13E-F). Dass körperliche Aktivität durchaus in der Lage sein kann die Proteinkonzentration der Katalase zu erhöhen, zeigten Ferrara *et al.* an einem Tiermodell mit WIS, indem diese ein Laufband zur Verfügung gestellt bekamen⁴⁴. Sie konnten darüber hinaus feststellen, dass es unabhängig der körperlichen Aktivität zu einer altersabhängigen Abnahme kam.⁴⁴ Aufgrund unserer Ergebnisse kommt die Frage auf, weshalb es bei SHR

zu einer frühen Expressionsminderung der ALDH2 und Katalase gekommen ist. Beide Enzyme besitzen nachweislich protektive Eigenschaften und man würde unter vermehrter kardialer Druckbelastung eine kompensatorische Steigerung erwarten.⁵⁶ Eine fehlende Regulation könnte im Rahmen eines *circulus vitiosus* zum Fortschreiten pathophysiologischer Prozesse, wie sie bei SHR regelhaft zu beobachten sind, beitragen.

4.2.4 Expressionsveränderung der Monoaminoxidase-B mit und ohne Einfluss körperlicher Aktivität

Eine Expression der MAO-B konnte von uns bei WIS und SHR nachgewiesen werden (s. Abb. 10). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen WIS und SHR bzw. SHR-Kontrolle und SHR-Läufer, sodass ein relevanter Einfluss einer arteriellen Hypertonie mit und ohne körperliche Aktivität auf die Expression ausgeschlossen werden kann. Die Expression veränderte sich innerhalb der Gruppe der WIS altersabhängig nicht, wohingegen wir in der Gruppe der SHR eine signifikant geringe Minderung bei einem Alter von 30 Wochen erfassen konnten (s. Abb. 10B-C). Eine altersabhängige Zunahme der MAO-B-Expression ist für neuronales Gewebe der Maus im Zusammenhang mit Morbus Parkinson beschrieben worden.⁸⁵ Wie bereits zuvor erläutert, existiert im Herzgewebe der Ratte jedoch eine Dominanz der MAO-A.^{38,90} Dennoch konnten Versuche an einem transgenen Mausmodell mit kardialer Deletion der MAO-B eine Verbesserung der kardialen Funktionsparameter bei druckinduzierter Herzschädigung und bei Ischämie-Reperfusionsschädigung aufzeigen.^{61,65} Die beschriebenen Ergebnisse lassen vermuten, dass in Spezies mit kardialer Dominanz der MAO-B ähnliche Phänomene zu beobachten sind, die im Rattenmodell MAO-A-vermittelt ablaufen.

Trotz der zuvor vermuteten geringen Relevanz der MAO-B im Rattenherz, konnten wir eine signifikante Expressionszunahme bei 12 und 22 Wochen alten SHR unabhängig der körperlichen Aktivität feststellen, die bei SHR-Kontrolle auch bei 30 Wochen alten Tieren fortbestand (s. Abb. 10E-F). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass MAO-B in der Übergangsphase der Entwicklung einer manifesten arteriellen Hypertonie in SHR zumindest latent involviert ist.

4.2.5 Expressionsveränderungen des Serotonin-Transporters mit und ohne Einfluss körperlicher Aktivität

Der Nachweis einer Expression des SERTs in Zellkulturen fetaler Ratten-KMZ konnte bereits im Jahr 2003 durch Sari und Zhou erfolgen.¹²¹ Die Expression in adulten KMZ ist jedoch umstritten. Mekontso-Dessap *et al.* untersuchten Herzgewebe und KMZ adulter

Mäuse und konnten lediglich im Herzgewebe eine Expression des SERTs nachweisen, in dem dieser vermutlich Bestandteil neuronaler und endothelialer Zellen ist.⁹¹ Sonobe *et al.* konnten abseits vom SERT die Bedeutung eines weiteren Monoamin-Transporters (PMAT) bei kardialer Ischämie und Reperfusion an einem Mausmodell bestätigen.¹³⁷ Abseits vom SERT und PMAT scheinen nach Untersuchungen von Gergs *et al.* auch Transporter aus der Gruppe der Organischen-Kationen-Transporter (OCT) in die Aufnahme von Serotonin in KMZ involviert zu sein.⁴⁹ Inwieweit eine Übertragung der obigen Ergebnisse auf adulte ventrikuläre KMZ der Ratte möglich ist, bleibt aktuell ungeklärt. Dennoch liegen Hinweise vor, dass SERT einen Transporter für Serotonin in KMZ der Ratte darstellt: Bianchi *et al.* konnten eine Serotonin-vermittelte zelluläre Hypertrophie bei adulten ventrikulären KMZ der Ratte feststellen, die durch Gabe von Imipramin abgeschwächt wurde.¹² Bei Imipramin handelt es sich um ein trizyklisches Antidepressivum, das auch den SERT hemmt und somit als Therapeutikum bei Depressionen eingesetzt wird.²⁵ Außerdem konnten Bianchi *et al.* eine Serotonin-vermittelte Apoptose von KMZ durch Imipramin inhibieren.¹¹ Die Autoren konnten somit indirekt eine Beteiligung des SERTs aufgrund der Inhibierung mit Imipramin aufzeigen. Die altersabhängige Regulation der Genexpression des SERTs im Herzen wurde bisher noch nicht untersucht. Wir konnten eine deutliche Abnahme der Expression bei 46 Wochen alten WIS und SHR beobachten (s. Abb. 11B-C). Außerdem lag die Expression bei SHR konstant unter dem Niveau der WIS (s. Abb. 11A). Unter der Annahme einer Expression des SERTs in adulten KMZ könnte die starke Abnahme der Expression auf eine verminderte intrazelluläre (intrakardiomyozytäre) Aufnahme von Serotonin hindeuten. Konsekutiv könnte weniger Serotonin durch die MAO-A metabolisiert werden, was insgesamt eine Verminderung der ROS-Produktion bedingen würde. Die deutliche Abnahme der Expression könnte also einen adaptiven Vorgang darstellen, der eine erhöhte intrazelluläre Degradierung von Serotonin verhindert und dadurch oxidativen Stress vermeidet. Obwohl einige Belege für eine kardiomyozytäre Expression des SERTs vorhanden sind, muss hinterfragt werden, ob die erfasste Abnahme der Expression im Herzgewebe die Verhältnisse kardiomyozytärer Zellen valide abbildet. Ebenfalls wäre eine Regulation in nicht-kardiomyozytären Zellen möglich. In einem solchen Fall würde eine Abnahme der Expression des SERTs in nicht-kardiomyozytären Zellen mit einer Erhöhung der extrazellulären Serotoninkonzentration einhergehen, was letztlich die Serotoninexposition für KMZ erhöht. Serotonin könnte abseits des SERTs über PMAT oder OCT intrazellulär aufgenommen und MAO-A-vermittelt abgebaut werden, was in einer erhöhten ROS-Produktion resultiert. Zur Verifizierung dieser Hypothese bedarf es jedoch

weiterer Untersuchungen, die eine Differenzierung der Expression in nicht-kardiomyozytären und kardiomyozytären Zellen ermöglicht.

Wir konnten darüber hinaus einen Einfluss von körperlicher Aktivität auf die SERT-Expression bei SHR nachweisen. Die Expression nahm bei 30 Wochen alten SHR-Läufer im Vergleich zu SHR-Kontrolle signifikant ab (s. Abb. 11D). In beiden Gruppen konnten wir eine deutliche Steigerung bei einem Alter von 12, 22 und bei SHR-Kontrolle auch bei 30 Wochen registrieren (s. Abb. 11E-F). Betrachtet man die vorab diskutierten Ergebnisse von Schreckenber *et al.* (s. Kap. 4.2.1), welche eine fortgeschrittene diastolische Herzschiädigung in der Gruppe der SHR-Läufer propagierten, so lässt die Abnahme der SERT-Expression vermuten, dass eine mögliche kardiale Schädigung tatsächlich über den Serotoninstoffwechsel von nicht-kardiomyozytären Zellen abläuft. Analog der zuvor diskutierten Vermutung bei WIS und SHR bedarf es zur Differenzierung jedoch weiterer Untersuchungen.

4.2.6 Expressionsveränderungen serotonerger Rezeptoren

Abseits einer intrazellulären Aufnahme kann Serotonin auch Rezeptor-vermittelt auf KMZ einwirken (s. Kap. 1.3.1). Wir untersuchten altersabhängige Expressionsveränderungen des 5-HT_{2A}Rs und 5-HT_{2B}Rs in WIS und SHR. Für den 5-HT_{2A}R konnte eine Bedeutung in der Entstehung einer kardialen Hypertrophie nachgewiesen werden.^{75,76} Lairez *et al.* führten Versuche an transgenen Mäusen mit kardialer Deletion der MAO-A durch und beobachteten hierbei eine Steigerung der Expression des 5-HT_{2A}Rs und der extrazellulären Serotinkonzentration.⁷⁵ Spezifische Inhibierung des 5-HT_{2A}Rs konnte eine druckbedingte ventrikuläre Hypertrophie effektiv mindern.⁷⁵ In Folgeversuchen konnten Lairez *et al.* die Ergebnisse bestätigen und wesentliche Bestandteile der Rezeptor-vermittelten Signalkaskade aufdecken.⁷⁶ Eine Zunahme der Expression des 5-HT_{2A}Rs beobachteten Gao *et al.* in humanen Gewebeproben mit kardialer Hypertrophie.⁴⁸ Ebenso konnten sie eine Zunahme im Mausmodell mit induzierter Hypertrophie nachweisen.⁴⁸ Wir konnten in unseren Versuchen eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante, Abnahme der altersabhängigen Expression des 5-HT_{2A}Rs bei WIS beobachten. SHR hingegen zeigten sowohl bei einem Alter von 30 Wochen als auch von 46 Wochen eine signifikante Abnahme der Expression (s. Abb. 14A-C). Unsere Ergebnisse lassen eine relevante Beteiligung des 5-HT_{2A}Rs bei einer fortgeschrittenen hypertensiven Herzschiädigung, analog der beschriebenen Ergebnisse bei kardialer Hypertrophie, nicht vermuten.

Der 5-HT_{2B}R konnte von Nebigil *et al.* als protektiver Faktor für KMZ unter apoptotischen Bedingungen nachgewiesen werden.⁹⁶ Auch in weiteren Untersuchungen konnten die protektiven Eigenschaften des 5-HT_{2B}Rs bestätigt werden.³³ In einem Rattenmodell mit Noradrenalin-induzierter kardialer Hypertrophie registrierten Bai *et al.* eine Steigerung der Expression des 5-HT_{2B}Rs. Allerdings deuten die Ergebnisse darauf hin, dass eine Inhibierung des 5-HT_{2B}Rs mit einer Abnahme der Hypertrophie einhergeht.⁹ Untersuchungen mit herzspezifischer Überexpression des 5-HT_{2B}Rs bestätigten dennoch eine Rezeptor-vermittelte Hypertrophie.⁹⁷ Eine Betrachtung der altersabhängigen Expressionsveränderungen erfolgte bisher nicht. Wir konnten in der Expression des 5-HT_{2B}Rs bei WIS und SHR einen gegensätzlichen Verlauf mit einer signifikant höheren Expression bei 30 Wochen alten WIS feststellen (s. Abb. 14D). Innerhalb der Gruppe der WIS konnte abseits einer nicht signifikanten Expressionserhöhung bei einem Alter von 30 Wochen keine Veränderung registriert werden. SHR zeigten dementsprechend eine nicht signifikante Expressionsminderung bei einem Alter von 30 Wochen (s. Abb. 14E-F). Unsere Beobachtungen können somit einen relevanten altersabhängigen Einfluss auf die Expression des 5-HT_{2B}Rs nicht feststellen.

4.2.7 Zusammenfassung der Expressionsveränderungen

Die starke Zunahme der altersabhängigen Expression der MAO-A konnte unseren Ergebnissen zu Folge nicht durch ein vermehrtes intrazelluläres Substratangebot von Serotonin erklärt werden, da die Expression des SERTs in WIS und SHR gleichermaßen stark vermindert war. Dennoch muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass Serotonin abseits des SERTs über weitere Transporter (u.a. PMAT und OCT) intrazellulär aufgenommen werden kann.^{49,137} Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass Noradrenalin als weiteres spezifisches Substrat der MAO-A eine Steigerung der Expression bedingen könnte.¹⁵⁸ Besonders in Hinblick auf die nur eingeschränkte Regulation der ALDH2 und der Katalase scheint abseits von Serotonin ein weiteres Substrat für die deutliche Zunahme der Expression der MAO-A verantwortlich zu sein. Noradrenalin könnte in diesem Zusammenhang eine größere Bedeutung zu Teil werden, da erhöhte Konzentrationen bei arterieller Hypertonie und im Rahmen des Alterungsprozess festgestellt wurden.^{50,130} Darüber hinaus muss neben der Katalase als abbauendes Enzym von Wasserstoffperoxid die Bedeutung weiterer Enzyme berücksichtigt werden. Aufgrund der Beobachtungen von Villeneuve *et al.* an einem transgenen Mausmodell mit kardialer Überexpression der MAO-A, scheint die Glutathionperoxidase ein vielversprechendes

Enzym zu sein.¹⁴⁷ Bezüglich der Expression des 5-HT_{2A}Rs und des 5-HT_{2B}Rs konnten wir, abseits einer signifikanten Expressionsabnahme des 5-HT_{2A}Rs bei 30 und 46 Wochen alten SHR, keine relevanten Expressionsveränderungen feststellen, sodass deren Einfluss vor allem auf den Alterungsprozess begrenzt erscheint. Eine Übersicht der diskutierten Expressionsveränderungen ist der nachfolgenden Abbildung zu entnehmen (s. Abb. 16).

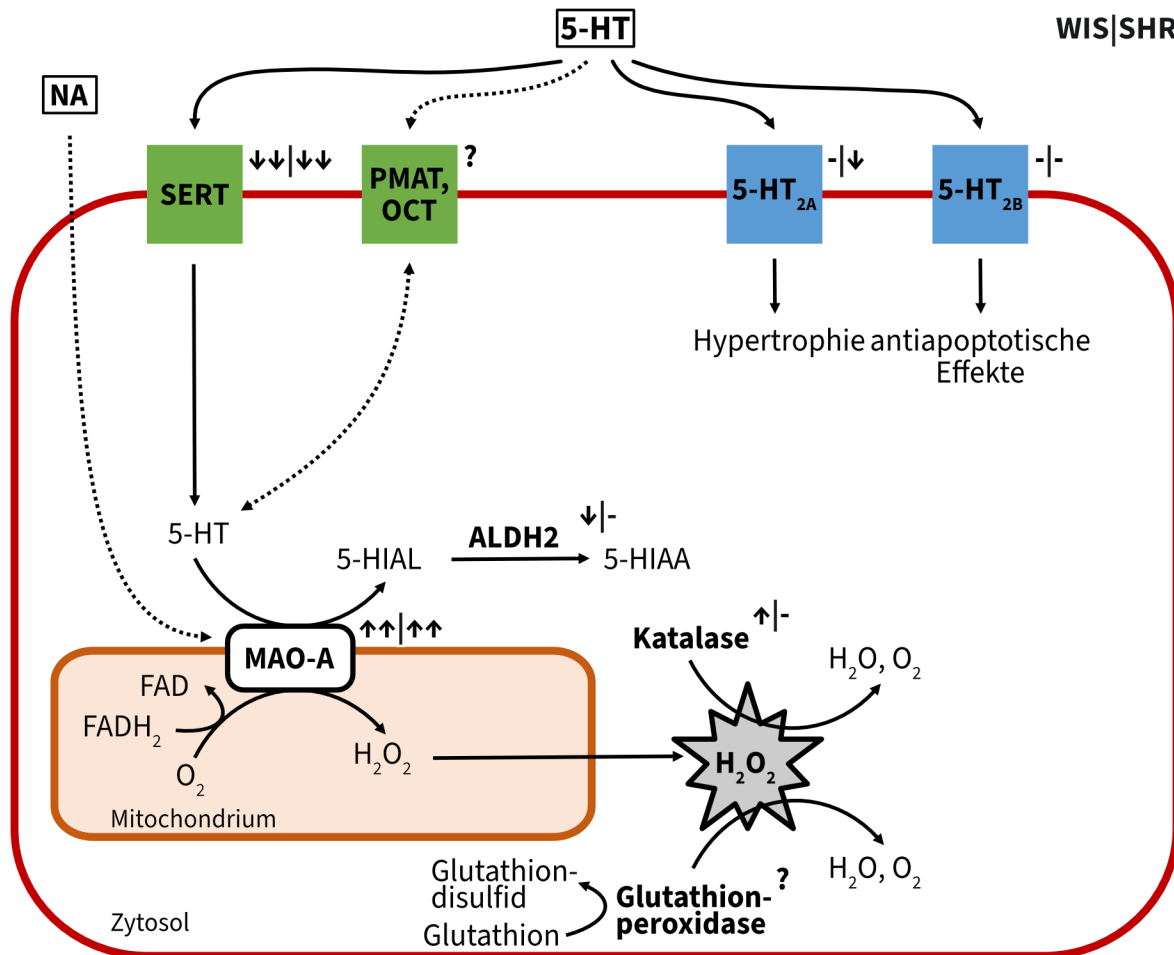


Abbildung 16: Altersabhängige Expressionsveränderungen Serotoninstoffwechsel-assoziiierter Enzyme im Rattenherz. Dargestellt sind die altersabhängigen Expressionsveränderungen der untersuchten Enzyme in einem Übersichtsbild mit nachfolgender Einordnung in den Serotonin- und MAO-A-Stoffwechsel. Die Expressionsveränderungen sind für WIS und SHR als Pfeile angegeben und befinden sich jeweils rechts oben neben den betreffenden Enzymen. Die Unterschiede in der Expression zwischen WIS und SHR sind durch einen Strich getrennt, wobei Pfeile links des Strichs auf WIS bezogen sind und Pfeile rechts des Strichs Expressionsveränderungen in SHR wiedergeben. Die Expressionsveränderungen sind stets in Bezug auf das 6 Wochen alte Startkollektiv gesetzt und entweder als Abnahme (↓), Zunahme (↑) oder keine relevante Veränderung (-) kodiert dargestellt. Sofern keine Expressionsanalyse für ein dargestelltes Element vorliegt, ist dieses mit einem Fragezeichen versehen. Besonders starke Ab- bzw. Zunahmen sind als doppelte Pfeile abgebildet. MAO-A ist bei WIS und SHR stark hochreguliert. Ein vermehrtes Angebot durch Serotonin (5-HT) erscheint aufgrund der deutlichen Abnahme der Expression des SERTs in WIS und SHR unwahrscheinlich. Möglicherweise wird vermehrt Serotonin intrazellulär über weitere Transporter aufgenommen (PMAT und OCT, Expression wurde für die untersuchte Kohorte nicht bestimmt). Ebenfalls von Bedeutung erscheint Noradrenalin (NA), das als spezifisches MAO-A-Substrat durch ein hohes intrazelluläres Angebot eine Steigerung der Expression der MAO-A bedingen könnte. Die

ALDH2 und die Katalase sind in ihrer Expression in WIS und SHR nicht relevant verändert. Es liegen jedoch Hinweise vor, die eine vorrangige Bedeutung der Glutathionperoxidase bei MAO-A-Überexpression nahe legen.¹⁴⁷ Die Glutathionperoxidase (Expression wurde für die untersuchte Kohorte nicht bestimmt) kann anfallendes Wasserstoffperoxid reduzieren, indem Glutathion zu Glutathiondisulfid oxidiert wird.⁸⁶ Darüber hinaus konnten keine relevanten Expressionsveränderungen der beiden Rezeptoren, 5-HT_{2A}R und 5-HT_{2B}R, beobachtet werden.

4.3 Limitationen der Arbeit und Ausblick

Eine wesentliche Limitation der Arbeit stellt die Übertragbarkeit der Expressionsanalysen an Herzgewebeproben auf isolierte KMZ dar. Herzgewebe umfasst neben KMZ eine Vielzahl nicht-kardiomyozytärer Zellen (u.a. Fibroblasten und Endothelzellen). Dennoch sind KMZ für ca. 70 bis 85 % des Herzvolumens von Säugetieren verantwortlich.¹⁶⁰ Somit lassen die Expressionsanalysen nur begrenzten Rückschluss auf die isolierten Abläufe in KMZ zu, da in der qPCR die cDNA-Konzentrationen aller Zellen im Herzgewebe berücksichtigt wurden. Abgesehen von Serotonin deuten unsere Ergebnisse auf die Bedeutung von Noradrenalin als spezifisches Substrat der MAO-A hin. Eine wesentliche Beteiligung von Noradrenalin in die altersabhängige Expressionszunahme der MAO-A lässt sich aus unseren Ergebnissen vermuten. Zur Verifizierung der diskutierten Ergebnisse sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, die Expressionsanalysen an isolierten KMZ einschließen und weitere Enzyme, vor allem solche des Noradrenalin-Stoffwechsels, umfassen. Eine weitere Einschränkung ist außerdem die Vergleichbarkeit der Expressionen in WIS und SHR bzw. SHR-Kontrolle und SHR-Läufer, da die Probenentnahme zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgt war (bei WIS und SHR eines Alters von 6, 30 und 46 Wochen bzw. bei SHR-Kontrolle und SHR-Läufer eines Alters von 6, 12, 22 und 30 Wochen) und es sich hierbei um genetisch differenzierte Kohorten handelte. Eine Anpassung der Zeitpunkte war nicht möglich, da auf bereits bestehende Proben der Arbeitsgruppe zurückgegriffen wurde und ein erneuter Tierversuch im Sinne der 3R-Prinzipien von Russell und Burch ausgeschlossen wurde.¹¹⁵ Eine Einschränkung der Interpretation unserer Ergebnisse wird auch durch die Komplexität der Serotonin-Synthese hervorgerufen. Durch uns wurde vorwiegend die Freisetzung von Serotonin im Rahmen der Hämostase und durch kardiale Endothelzellen betrachtet.^{40,113} Beschrieben ist jedoch auch die Expression Serotonin-synthetisierender Enzyme in KMZ.¹⁰⁶ Die Bedeutung von kardiomyozytär-synthetisiertem Serotonin ist bisher unklar. Es werden para- und autokrine Effekte vermutet, die vermutlich über 5-HTR vermittelt werden. Die Vielzahl von bekannten 5-HTR und die unterschiedlichen Effekte auf verschiedene kardiale Zellen erschweren eine genaue Zuordnung. Auch hier bedarf es weiterer Untersuchungen, die Serotonin-vermittelte Effekte

auf unterschiedliche Zellfraktionen des Herzens untersuchen. Obwohl weiterhin einige Unklarheiten in Bezug auf den kardialen Serotoninstoffwechsel existieren, so belegen auch unserer Untersuchungen, dass MAO-A ein vielversprechendes Ziel pharmakologischer Behandlungen darstellt. Hierzu liegen spezifische Inhibitoren vor, die bereits in verschiedenen Tierversuchen positive Effekte zeigen konnten (s. Kap. 1.3.2). Es gilt nun den grundlagenwissenschaftlichen Ansatz unserer Arbeit auf konkrete Tierversuche auszuweiten und mögliche pharmakologische Ansätze in der ROS-Reduktion zu explorieren.

5 Zusammenfassung

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) haben als Signalmoleküle wichtige Funktionen in der Herzphysiologie. Ein Übermaß führt jedoch zu oxidativem Stress, der sich negativ auf die Zellfunktion auswirkt und zur mitochondrialen Dysfunktion beiträgt. Die Bedeutung von oxidativem Stress konnte bei einer Vielzahl von kardialen Pathologien belegt werden. Monoaminoxidasen (MAO)s sind Enzyme der äußeren mitochondrialen Membran, die am Abbau biogener Amine beteiligt sind. Beim Abbauprozess wird Wasserstoffperoxid, das zu den ROS zählt, freigesetzt und Katalase-vermittelt abgebaut. Das ebenfalls entstehende Amin wird zu einem Aldehyd metabolisiert, welches wiederum durch die Aldehyddehydrogenase 2 (ALDH2) in eine wasserlösliche Säure abgebaut wird. Man unterscheidet zwei Isoformen der MAO, MAO-A und MAO-B, die sich bezüglich ihrer Substratspezifität unterscheiden. Serotonin und Noradrenalin gelten als Hauptsubstrate der MAO-A. Die Expression der beiden Isoformen unterscheidet sich je nach Gewebe und Spezies. Im Rattenherz konnte eine Dominanz der MAO-A nachgewiesen werden. Versuche mit pharmakologischer oder genetischer Inhibition der MAO-A konnten protektive Effekte in Tiermodellen mit kardialer Schädigung aufzeigen. Wir untersuchten den Einfluss von Serotonin auf die Kontraktilität adulter ventrikulärer Kardiomyozyten (KMZ) der Ratte. In diesem Zusammenhang konnten wir eine MAO-A-vermittelte Schädigung bei langfristiger Inkubation mit Serotonin nachweisen. Darüber hinaus zeigen unserer Ergebnisse, dass Serotonin MAO-A-vermittelt zur Erhöhung der Produktion von Wasserstoffperoxid in isolierten kardialen Mitochondrien der Ratte führt. Die Expression der MAO-A nimmt einerseits im Alter und andererseits bei kardialen Erkrankungen wie Herzinsuffizienz oder Ischämie zu. Der Grund der Expressionszunahme ist unklar, weshalb wir die altersabhängige Expression weiterer Serotoninstoffwechsel-assoziiierter Gene bei Wistar-Hannover-Ratten (WIS) und spontan hypertensiven Ratten (SHR) untersuchten. Wir konnten zeigen, dass arterielle Hypertonie und Alter die Expression der MAO-A deutlich erhöhen, wohingegen die ALDH2 als auch die Katalase nicht wesentlich reguliert wurden. Wir konnten ebenfalls zeigen, dass die Expression des spezifischen Serotonin-Transporters (SERT) altersabhängig in WIS und SHR deutlich abnimmt. Serotonin scheint somit nicht in der Lage zu sein, durch hohe intrazelluläre Konzentrationen eine Induktion der Expression der MAO-A zu bewirken. Noradrenalin könnte als weiteres MAO-A-Substrat eine wesentliche Bedeutung in der Expressionszunahme zukommen. Unserer Ergebnisse sprechen dafür, dass es sich bei der Hochregulierung der MAO-A um einen maladaptiven Prozess handelt.

6 Summary

Reactive oxygen species (ROS) play important roles as signaling molecules in regular cardiac physiology. However, excessive ROS lead to oxidative stress, which negatively affects cell function and contributes to mitochondrial dysfunction. Oxidative stress is crucial for the development and progression of many cardiac pathologies. Monoamine oxidases (MAO)s are enzymes located in the outer mitochondrial membrane involved in metabolizing biogenic amines. During this process, hydrogen peroxide is released, which counts as ROS and can be broken down by catalase. The amines are metabolized into aldehydes, which are then processed to water-soluble acids by aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2). MAO-A and MAO-B are two isoforms of MAO with characteristic substrate specificity. Serotonin and norepinephrine are considered the main substrates of MAO-A. The expression of both isoforms varies depending on tissue and species. A dominance of MAO-A has been detected in the rat heart. Experiments with pharmacological or genetic inhibition of MAO-A showed protective effects in animal models with cardiac damage. We investigated the influence of serotonin on the contractility of adult ventricular rat cardiomyocytes and found that long-term incubation with serotonin leads to MAO-A-mediated damage. Furthermore, we showed that serotonin leads to an increase in the production of hydrogen peroxide mediated by MAO-A in isolated cardiac mitochondria of the rat. The expression of MAO-A increases with age and in cardiac diseases such as heart failure or ischemia. The reason for the increase in expression is unclear, which is why we examined the age-related expression of other serotonin metabolism-associated genes in Wistar Hannover rats (WIS) and spontaneously hypertensive rats (SHR). We found that high blood pressure and age significantly increase the expression of MAO-A, while catalase and ALDH2 were not significantly regulated. We also showed that the expression of the specific serotonin transporter (SERT) significantly decreases with age in WIS and SHR. Therefore, serotonin does not appear to induce an increase in the expression of MAO-A through high intracellular concentrations. Norepinephrine could have a significant role in the increase in expression as another MAO-A substrate. Our results suggest that the upregulation of MAO-A is a maladaptive process.

7 Anhang

7.1 Einfluss von Clorgylin auf die Kontraktilität von Kardiomyozyten

Zur Ermittlung der später verwendeten Konzentration von Clg wurde vorab der Einfluss verschiedener Konzentrationen (0,01 – 10 μM) auf die Kontraktilität untersucht. Keine der genannten Konzentrationen konnte die Kontraktionsparameter signifikant beeinflussen. Unter der höchsten Konzentration von 10 μM konnte dennoch eine tendenzielle Abnahme der Kontraktionsparameter registriert werden, sodass für alle folgenden Versuche eine Konzentration von 1 μM Clg festgesetzt wurde.

Tabelle 3: Kontraktionsparameter unter Einfluss von Clg. Dargestellt sind die Mittelwerte der jeweiligen Kontraktionsparameter und deren p-Werte in Bezug zur Kontrollgruppe. Die statistische Testung erfolgte durch Anwendung eines *one-way ANOVAs* mit multiplem Testen unter Tukey-Korrektur. Die Kontrollgruppe wurde durch die äquivalente Zugabe von *Aqua bidest.* definiert.

	Kontraktions- geschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)	Relaxations- geschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)	mittlere Verkürzungs- geschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)	relative Zell- verkürzung (%)
Kontrolle	192,89	183,73	64,97	10,29
0,01 μM Clg	198,57 (p = 0,9822)	194,82 (p = 0,8988)	65,28 (p > 0,9999)	10,04 (p = 0,9785)
0,1 μM Clg	198,11 (p = 0,9870)	195,23 (p = 0,8860)	64,93 (p > 0,9999)	10,81 (p = 0,7306)
1 μM Clg	211,03 (p = 0,4074)	208,99 (p = 0,2519)	68,56 (p = 0,8059)	10,59 (p = 0,9544)
10 μM Clg	187,03 (p = 0,9801)	170,61 (p = 0,8275)	60,66 (p = 0,6775)	9,89 (p = 0,8802)

7.2 Weitere Kontraktionsparameter zum Einfluss von Serotonin auf die Kontraktilität von Kardiomyozyten

Der Einfluss von Serotonin auf die Kontraktilität wurde hinsichtlich kurzfristiger und langfristiger Effekte untersucht. Die Ergebnisse in Bezug auf die relative Zellverkürzung sind in Kap. 3.1.2 dargestellt. Abseits der relativen Zellverkürzung wurden weitere Parameter erfasst (u.a. Kontraktionsgeschwindigkeit, Relaxationsgeschwindigkeit und mittlere Verkürzungsgeschwindigkeit), die in den folgenden Tabellen dargestellt werden.

Tabelle 4: Weitere Kontraktionsparameter unter kurzfristigem Einfluss von Serotonin und Clg. Dargestellt sind die Mittelwerte der jeweiligen Kontraktionsparameter und deren p-Werte in Bezug zur Kontrollgruppe. Die statistische Testung erfolgte durch Anwendung eines *one-way ANOVAs* mit multiplem Testen unter Tukey-Korrektur. Die Kontrollgruppe wurde durch die äquivalente Zugabe von *Aqua bidest.* definiert.

	Kontraktions- geschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)	Relaxations- geschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)	mittlere Verkürzungs- geschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)	relative Zell- verkürzung (%)
Kontrolle	196,22	182,27	71,22	9,71
1 μM Clg	199,38 ($p > 0,9999$)	185,12 ($p > 0,9999$)	71,51 ($p > 0,9999$)	10,28 ($p = 0,8472$)
0,1 μM Serotonin	160,76 ($p = 0,0012$)	143,36 ($p = 0,0001$)	58,00 ($p = 0,0004$)	8,72 ($p = 0,1021$)
1 μM Serotonin	161,09 ($p = 0,0014$)	147,41 ($p = 0,0009$)	59,41 ($p = 0,0028$)	8,35 ($p = 0,0036$)
10 μM Serotonin	164,97 ($p = 0,0077$)	150,21 ($p = 0,0036$)	61,08 ($p = 0,0199$)	8,36 ($p = 0,0040$)
0,1 μM Serotonin + 1 μM Clg	145,05 ($p < 0,0001$)	131,22 ($p < 0,0001$)	55,29 ($p = 0,0001$)	7,29 ($p < 0,0001$)
1 μM Serotonin + 1 μM Clg	151,17 ($p = 0,0001$)	135,12 ($p < 0,0001$)	54,62 ($p < 0,0001$)	7,95 ($p = 0,0004$)
10 μM Serotonin + 1 μM Clg	154,52 ($p = 0,0006$)	134,30 ($p < 0,0001$)	58,22 ($p = 0,0040$)	7,84 ($p = 0,0001$)

Tabelle 5: Weitere Kontraktionsparameter unter langfristigem Einfluss von Serotonin und Clg. Dargestellt sind die Mittelwerte der jeweiligen Kontraktionsparameter und deren p-Werte in Bezug zur Kontrollgruppe. Die statistische Testung erfolgte durch Anwendung eines *one-way ANOVAs* mit multiplem Testen unter Tukey-Korrektur. Die Kontrollgruppe wurde durch die äquivalente Zugabe von *Aqua bidest.* definiert.

	Kontraktions- geschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)	Relaxations- geschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)	mittlere Verkürzungs- geschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)	relative Zell- verkürzung (%)
Kontrolle	173,36	144,50	61,35	9,42
1 μM Clg	201,21 ($p = 0,0829$)	181,38 ($p = 0,0062$)	71,03 ($p = 0,0773$)	9,09 ($p = 0,9819$)
0,1 μM Serotonin	176,19 ($p > 0,9999$)	161,61 ($p = 0,5331$)	63,94 ($p = 0,9831$)	9,18 ($p = 0,9941$)
1 μM Serotonin	181,44 ($p = 0,9760$)	159,88 ($p = 0,6573$)	66,79 ($p = 0,6060$)	9,70 ($p = 0,9876$)
10 μM Serotonin	163,55 ($p = 0,9541$)	146,60 ($p > 0,9999$)	58,74 ($p = 0,9878$)	8,93 ($p = 0,8689$)
100 μM Serotonin	87,00 ($p < 0,0001$)	86,00 ($p = 0,0014$)	33,27 ($p < 0,0001$)	4,33 ($p < 0,0001$)
100 μM Serotonin + 1 μM Clg	173,81 ($p > 0,9999$)	159,31 ($p = 0,8689$)	55,87 ($p = 0,8128$)	8,91 ($p = 0,9245$)

8 Literaturverzeichnis

1. Accili EA, Proenza C, Baruscotti M, DiFrancesco D. From Funny Current to HCN Channels: 20 Years of Excitation. *Physiology*. 2002;17(1):32-37. doi:10.1152/physiologyonline.2002.17.1.32
2. Akiyama T. Myocardial interstitial norepinephrine and dihydroxyphenylglycol levels during ischemia and reperfusion. *Cardiovasc Res*. 2001;49(1):78-85. doi:10.1016/S0008-6363(00)00219-4
3. Alnouti Y, Klaassen CD. Tissue Distribution, Ontogeny, and Regulation of Aldehyde Dehydrogenase (Aldh) Enzymes mRNA by Prototypical Microsomal Enzyme Inducers in Mice. *Toxicol Sci*. 2008;101(1):51-64. doi:10.1093/toxsci/kfm280
4. Anderson R, Lagnado A, Maggiorani D, et al. Length-independent telomere damage drives post-mitotic cardiomyocyte senescence. *EMBO J*. 2019;38(5). doi:10.15252/embj.2018100492
5. Aon MA, Cortassa S, O'Rourke B. Redox-optimized ROS balance: A unifying hypothesis. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg*. 2010;1797(6-7):865-877. doi:10.1016/j.bbabi.2010.02.016
6. Arbeitsgemeinschaft Für Neuropsychopharmakologie Und Pharmakopsychiatrie E.V., Arzneimittelkommission Der Deutschen Ärzteschaft, Arzneimittelkommission Der Deutschen Apotheker, et al. *Nationale VersorgungsLeitlinie Unipolare Depression - Langfassung*. Bundesärztekammer (BÄK); Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV); Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF); 2022. doi:10.6101/AZQ/000496
7. Bach AW, Lan NC, Johnson DL, et al. cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties. *Proc Natl Acad Sci*. 1988;85(13):4934-4938. doi:10.1073/pnas.85.13.4934
8. Bagby SP, McDonald WJ, Mass RD. Serial renin-angiotensin studies in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto normotensive rats. Transition from normal to high-renin status during the established phase of spontaneous hypertension. *Hypertension*. 1979;1(4):347-354. doi:10.1161/01.HYP.1.4.347
9. Bai CF, Liu JC, Zhao R, et al. Role of 5-HT_{2B} receptors in cardiomyocyte apoptosis in noradrenaline-induced cardiomyopathy in rats: 5-HT in catecholamine cardiotoxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010;37(7):e145-e151. doi:10.1111/j.1440-1681.2010.05388.x
10. Benfey BG, Cohen J, Kunos G, Vermes-Kunos I. DISSOCIATION OF 5-HYDROXYTRYPTAMINE EFFECTS ON MYOCARDIAL CONTRACTILITY AND CYCLIC AMP ACCUMULATION. *Br J Pharmacol*. 1974;50(4):581-585. doi:10.1111/j.1476-5381.1974.tb08592.x
11. Bianchi P, Kunduzova O, Masini E, et al. Oxidative Stress by Monoamine Oxidase

Mediates Receptor-Independent Cardiomyocyte Apoptosis by Serotonin and Postischemic Myocardial Injury. *Circulation*. 2005;112(21):3297-3305.
doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.528133

12. Bianchi P, Pimentel DR, Murphy MP, Colucci WS, Parini A. A new hypertrophic mechanism of serotonin in cardiac myocytes: receptor-independent ROS generation. *FASEB J*. 2005;19(6):1-15. doi:10.1096/fj.04-2518fje

13. Birkeland JAK, Swift F, Tovsrud N, et al. Serotonin increases L-type Ca²⁺ current and SR Ca²⁺ content through 5-HT₄ receptors in failing rat ventricular cardiomyocytes. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 2007;293(4):H2367-H2376.
doi:10.1152/ajpheart.01375.2006

14. Bortolato M, Chen K, Shih JC. The Degradation of Serotonin: Role of MAO. In: *Handbook of Behavioral Neuroscience*. Vol 21. Elsevier; 2010:203-218.
doi:10.1016/S1569-7339(10)70079-5

15. Bøtker HE, Hausenloy D, Andreadou I, et al. Practical guidelines for rigor and reproducibility in preclinical and clinical studies on cardioprotection. *Basic Res Cardiol*. 2018;113(5):39. doi:10.1007/s00395-018-0696-8

16. Bou-Teen D, Kaludercic N, Weissman D, et al. Mitochondrial ROS and mitochondria-targeted antioxidants in the aged heart. *Free Radic Biol Med*. 2021;167:109-124. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2021.02.043

17. Brattelid T, Winer LH, Levy FO, Liestøl K, Sejersted OM, Andersson KB. Reference gene alternatives to Gapdh in rodent and human heart failure gene expression studies. *BMC Mol Biol*. 2010;11(1):22. doi:10.1186/1471-2199-11-22

18. Buccino R, Covell J, Sonnenblick E, Braunwald E. Effects of serotonin on the contractile state of the myocardium. *Am J Physiol-Leg Content*. 1967;213(2):483-486.
doi:10.1152/ajplegacy.1967.213.2.483

19. Burgoyne JR, Mongue-Din H, Eaton P, Shah AM. Redox Signaling in Cardiac Physiology and Pathology. *Circ Res*. 2012;111(8):1091-1106.
doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.255216

20. Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611-622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797

21. Campos JC, Fernandes T, Bechara LRG, et al. Increased Clearance of Reactive Aldehydes and Damaged Proteins in Hypertension-Induced Compensated Cardiac Hypertrophy: Impact of Exercise Training. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:1-11.
doi:10.1155/2015/464195

22. Castro L, Mialetperez J, Guillemeau A, et al. Differential functional effects of two 5-HT receptor isoforms in adult cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2005;39(2):335-344.
doi:10.1016/j.yjmcc.2005.04.009

23. Chen CH, Budas GR, Churchill EN, Disatnik MH, Hurley TD, Mochly-Rosen D. Activation of Aldehyde Dehydrogenase-2 Reduces Ischemic Damage to the Heart. *Science*. 2008;321(5895):1493-1495. doi:10.1126/science.1158554
24. Chen CH, Sun L, Mochly-Rosen D. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase and cardiac diseases. *Cardiovasc Res*. 2010;88(1):51-57. doi:10.1093/cvr/cvq192
25. Chen NH, Reith MEA, Quick MW. Synaptic uptake and beyond: the sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family SLC6. *Pflügers Arch Eur J Physiol*. 2004;447(5):519-531. doi:10.1007/s00424-003-1064-5
26. Chomeczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162(1):156-159. doi:10.1016/0003-2697(87)90021-2
27. Cohen G, Farooqui R, Kesler N. Parkinson disease: A new link between monoamine oxidase and mitochondrial electron flow. *Proc Natl Acad Sci*. 1997;94(10):4890-4894. doi:10.1073/pnas.94.10.4890
28. da Costa Rebelo RM, Schreckenber R, Schlüter KD. Adverse cardiac remodelling in spontaneously hypertensive rats: acceleration by high aerobic exercise intensity. *J Physiol*. 2012;590(21):5389-5400. doi:10.1113/jphysiol.2012.241141
29. Daniels LB, Maisel AS. Natriuretic Peptides. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50(25):2357-2368. doi:10.1016/j.jacc.2007.09.021
30. Davalli P, Mitic T, Caporali A, Lauriola A, D'Arca D. ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:1-18. doi:10.1155/2016/3565127
31. Deftereos SN, Dodou E, Andronis C, Persidis A. From depression to neurodegeneration and heart failure: re-examining the potential of MAO inhibitors. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2012;5(4):413-425. doi:10.1586/ecp.12.29
32. Deshwal S, Di Sante M, Di Lisa F, Kaludercic N. Emerging role of monoamine oxidase as a therapeutic target for cardiovascular disease. *Curr Opin Pharmacol*. 2017;33:64-69. doi:10.1016/j.coph.2017.04.003
33. Dhaibar HA, Carroll NG, Amatya S, et al. Glucocorticoid Inhibition of Estrogen Regulation of the Serotonin Receptor 2B in Cardiomyocytes Exacerbates Cell Death in Hypoxia/Reoxygenation Injury. *J Am Heart Assoc*. 2021;10(17):e015868. doi:10.1161/JAHA.120.015868
34. Di Lisa F, Giorgio M, Ferdinandy P, Schulz R. New aspects of p66Shc in ischaemia reperfusion injury and other cardiovascular diseases: p66Shc in cardiovascular pathophysiology. *Br J Pharmacol*. 2017;174(12):1690-1703. doi:10.1111/bph.13478
35. Di Lisa F, Kaludercic N, Carpi A, Menabò R, Giorgio M. Mitochondrial pathways for ROS formation and myocardial injury: the relevance of p66Shc and monoamine oxidase. *Basic Res Cardiol*. 2009;104(2):131-139. doi:10.1007/s00395-009-0008-4

36. Dieterich S, Bielick U, Beulich K, Hasenfuss G, Prestle J. Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart: Increased Expression of Catalase in the End-Stage Failing Heart. *Circulation*. 2000;101(1):33-39. doi:10.1161/01.CIR.101.1.33
37. Doggrell S. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res*. 1998;39(1):89-105. doi:10.1016/S0008-6363(98)00076-5
38. Dorris RL. A simple method for screening Monoamine Oxidase (MAO) inhibitory drugs for type preference. *J Pharmacol Methods*. 1982;7(2):133-137. doi:10.1016/0160-5402(82)90025-0
39. Dubois-Deruy E, Peugnet V, Turkieh A, Pinet F. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Antioxidants*. 2020;9(9):864. doi:10.3390/antiox9090864
40. Duerschmied D, Bode C. The role of serotonin in haemostasis. *Hämostaseologie*. 2009;29(04):356-359. doi:10.1055/s-0037-1617140
41. Edmondson DE, Binda C, Wang J, Upadhyay AK, Mattevi A. Molecular and Mechanistic Properties of the Membrane-Bound Mitochondrial Monoamine Oxidases. *Biochemistry*. 2009;48(20):4220-4230. doi:10.1021/bi900413g
42. Edmondson DE, Mattevi A, Binda C, Li M, Hubalek F. Structure and Mechanism of Monoamine Oxidase. *Curr Med Chem*. 2004;11(15):1983-1993. doi:10.2174/0929867043364784
43. Fabbrini G, Abbruzzese G, Marconi S, Zappia M. Selegiline: A Reappraisal of Its Role in Parkinson Disease. *Clin Neuropharmacol*. 2012;35(3):134-140. doi:10.1097/WNF.0b013e318255838b
44. Ferrara N, Rinaldi B, Corbi G, et al. Exercise Training Promotes SIRT1 Activity in Aged Rats. *Rejuvenation Res*. 2008;11(1):139-150. doi:10.1089/rej.2007.0576
45. Ferrari R, Cargnoni A, Ceconi C. Anti-ischaemic effect of ivabradine. *Pharmacol Res*. 2006;53(5):435-439. doi:10.1016/j.phrs.2006.03.018
46. Floras JS. Sympathetic Nervous System Activation in Human Heart Failure. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(5):375-385. doi:10.1016/j.jacc.2009.03.061
47. Fowler JS, Volkow ND, Wang GJ, et al. Age-Related Increases in Brain Monoamine Oxidase B in Living Healthy Human Subjects. *Neurobiol Aging*. 1997;18(4):431-435. doi:10.1016/S0197-4580(97)00037-7
48. Gao W, Guo N, Zhao S, et al. HTR2A promotes the development of cardiac hypertrophy by activating PI3K-PDK1-AKT-mTOR signaling. *Cell Stress Chaperones*. 2020;25(6):899-908. doi:10.1007/s12192-020-01124-x
49. Gergs U, Jung F, Buchwalow IB, et al. Pharmacological and physiological assessment of serotonin formation and degradation in isolated preparations from mouse and human hearts. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 2017;313(6):H1087-H1097. doi:10.1152/ajpheart.00350.2017

50. Goldstein DS. Plasma norepinephrine in essential hypertension. A study of the studies. *Hypertension*. 1981;3(1):48-52. doi:10.1161/01.HYP.3.1.48
51. Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol*. 2015;6:524-551. doi:10.1016/j.redox.2015.08.020
52. Griendling KK, Camargo LL, Rios FJ, Alves-Lopes R, Montezano AC, Touyz RM. Oxidative Stress and Hypertension. *Circ Res*. 2021;128(7):993-1020. doi:10.1161/CIRCRESAHA.121.318063
53. Grimsby J, Chen K, Wang LJ, Lan NC, Shih JC. Human monoamine oxidase A and B genes exhibit identical exon-intron organization. *Proc Natl Acad Sci*. 1991;88(9):3637-3641. doi:10.1073/pnas.88.9.3637
54. Grimsby J, Lan NC, Neve R, Chen K, Shih JC. Tissue Distribution of Human Monoamine Oxidase A and B mRNA. *J Neurochem*. 1990;55(4):1166-1169. doi:10.1111/j.1471-4159.1990.tb03121.x
55. Grivennikova VG, Kareyeva AV, Vinogradov AD. Oxygen-dependence of mitochondrial ROS production as detected by Amplex Red assay. *Redox Biol*. 2018;17:192-199. doi:10.1016/j.redox.2018.04.014
56. Hahnova K, Brabcova I, Neckar J, et al. β -Adrenergic signaling, monoamine oxidase A and antioxidant defence in the myocardium of SHR and SHR-mtBN conplastic rat strains: the effect of chronic hypoxia. *J Physiol Sci*. 2018;68(4):441-454. doi:10.1007/s12576-017-0546-8
57. Hall JE, Granger JP, Carmo JM, et al. Hypertension: Physiology and Pathophysiology. In: Terjung R, ed. *Comprehensive Physiology*. 1st ed. Wiley; 2012:2393-2442. doi:10.1002/cphy.c110058
58. Harman D. Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *J Gerontol*. 1956;11(3):298-300. doi:10.1093/geronj/11.3.298
59. Havlenova T, Skaroupkova P, Miklovic M, et al. Right versus left ventricular remodeling in heart failure due to chronic volume overload. *Sci Rep*. 2021;11(1):17136. doi:10.1038/s41598-021-96618-8
60. Hegde SM, Solomon SD. Influence of Physical Activity on Hypertension and Cardiac Structure and Function. *Curr Hypertens Rep*. 2015;17(10):77. doi:10.1007/s11906-015-0588-3
61. Heger J, Hirschhäuser C, Bornbaum J, et al. Cardiomyocytes-specific deletion of monoamine oxidase B reduces irreversible myocardial ischemia/reperfusion injury. *Free Radic Biol Med*. 2021;165:14-23. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2021.01.020
62. Huuskonen C. Monoamine oxidase A inhibition protects the myocardium after experimental acute volume-overload. *Anatol J Cardiol*. Published online 2018. doi:10.14744/AnatolJCardiol.2018.37336

63. Jinsmaa Y, Florang VR, Rees JN, Anderson DG, Strack S, Doorn JA. Products of Oxidative Stress Inhibit Aldehyde Oxidation and Reduction Pathways in Dopamine Catabolism Yielding Elevated Levels of a Reactive Intermediate. *Chem Res Toxicol*. 2009;22(5):835-841. doi:10.1021/tx800405v
64. Kaludercic N, Carpi A, Menabò R, Di Lisa F, Paolocci N. Monoamine oxidases (MAO) in the pathogenesis of heart failure and ischemia/reperfusion injury. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 2011;1813(7):1323-1332. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.09.010
65. Kaludercic N, Carpi A, Nagayama T, et al. Monoamine Oxidase B Prompts Mitochondrial and Cardiac Dysfunction in Pressure Overloaded Hearts. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(2):267-280. doi:10.1089/ars.2012.4616
66. Kaludercic N, Mialet-Perez J, Paolocci N, Parini A, Di Lisa F. Monoamine oxidases as sources of oxidants in the heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;73:34-42. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.12.032
67. Karadedeli MS, Schreckenber R, Kutsche HS, Schlüter KD. Effects of voluntary exercise on the expression of browning markers in visceral and subcutaneous fat tissue of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Pflug Arch - Eur J Physiol*. 2022;474(2):205-215. doi:10.1007/s00424-021-02629-9
68. Kaumann AJ, Levy FO. 5-Hydroxytryptamine receptors in the human cardiovascular system. *Pharmacol Ther*. 2006;111(3):674-706. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.12.004
69. Kavazis AN, Alvarez S, Talbert E, Lee Y, Powers SK. Exercise training induces a cardioprotective phenotype and alterations in cardiac subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondrial proteins. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 2009;297(1):H144-H152. doi:10.1152/ajpheart.01278.2008
70. Kiyuna LA, Albuquerque RP e, Chen CH, Mochly-Rosen D, Ferreira JCB. Targeting mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart failure: Challenges and opportunities. *Free Radic Biol Med*. 2018;129:155-168. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.019
71. Kjeldsen SE. Hypertension and cardiovascular risk: General aspects. *Pharmacol Res*. 2018;129:95-99. doi:10.1016/j.phrs.2017.11.003
72. Kong SW, Bodyak N, Yue P, et al. Genetic expression profiles during physiological and pathological cardiac hypertrophy and heart failure in rats. *Physiol Genomics*. 2005;21(1):34-42. doi:10.1152/physiolgenomics.00226.2004
73. Kuroda J, Ago T, Matsushima S, Zhai P, Schneider MD, Sadoshima J. NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107(35):15565-15570. doi:10.1073/pnas.1002178107
74. Læer S, Remmers F, Scholz H, Stein B, Ulrich Müller F, Neumann J. Receptor mechanisms involved in the 5-HT-induced inotropic action in the rat isolated atrium:

- Inotropic action of 5-HT in the rat atrium. *Br J Pharmacol*. 1998;123(6):1182-1188. doi:10.1038/sj.bjp.0701702
75. Lairez O, Calise D, Bianchi P, et al. Genetic deletion of MAO-A promotes serotonin-dependent ventricular hypertrophy by pressure overload. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;46(4):587-595. doi:10.1016/j.yjmcc.2008.12.017
76. Lairez O, Cognet T, Schaak S, et al. Role of serotonin 5-HT_{2A} receptors in the development of cardiac hypertrophy in response to aortic constriction in mice. *J Neural Transm*. 2013;120(6):927-935. doi:10.1007/s00702-013-1011-3
77. Lakatta EG. The reality of getting old. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15(9):499-500. doi:10.1038/s41569-018-0068-y
78. Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Pflug Arch Für Gesamte Physiol Menschen Thiere*. 1895;61(6):291-332. doi:10.1007/BF01812150
79. Langer M, Lüttecke D, Schlüter KD. Mechanism of the positive contractile effect of nitric oxide on rat ventricular cardiomyocytes with positive force/frequency relationship. *Pflügers Arch Eur J Physiol*. 2003;447(3):289-297. doi:10.1007/s00424-003-1187-8
80. Liu Q, Wang S, Cai L. Diabetic cardiomyopathy and its mechanisms: Role of oxidative stress and damage. *J Diabetes Investig*. 2014;5(6):623-634. doi:10.1111/jdi.12250
81. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
82. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-275.
83. Lyles GA, McAuslane JAN, Fitzpatrick CMS. Monoamine oxidase activities of dissociated cell fractions from rat ventricular muscle. *Biochem Pharmacol*. 1984;33(16):2569-2574. doi:10.1016/0006-2952(84)90626-9
84. Mailloux RJ. An Update on Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *Antioxidants*. 2020;9(6):472. doi:10.3390/antiox9060472
85. Mallajosyula JK, Kaur D, Chinta SJ, et al. MAO-B Elevation in Mouse Brain Astrocytes Results in Parkinson's Pathology. Bush A, ed. *PLoS ONE*. 2008;3(2):e1616. doi:10.1371/journal.pone.0001616
86. Mannervik B. [60] Glutathione peroxidase. In: *Methods in Enzymology*. Vol 113. Elsevier; 1985:490-495. doi:10.1016/S0076-6879(85)13063-6
87. Manzella N, Santin Y, Maggiorani D, et al. Monoamine oxidase-A is a novel driver of stress-induced premature senescence through inhibition of parkin-mediated mitophagy. *Aging Cell*. 2018;17(5):e12811. doi:10.1111/acel.12811

88. Martinelle K, Häggström L. Mechanisms of ammonia and ammonium ion toxicity in animal cells: Transport across cell membranes. *J Biotechnol.* 1993;30(3):339-350. doi:10.1016/0168-1656(93)90148-G
89. Maulik SK, Kumar S. Oxidative stress and cardiac hypertrophy: a review. *Toxicol Mech Methods.* 2012;22(5):359-366. doi:10.3109/15376516.2012.666650
90. Maurel A, Hernandez C, Kunduzova O, et al. Age-dependent increase in hydrogen peroxide production by cardiac monoamine oxidase A in rats. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* 2003;284(4):H1460-H1467. doi:10.1152/ajpheart.00700.2002
91. Mekontso-Dessap A, Brouri F, Pascal O, et al. Deficiency of the 5-Hydroxytryptamine Transporter Gene Leads to Cardiac Fibrosis and Valvulopathy in Mice. *Circulation.* 2006;113(1):81-89. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.554667
92. Menazza S, Blaauw B, Tiepolo T, et al. Oxidative stress by monoamine oxidases is causally involved in myofiber damage in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 2010;19(21):4207-4215. doi:10.1093/hmg/ddq339
93. Mialet-Perez J, Santin Y, Parini A. Monoamine oxidase-A, serotonin and norepinephrine: synergistic players in cardiac physiology and pathology. *J Neural Transm.* 2018;125(11):1627-1634. doi:10.1007/s00702-018-1908-y
94. Murphy B, Le Grande M, Alvarenga M, Worcester M, Jackson A. Anxiety and Depression After a Cardiac Event: Prevalence and Predictors. *Front Psychol.* 2020;10:3010. doi:10.3389/fpsyg.2019.03010
95. Murphy E, Steenbergen C. Mechanisms Underlying Acute Protection From Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury. *Physiol Rev.* 2008;88(2):581-609. doi:10.1152/physrev.00024.2007
96. Nebigil CG, Etienne N, Messaddeq N, Maroteaux L. Serotonin is a novel survival factor of cardiomyocytes: mitochondria as a target of 5-HT_{2B}-receptor signaling. *FASEB J.* 2003;17(10):1373-1375. doi:10.1096/fj.02-1122fje
97. Nebigil CG, Jaffré F, Messaddeq N, et al. Overexpression of the Serotonin 5-HT_{2B} Receptor in Heart Leads to Abnormal Mitochondrial Function and Cardiac Hypertrophy. *Circulation.* 2003;107(25):3223-3229. doi:10.1161/01.CIR.0000074224.57016.01
98. Nippert F, Schreckenberger R, Schlüter KD. Isolation and Cultivation of Adult Rat Cardiomyocytes. *J Vis Exp.* 2017;(128):56634. doi:10.3791/56634
99. O'Brien PJ, Siraki AG, Shangari N. Aldehyde Sources, Metabolism, Molecular Toxicity Mechanisms, and Possible Effects on Human Health. *Crit Rev Toxicol.* 2005;35(7):609-662. doi:10.1080/10408440591002183
100. Okamoto K, Aoki K. Development of a Strain of Spontaneously Hypertensive Rats. *Jpn Circ J.* 1963;27(3):282-293. doi:10.1253/jcj.27.282
101. Pagan LU, Gomes MJ, Gatto M, Mota GAF, Okoshi K, Okoshi MP. The Role of

Oxidative Stress in the Aging Heart. *Antioxidants*. 2022;11(2):336.
doi:10.3390/antiox11020336

102. Peoples JN, Saraf A, Ghazal N, Pham TT, Kwong JQ. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease. *Exp Mol Med*. 2019;51(12):1-13. doi:10.1038/s12276-019-0355-7

103. Petrak J, Pospisilova J, Sedinova M, et al. Proteomic and transcriptomic analysis of heart failure due to volume overload in a rat aorto-caval fistula model provides support for new potential therapeutic targets - monoamine oxidase A and transglutaminase 2. *Proteome Sci*. 2011;9(1):69. doi:10.1186/1477-5956-9-69

104. Pinto M, Moraes CT. Mechanisms linking mtDNA damage and aging. *Free Radic Biol Med*. 2015;85:250-258. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.005

105. van der Pol A, van Gilst WH, Voors AA, van der Meer P. Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future. *Eur J Heart Fail*. 2019;21(4):425-435. doi:10.1002/ejhf.1320

106. Pönicke K, Gergs U, Buchwalow IB, Hauptmann S, Neumann J. On the presence of serotonin in mammalian cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem*. 2012;365(1-2):301-312. doi:10.1007/s11010-012-1270-6

107. Pravenec M, Kurtz TW. Recent Advances in Genetics of the Spontaneously Hypertensive Rat. *Curr Hypertens Rep*. 2010;12(1):5-9. doi:10.1007/s11906-009-0083-9

108. Quan Y, Xin Y, Tian G, Zhou J, Liu X. Mitochondrial ROS-Modulated mtDNA: A Potential Target for Cardiac Aging. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:1-11. doi:10.1155/2020/9423593

109. Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem*. 1991;266(32):22028-22034. doi:10.1016/S0021-9258(18)54740-2

110. Richardson AG, Schadt EE. The Role of Macromolecular Damage in Aging and Age-related Disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2014;69(Suppl 1):S28-S32. doi:10.1093/gerona/glu056

111. Rodríguez MJ, Saura J, Billett EE, Finch CC, Mahy N. Cellular localization of monoamine oxidase A and B in human tissues outside of the central nervous system. *Cell Tissue Res*. 2001;304(2):215-220. doi:10.1007/s004410100361

112. Rouzaud-Laborde C, Delmas C, Pizzinat N, et al. Platelet activation and arterial peripheral serotonin turnover in cardiac remodeling associated to aortic stenosis: Platelet and serotonin associated to aortic stenosis. *Am J Hematol*. 2015;90(1):15-19. doi:10.1002/ajh.23855

113. Rouzaud-Laborde C, Hanoun N, Baysal I, et al. Role of Endothelial AADC in Cardiac Synthesis of Serotonin and Nitrates Accumulation. Gaetano C, ed. *PLoS ONE*. 2012;7(7):e34893. doi:10.1371/journal.pone.0034893

114. Rupp H, Felbier HR, Bukhari AR, Jacob R. Modulation of myosin isoenzyme populations and activities of monoamine oxidase and phenylethanolamine- *N*-methyltransferase in pressure loaded and normal rat heart by swimming exercise and stress arising from electrostimulation in pairs. *Can J Physiol Pharmacol*. 1984;62(9):1209-1218. doi:10.1139/y84-202
115. Russell WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen London; 1959.
116. Santin Y, Resta J, Parini A, Mialet-Perez J. Monoamine oxidases in age-associated diseases: New perspectives for old enzymes. *Ageing Res Rev*. 2021;66:101256. doi:10.1016/j.arr.2021.101256
117. Santin Y, Sicard P, Vigneron F, et al. Oxidative Stress by Monoamine Oxidase-A Impairs Transcription Factor EB Activation and Autophagosome Clearance, Leading to Cardiomyocyte Necrosis and Heart Failure. *Antioxid Redox Signal*. 2016;25(1):10-27. doi:10.1089/ars.2015.6522
118. Santos CXC, Anilkumar N, Zhang M, Brewer AC, Shah AM. Redox signaling in cardiac myocytes. *Free Radic Biol Med*. 2011;50(7):777-793. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.003
119. Santulli G, Iaccarino G. Adrenergic signaling in heart failure and cardiovascular aging. *Maturitas*. 2016;93:65-72. doi:10.1016/j.maturitas.2016.03.022
120. Santulli G, Xie W, Reiken SR, Marks AR. Mitochondrial calcium overload is a key determinant in heart failure. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112(36):11389-11394. doi:10.1073/pnas.1513047112
121. Sari Y, Zhou FC. Serotonin and its transporter on proliferation of fetal heart cells. *Int J Dev Neurosci*. 2003;21(8):417-424. doi:10.1016/j.ijdevneu.2003.10.002
122. Saura J, Richards JG, Mahy N. Differential age-related changes of mao-a and mao-b in mouse brain and peripheral organs. *Neurobiol Aging*. 1994;15(4):399-408. doi:10.1016/0197-4580(94)90071-X
123. Schlüter KD, ed. *Cardiomyocytes – Active Players in Cardiac Disease*. Springer International Publishing; 2016. doi:10.1007/978-3-319-31251-4
124. Schlüter KD, Schreckenber R, da Costa Rebelo RM. Interaction between exercise and hypertension in spontaneously hypertensive rats: a meta-analysis of experimental studies. *Hypertens Res*. 2010;33(11):1155-1161. doi:10.1038/hr.2010.155
125. Schlüter KD, Schreiber D. Adult Ventricular Cardiomyocytes: Isolation and Culture. In: *Basic Cell Culture Protocols*. Vol 290. Humana Press; 2004:305-314. doi:10.1385/1-59259-838-2:305
126. Schmidt RF, Lang F, Heckmann M, eds. *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie: mit Online-Repetitorium*. Sonderausgabe der 31. Auflage. Springer; 2017. doi:10.1007/978-3-642-01651-6

127. Schreckenber R, Horn AM, da Costa Rebelo RM, et al. Effects of 6-months' Exercise on Cardiac Function, Structure and Metabolism in Female Hypertensive Rats—The Decisive Role of Lysyl Oxidase and Collagen III. *Front Physiol.* 2017;8:556. doi:10.3389/fphys.2017.00556
128. Schriener SE, Linford NJ, Martin GM, et al. Extension of Murine Life Span by Overexpression of Catalase Targeted to Mitochondria. *Science.* 2005;308(5730):1909-1911. doi:10.1126/science.1106653
129. Schulz E, Gori T, Münzel T. Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertens Res.* 2011;34(6):665-673. doi:10.1038/hr.2011.39
130. Shimada K, Kitazumi T, Sadakane N, Ogura H, Ozawa T. Age-related changes of baroreflex function, plasma norepinephrine, and blood pressure. *Hypertension.* 1985;7(1):113-117. doi:10.1161/01.HYP.7.1.113
131. Shimizu I, Minamino T. Cellular senescence in cardiac diseases. *J Cardiol.* 2019;74(4):313-319. doi:10.1016/j.jjcc.2019.05.002
132. Sivasubramaniam SD, Finch CC, Rodriguez MJ, Mahy N, Billett EE. A comparative study of the expression of monoamine oxidase-A and -B mRNA and protein in non-CNS human tissues. *Cell Tissue Res.* 2003;313(3):291-300. doi:10.1007/s00441-003-0765-6
133. Slotkin TA. Mary Bernheim and the discovery of monoamine oxidase. *Brain Res Bull.* 1999;50(5-6):373. doi:10.1016/S0361-9230(99)00110-0
134. Smith D, Filipowicz C, McCauley R. Monoamine oxidase A and monoamine oxidase B activities are catalyzed by different proteins. *Biochim Biophys Acta BBA - Protein Struct Mol Enzymol.* 1985;831(1):1-7. doi:10.1016/0167-4838(85)90141-4
135. Smith JR, Hayman GT, Wang SJ, et al. The Year of the Rat: The Rat Genome Database at 20: a multi-species knowledgebase and analysis platform. *Nucleic Acids Res.* Published online November 12, 2019;gkz1041. doi:10.1093/nar/gkz1041
136. Sniderman AD, Furberg CD. Age as a modifiable risk factor for cardiovascular disease. *The Lancet.* 2008;371(9623):1547-1549. doi:10.1016/S0140-6736(08)60313-X
137. Sonobe T, Akiyama T, Pearson JT. Transporter-dependent uptake and metabolism of myocardial interstitial serotonin in the rat heart. *J Physiol Sci.* 2022;72(1):27. doi:10.1186/s12576-022-00852-2
138. Statistisches Bundesamt (Destatis). Anzahl der Gestorbenen nach Kapiteln der ICD-10 und nach Geschlecht für 2021. Published December 16, 2022. Accessed January 23, 2023. https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/gestorbene_anzahl.html
139. Statistisches Bundesamt (Destatis). Krankheitskosten, Krankheitskosten je Einwohner: Deutschland, Jahre, Krankheitsdiagnosen (ICD-10). Published January 23,

2023. Accessed January 23, 2023.

<https://www-genesis.destatis.de/genesis/online?sequenz=tabelleErgebnis&selectionname=23631-0001&sachmerkmal=ICD10Y&sachschiuessel=ICD10-I00-I99,ICD10-I10-I15,ICD10-I20-I25,ICD10-I21,ICD10-I22,Icd10-I30-I52,ICD10-I50,ICD10-I60-I69,ICD10-I60-I61,ICD10-I63,ICD10-I64,ICD10-I69,ICD10-I80-I89,ICD10-I83#abreadcrumb>

140. Storz G, Imlayt JA. Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol.* 1999;2(2):188-194. doi:10.1016/S1369-5274(99)80033-2

141. Sun XQ, Peters E, Schaliij I, et al. The effect of Monoamine oxidase A inhibition on experimentally induced pulmonary arterial hypertension. In: *Pulmonary Hypertension.* European Respiratory Society; 2018:PA3072. doi:10.1183/13993003.congress-2018.PA3072

142. Takimoto E, Kass DA. Role of Oxidative Stress in Cardiac Hypertrophy and Remodeling. *Hypertension.* 2007;49(2):241-248. doi:10.1161/01.HYP.0000254415.31362.a7

143. Triposkiadis F, Xanthopoulos A, Butler J. Cardiovascular Aging and Heart Failure. *J Am Coll Cardiol.* 2019;74(6):804-813. doi:10.1016/j.jacc.2019.06.053

144. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* 2011;301(6):H2181-H2190. doi:10.1152/ajpheart.00554.2011

145. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003;552(2):335-344. doi:10.1113/jphysiol.2003.049478

146. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1. *Cardiovasc Res.* 2008;79(2):208-217. doi:10.1093/cvr/cvn098

147. Villeneuve C, Guilbeau-Frugier C, Sicard P, et al. p53-PGC-1 α Pathway Mediates Oxidative Mitochondrial Damage and Cardiomyocyte Necrosis Induced by Monoamine Oxidase-A Upregulation: Role in Chronic Left Ventricular Dysfunction in Mice. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18(1):5-18. doi:10.1089/ars.2011.4373

148. Vuohelainen V, Hämäläinen M, Paavonen T, Karlsson S, Moilanen E, Mennander A. Inhibition of monoamine oxidase A increases recovery after experimental cardiac arrest. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2015;21(4):441-449. doi:10.1093/icvts/ivv175

149. Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, et al. Synthesis of Serotonin by a Second Tryptophan Hydroxylase Isoform. *Science.* 2003;299(5603):76-76. doi:10.1126/science.1078197

150. Wang Y, Li Y, He C, Gou B, Song M. Mitochondrial regulation of cardiac aging. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis.* 2019;1865(7):1853-1864. doi:10.1016/j.bbadis.2018.12.008

151. Welsch U, Deller T, Sobotta J. *Lehrbuch Histologie: mit dem Plus im Web ;*

Zugangscodex im Buch. 3. Aufl. Elsevier, Urban & Fischer; 2010.

152. Westlund K, Denney R, Kochersperger L, Rose R, Abell C. Distinct monoamine oxidase A and B populations in primate brain. *Science*. 1985;230(4722):181-183. doi:10.1126/science.3875898
153. Williams B, Mancia G, Spiering W, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J*. 2018;39(33):3021-3104. doi:10.1093/eurheartj/ehy339
154. Winterbourn CC. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett*. 1995;82-83:969-974. doi:10.1016/0378-4274(95)03532-X
155. Wolf A, Kutsche HS, Atmanspacher F, Karadedeli MS, Schreckenbergr R, Schlüter KD. Unusual Metabolic Adaptations in Spontaneously Hypertensive Rats to Free Running Wheel Activity Includes Uncoupling Protein-3 (UCP-3) and Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) Expression. *Front Physiol*. 2021;12:598723. doi:10.3389/fphys.2021.598723
156. Yamada M. Clinical Pharmacology of MAO Inhibitors: Safety and Future. *NeuroToxicology*. 2004;25(1-2):215-221. doi:10.1016/S0161-813X(03)00097-4
157. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012;13(1):134. doi:10.1186/1471-2105-13-134
158. Youdim MBH, Edmondson D, Tipton KF. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(4):295-309. doi:10.1038/nrn1883
159. Zhao R, Jiang S, Zhang L, Yu Z. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int J Mol Med*. Published online May 8, 2019. doi:10.3892/ijmm.2019.4188
160. Zhou P, Pu WT. Recounting Cardiac Cellular Composition. *Circ Res*. 2016;118(3):368-370. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.308139
161. Zima A, Blatter L. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovasc Res*. 2006;71(2):310-321. doi:10.1016/j.cardiores.2006.02.019
162. Zorov DB, Filburn CR, Klotz LO, Zweier JL, Sollott SJ. Reactive Oxygen Species (Ros-Induced) Ros Release. *J Exp Med*. 2000;192(7):1001-1014. doi:10.1084/jem.192.7.1001

9 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
°C	Grad Celsius
ΔC_T	relative Genexpression
ΔMW	Mittelwertsdifferenz
5-HIAA	5-Hydroxyindolessigsäure (engl. <i>5-hydroxyindoleacetic acid</i>)
5-HIAL	5-Hydroxyindolacetaldehyd (engl. <i>5-hydroxyindoleacetaldehyde</i>)
5-HT	Serotonin (5-Hydroxytryptamin)
5-HTR	Serotonin-Rezeptor
5-HT _x R	Serotonin-Rezeptor-Typ _x
95% KI	95%-Konfidenzintervall
a.u.	absolute Einheiten (engl. <i>absolute units</i>)
Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
ALDH2	Aldehyddehydrogenase-2
<i>ALDH2</i>	Genbezeichnung: Aldehyddehydrogenase-2
ÄMM	äußere mitochondriale Membran
ANOVA	Varianzanalyse (engl. <i>analysis of variance</i>)
ANP	atriales natriuretisches Peptid
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B2M</i>	Genbezeichnung: Beta-2-Mikroglobulin
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Elementares Calcium
<i>CAT</i>	Genbezeichnung: Katalase
CCT	Creatin-Carnitin-Taurin
cDNA	komplementäre DNA (engl. <i>complementary DNA</i>)
Clg	Clorgylin
C _T	Schwellenwertzyklus (engl. <i>cycle of threshold</i>)
dL/L	relative Zellverkürzung
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
engl.	englisch
ESC	engl. <i>European Society of Cardiology</i>
ETK	Elektronentransportkette
EZ	Endothelzelle
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form)
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
FC	n-fache Änderung (engl. <i>fold change</i>)
FCS	Fetales Kälberserum
FCs	n-fache Änderungen (engl. <i>fold changes</i>)

<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GAPDH	engl. <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCN-Kanäle	engl. <i>hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel</i>
HG	Herzgewebe
<i>HPRT</i>	Genbezeichnung: Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. <i>horseradish peroxidase</i>)
<i>HTR2A</i>	Genbezeichnung: 5-hydroxytryptamine receptor 2A
<i>HTR2B</i>	Genbezeichnung: 5-hydroxytryptamine receptor 2B
Hz	Hertz
IMM	innere mitochondriale Membran
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
KMZ	Kardiomyozyten
Ko	Kontrolle
l	Liter
M	mol/l (Mol pro Liter)
MAO	Monoaminoxidase
<i>MAOA</i>	Genbezeichnung: Monoaminoxidase A
<i>MAOB</i>	Genbezeichnung: Monoaminoxidase B
MAOs	Monoaminoxidasen
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	mmol/l (Millimol pro Liter)
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
Mn-SOD	mitochondriale Superoxid-Dismutase
MPTP	mitochondriale Permeabilitätspore (engl. <i>mitochondrial permeability transition pore</i>)
mRNA	Boten-RNA (engl. <i>messenger RNA</i>)
ms	Millisekunde
mtDNA	mitochondriale DNA
MW	Mittelwert
N	Anzahl biologischer Replikate
n	Anzahl technischer Replikate
NADH	Nicotinamadenindinukleotid (reduzierte Form)
NCBI	engl. <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
nm	Nanometer
NOX	NADPH-Oxidase

OCT	Organischer-Kationen-Transporter
p	p-Wert, Signifikanzwert
PGC-1 α	engl. <i>peroxisome proliferator-activated receptor-c coactivator-1a</i>
PMAT	Plasma-Membran-Monoamin-Transporter
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
Ref.	Referenzgene (engl. <i>housekeeping genes</i>)
RGD	engl. <i>Rat Genome Database</i>
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
<i>RPL32</i>	Genbezeichnung: ribosomales Protein L32
s	Sekunde
s.	siehe
SD	Standardabweichung
SERCA	sarkoplasmatische Ca ²⁺ -ATPase
SERT	Serotonintransporter
SHR	spontan hypertensive Ratten
<i>SLC6A4</i>	Genbezeichnung: solute carrier family 6, member 4
SOD	Superoxid-Dismutase
sog.	sogenannten
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
Tab.	Tabelle
Temp.	Temperatur
TZ	Thrombozyten
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/ μ l	Einheiten (engl. <i>Units</i>) pro Mikroliter
V	Volt
v.a.	vor allem
WIS	Wistar-Hannover-Ratten
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
μ l	Mikroliter
μ M	μ mol/l (Mikromol pro Liter)
μ m	Mikrometer

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht der mitochondrialen Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies. Die wesentliche Entstehung von ROS geht auf die Enzyme der Elektronentransportkette (ETK) zurück. Die Enzyme der ETK befinden sich im Bereich der inneren mitochondrialen Membran (IMM). Einige Elektronen durchlaufen nicht den regulären Transportweg und werden auf elementaren Sauerstoff übertragen, sodass Superoxid-Anionen ($O_2^{\cdot-}$) entstehen. $p66^{Shc}$ befindet sich im Zytosol und kann bei zellulärem Stress in das Mitochondrium translozieren. Dort interagiert $p66^{Shc}$ mit Cytochrom C, das Bestandteil der ETK ist. $p66^{Shc}$ führt ebenfalls durch Übertragung von Elektronen auf Sauerstoff zur Entstehung von Superoxid-Anionen. NOX4 ist an der IMM gelegen und nutzt NADPH zur Übertragung von Elektronen auf Sauerstoff. Superoxid-Anionen können nicht entlang der mitochondrialen Membran diffundieren und werden durch Superoxid-Dismutasen (SOD) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) abgebaut. MAOs befinden sich an der äußeren mitochondrialen Membran (ÄMM) und katalysieren den Abbau von biogenen Aminen und Katecholaminen, wobei es zur Freisetzung von Wasserstoffperoxid kommt. . 4

Abbildung 2: Übersicht des Serotoninstoffwechsels in Kardiomyozyten. Serotonin (5-HT) kann aus aktivierten Thrombozyten (TZ) in kardialen Gefäßen oder auch aus kardialen Endothelzellen (EZ) freigesetzt werden und entweder Rezeptor-abhängig (farblich blau dargestellt) oder Transporter-abhängig (farblich grün dargestellt) auf KMZ einwirken. Die Rezeptor-vermittelte Wirkung über Serotonin-Rezeptoren kann über 5-HT_{2A}R, 5-HT_{2B}R oder 5-HT₄R erfolgen. 5-HT_{2A}R bewirkt die Aktivierung einer Signalkaskade, die die Entstehung einer kardialen Hypertrophie fördert, wohingegen 5-HT_{2B}R antiapoptotische Effekte aufzeigt. 5-HT₄R konnte bisher lediglich in atrialen KMZ nachgewiesen werden und bewirkt eine Zunahme der Kontraktilität. Da eine ubiquitäre Wirkung im Herzen nicht angenommen werden kann, sind die 5-HT₄R-vermittelten Effekte durch gestrichelte Linien dargestellt. Eine intrazelluläre Aufnahme von 5-HT ist über spezifische (SERT) und unspezifische Transporter (PMAT, OCT) möglich. In der Zelle wird 5-HT MAO-A-vermittelt zu 5-HIAL abgebaut, was wiederum durch die ALDH2 zu 5-HIAA metabolisiert wird. Als Nebenprodukt der MAO-A-vermittelten Reaktion fällt Wasserstoffperoxid (H_2O_2) an, welches als ROS eine Schädigung des kontraktiven Apparats bewirkt, indem es mit Proteinen der Sarkomere interagiert. Darüber hinaus schädigt Wasserstoffperoxid die mtDNA, was in einer mitochondrialen Dysfunktion resultiert. Durch Schädigung des

Zellkerns und weiterer Organellen fördert Wasserstoffperoxid den Zelltod. Wasserstoffperoxid kann durch Katalasen zu Wasser und Sauerstoff abgebaut werden.... 10

Abbildung 3: Schematische Darstellung der Langendorff-Perfusionsanlage. Nach Spülung der Anlage mit *Aqua bidest.* konnte diese mit Powell-Medium gefüllt werden. Durch den doppelwandigen Aufbau erwärmte die Wärmepumpe die Flüssigkeit in der Doppelwand (farblich hellblau dargestellt) auf 37 °C. Das Perfusat (farblich dunkelblau dargestellt) wurde mit Carbogen begast und durch die Peristaltikpumpe in Zirkulation gehalten, wodurch das kanülierte Herz enzymatisch verdaut wurde. Die Durchflussgeschwindigkeit des Perfusats wurde über den Flussgeschwindigkeitsregler eingestellt. Nach 25 Minuten erfolgte die Abtrennung und weitere Verarbeitung des Herzens. 25

Abbildung 4: Kardiomyozyten nach Durchlaufen der Isolationschritte auf einer Kulturschale. Lichtmikroskopische Aufnahme isolierter KMZ im Anschluss an den Isolationsprozess. Dargestellt ist eine Übersichtsaufnahme in 10x Vergrößerung. Zu sehen sind stäbchenförmigen KMZ, die der Kulturschale anheften. Vereinzelt sind nicht vitale Zellen an ihrer abgerundeten Form zu erkennen, die durch den Wechsel des Trägermediums nicht vollständig entfernt werden konnten. Der Maßstab ist durch den schwarzen Balken angegeben, welcher einer Länge von 100 µm entspricht. 27

Abbildung 5: Schematische Darstellung der Bestimmung kardialer Kontraktionsparameter. Die KMZ wurden kurz nach Entnahme aus dem Brutschrank auf einen Mikroskopisch mit angeschlossener Videokamera gelegt. An die Kulturschale wurde eine biphasische Spannung von 50 mV für 0,5 ms angelegt. Nach korrekter Justierung der zu messenden KMZ über die Videokamera in den Erfassungsbereich der Zeilenkamera (Bereich zwischen den gestrichelten Linien) konnte das Signal der Zeilenkamera durch den Oszillographen ausgegeben werden. Die Zellgrenzen sind dabei durch deutliche Ausschläge auf der y-Achse zu erkennen. Computergestützt konnte somit die Zelllänge in der Diastole (Strecke a) und in der Systole (Strecke b) erfasst werden. Alle übrigen Kontraktionsparameter ergeben sich aus der Erfassung der Strecken und deren Änderung über die Zeit. 29

Abbildung 6: Vergleich der Protein- und cDNA-Konzentration von Monoaminoxidasen im Herzen. A Im Western Blot wurden MAO-A und MAO-B auf

Proteinebene am Herzgewebe (HG) und an isolierten KMZ von zwei 6 Wochen alten WIS untersucht (N = 2). Als Positivkontrolle diente homogenisiertes Lebergewebe beider Replikate (Ko). Die Ladekontrolle erfolgte durch Bestimmung von GAPDH. **B** In der qPCR wurde die relative Genexpression für *MAOA* und *MAOB* am HG von je sechs WIS bei einem Alter von 6 Wochen verglichen (N = 6). Dargestellt sind die einzelnen ΔC_T -Werte (Punkte) und deren arithmetisches Mittel (Balken). Es liegt ein signifikanter Gruppenunterschied im zweiseitigen, gepaarten t-Test vor ($p < 0,0001$)...... 39

Abbildung 7: Relative Zellverkürzung unter kurzfristigem und langfristigem Einfluss von Serotonin und Clg. **A** Dargestellt sind die kurzfristigen Effekte von Serotonin und Clg auf die relative Zellverkürzung von KMZ in % unter aufsteigenden Konzentrationen von Serotonin (0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M) jeweils mit und ohne Zugabe von Clg in einer Konzentration von 1 μ M. Die aufsteigenden Konzentrationen von Serotonin sind durch horizontale Dreiecke abgebildet. Isolierte KMZ von drei biologischen Replikaten (N = 3) wurden gleichmäßig auf die Gruppen verteilt. Je Gruppe erfolgte die Bestimmung der Kontraktionsparameter an 81 KMZ (n = 81). **B** Dargestellt sind die langfristigen Effekte von Serotonin und Clg auf die relative Zellverkürzung von KMZ in % unter ansteigenden Konzentrationen von Serotonin (0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M), wobei die höchste Konzentrationsstufe von 100 μ M Serotonin jeweils mit und ohne Zugabe von Clg in einer Konzentration von 1 μ M untersucht wurde. Die aufsteigenden Konzentrationen an Serotonin sind durch horizontale Dreiecke abgebildet. Isolierte KMZ von zwei biologischen Replikaten (N = 2) wurden gleichmäßig auf die Gruppen verteilt. Je Gruppe erfolgte die Bestimmung der Kontraktionsparameter an 54 KMZ (n = 54). **A und B** Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte je Gruppe (Symbol) und deren 95 %-KI (Fehlerbalken). Die statistische Testung erfolgte durch Anwendung eines *one-way ANOVAs* mit multiplem Testen unter Tukey-Korrektur. Ausgewählte p-Werte sind zwischen den zu vergleichenden Gruppen angegeben und finden sich oberhalb der verbindenden Linien. Die Kontrollgruppe wurde durch die äquivalente Zugabe von *Aqua bidest.* definiert. 41

Abbildung 8: Quantifizierung von Wasserstoffperoxid in isolierten kardialen Mitochondrien unter Inkubation mit Serotonin. **A** Zu sehen sind die Gruppenverläufe der ermittelten Fluoreszenzintensität in absoluten Einheiten (a.u.) über einen Zeitraum von 10 Minuten unter Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an Serotonin (10 μ M und 100 μ M) jeweils mit und ohne Zugabe von 1 μ M Clg. Isolierte kardiale Mitochondrien von

vier biologischen Replikaten (N = 4) wurden gleichmäßig auf sechs Gruppen verteilt. Die dargestellten Kurven entsprechen den arithmetischen Mittelwerten aus Fluoreszenzintensität und Zeit. **B** Die Steigung der Fluoreszenzintensität (a.u./min) wurde für jede Gruppe und jedes biologische Replikat ermittelt. Dargestellt sind die Einzelwerte eines jeden Replikates (Symbole) und das arithmetische Mittel der Gruppe (Balken). Die Gruppenzugehörigkeit ist der rechtsstehenden Legende zu entnehmen. Es besteht eine farbliche Gruppenbindung in A und B. Sofern zwei Substrate eingesetzt wurden, erfolgte die Zugabe von Clg zeitlich vor der Zugabe von Serotonin. Die Kontrollgruppe wurde durch die äquivalente Zugabe von *Aqua bidest.* definiert. Gruppenvergleiche wurden mittels *one-way ANOVA* unter Tukey-Korrektur geprüft und sind, sofern sie signifikant waren, als p-Wert oberhalb der verbindenden Linien angegeben..... 43

Abbildung 9: Altersabhängige Expression der MAO-A in WIS und SHR mit und ohne Möglichkeit zur körperlichen Aktivität. **A** Dargestellt sind die einzelnen ΔC_T -Werte an den Altersstufen 6, 30 und 46 Wochen. Je Gruppe und Zeitpunkt sind sechs biologische Replikate (N = 6) als schwarzer Kreis (WIS) und rotes Quadrat (SHR) abgebildet. Verbunden sind die arithmetischen Mittelwerte. Gruppenvergleiche zwischen WIS, SHR und innerhalb der einzelnen Gruppen wurden mittels *two-way ANOVA* und *Šidák's multiple comparisons test* geprüft und sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben. **B und C** Dargestellt sind die FCs für WIS (schwarzer Kreis) und SHR (rotes Quadrat) sowie deren 95 %-KI (Fehlerbalken) bezogen auf ein Alter von 6 Wochen (gestrichelte Linie). Gruppenvergleiche zu einem Alter von 6 Wochen sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben. **D** Dargestellt sind die einzelnen ΔC_T -Werte an den Altersstufen 6, 12, 22 und 30 Wochen. Ab einem Alter von 6 Wochen erhielt die Gruppe der SHR-Läufer die Möglichkeit zur körperlichen Aktivität. Je Gruppe und Zeitpunkt sind ab einem Alter von 12 Wochen sechs biologische Replikate (N = 6) als violetter Kreis (SHR-Kontrolle) und blaues Quadrat (SHR-Läufer) abgebildet. Verbunden sind die arithmetischen Mittelwerte. Gruppenvergleiche zwischen SHR-Kontrolle, SHR-Läufer und innerhalb der einzelnen Gruppen wurden mittels *two-way ANOVA* und *Šidák's multiple comparisons test* geprüft und sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben. **E und F** Dargestellt sind die FCs für SHR-Kontrolle (violetter Kreis) und SHR-Läufer (blaues Quadrat) sowie deren 95 %-KI (Fehlerbalken) bezogen auf das 6 Wochen alte Startkollektiv (gestrichelte Linie). Gruppenvergleiche zu einem Alter von 6 Wochen sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben..... 46

Abbildung 10: Altersabhängige Expression der MAO-B in WIS und SHR mit und ohne Möglichkeit zur körperlichen Aktivität. **A** Dargestellt sind die einzelnen ΔC_T -Werte an den Altersstufen 6, 30 und 46 Wochen. Je Gruppe und Zeitpunkt sind sechs biologische Replikate (N = 6) als schwarzer Kreis (WIS) und rotes Quadrat (SHR) abgebildet. Verbunden sind die arithmetischen Mittelwerte. Gruppenvergleiche zwischen WIS, SHR und innerhalb der einzelnen Gruppen wurden mittels *two-way ANOVA* und *Šídák's multiple comparisons test* geprüft und sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben. **B und C** Dargestellt sind die FCs für WIS (schwarzer Kreis) und SHR (rotes Quadrat) sowie deren 95 %-KI (Fehlerbalken) bezogen auf ein Alter von 6 Wochen (gestrichelte Linie). Gruppenvergleiche zu einem Alter von 6 Wochen sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben. **D** Dargestellt sind die einzelnen ΔC_T -Werte an den Altersstufen 6, 12, 22 und 30 Wochen. Ab einem Alter von 6 Wochen erhielt die Gruppe der SHR-Läufer die Möglichkeit zur körperlichen Aktivität. Je Gruppe und Zeitpunkt sind ab einem Alter von 12 Wochen sechs biologische Replikate (N = 6) als violetter Kreis (SHR-Kontrolle) und blaues Quadrat (SHR-Läufer) abgebildet. Verbunden sind die arithmetischen Mittelwerte. Gruppenvergleiche zwischen SHR-Kontrolle, SHR-Läufer und innerhalb der einzelnen Gruppen wurden mittels *two-way ANOVA* und *Šídák's multiple comparisons test* geprüft und sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben. **E und F** Dargestellt sind die FCs für SHR-Kontrolle (violetter Kreis) und SHR-Läufer (blaues Quadrat) sowie deren 95 %-KI (Fehlerbalken) bezogen auf das 6 Wochen alte Startkollektiv (gestrichelte Linie). Gruppenvergleiche zu einem Alter von 6 Wochen sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben..... 48

Abbildung 11: Altersabhängige Expression des SERTs in WIS und SHR mit und ohne Möglichkeit zur körperlichen Aktivität. **A** Dargestellt sind die einzelnen ΔC_T -Werte an den Altersstufen 6, 30 und 46 Wochen. Je Gruppe und Zeitpunkt sind sechs biologische Replikate (N = 6) als schwarzer Kreis (WIS) und rotes Quadrat (SHR) abgebildet. Verbunden sind die arithmetischen Mittelwerte. Gruppenvergleiche zwischen WIS, SHR und innerhalb der einzelnen Gruppen wurden mittels *two-way ANOVA* und *Šídák's multiple comparisons test* geprüft und sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben. **B und C** Dargestellt sind die FCs für WIS (schwarzer Kreis) und SHR (rotes Quadrat) sowie deren 95 %-KI (Fehlerbalken) bezogen auf ein Alter von 6 Wochen (gestrichelte Linie). Gruppenvergleiche zu einem Alter von 6 Wochen sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben. **D** Dargestellt sind die einzelnen ΔC_T -Werte an den Altersstufen 6, 12, 22 und

30 Wochen. Ab einem Alter von 6 Wochen erhielt die Gruppe der SHR-Läufer die Möglichkeit zur körperlichen Aktivität. Je Gruppe und Zeitpunkt sind ab einem Alter von 12 Wochen sechs biologische Replikate (N = 6) als violetter Kreis (SHR-Kontrolle) und blaues Quadrat (SHR-Läufer) abgebildet. Verbunden sind die arithmetischen Mittelwerte. Gruppenvergleiche zwischen SHR-Kontrolle, SHR-Läufer und innerhalb der einzelnen Gruppen wurden mittels *two-way ANOVA* und *Šidák's multiple comparisons test* geprüft und sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben. **E und F** Dargestellt sind die FCs für SHR-Kontrolle (violetter Kreis) und SHR-Läufer (blaues Quadrat) sowie deren 95 %-KI (Fehlerbalken) bezogen auf das 6 Wochen alte Startkollektiv (gestrichelte Linie). Gruppenvergleiche zu einem Alter von 6 Wochen sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben..... 50

Abbildung 12: Altersabhängige Expression der ALDH2 in WIS und SHR mit und ohne Möglichkeit zur körperlichen Aktivität. **A** Dargestellt sind die einzelnen ΔC_T -Werte an den Altersstufen 6, 30 und 46 Wochen. Je Gruppe und Zeitpunkt sind sechs biologische Replikate (N = 6) als schwarzer Kreis (WIS) und rotes Quadrat (SHR) abgebildet. Verbunden sind die arithmetischen Mittelwerte. Gruppenvergleiche zwischen WIS, SHR und innerhalb der einzelnen Gruppen wurden mittels *two-way ANOVA* und *Šidák's multiple comparisons test* geprüft und sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben. **B und C** Dargestellt sind die FCs für WIS (schwarzer Kreis) und SHR (rotes Quadrat) sowie deren 95 %-KI (Fehlerbalken) bezogen auf ein Alter von 6 Wochen (gestrichelte Linie). Gruppenvergleiche zu einem Alter von 6 Wochen sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben. **D** Dargestellt sind die einzelnen ΔC_T -Werte an den Altersstufen 6, 12, 22 und 30 Wochen. Ab einem Alter von 6 Wochen erhielt die Gruppe der SHR-Läufer die Möglichkeit zur körperlichen Aktivität. Je Gruppe und Zeitpunkt sind ab einem Alter von 12 Wochen sechs biologische Replikate (N = 6) als violetter Kreis (SHR-Kontrolle) und blaues Quadrat (SHR-Läufer) abgebildet. Verbunden sind die arithmetischen Mittelwerte. Gruppenvergleiche zwischen SHR-Kontrolle, SHR-Läufer und innerhalb der einzelnen Gruppen wurden mittels *two-way ANOVA* und *Šidák's multiple comparisons test* geprüft und sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben. **E und F** Dargestellt sind die FCs für SHR-Kontrolle (violetter Kreis) und SHR-Läufer (blaues Quadrat) sowie deren 95 %-KI (Fehlerbalken) bezogen auf das 6 Wochen alte Startkollektiv (gestrichelte Linie). Gruppenvergleiche zu einem Alter von 6 Wochen sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben..... 52

Abbildung 13: Altersabhängige Expression der Katalase in WIS und SHR mit und ohne Möglichkeit zur körperlichen Aktivität. **A** Dargestellt sind die einzelnen ΔC_T -Werte an den Altersstufen 6, 30 und 46 Wochen. Je Gruppe und Zeitpunkt sind sechs biologische Replikate (N = 6) als schwarzer Kreis (WIS) und rotes Quadrat (SHR) abgebildet. Verbunden sind die arithmetischen Mittelwerte. Gruppenvergleiche zwischen WIS, SHR und innerhalb der einzelnen Gruppen wurden mittels *two-way ANOVA* und *Šidák's multiple comparisons test* geprüft und sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben. **B und C** Dargestellt sind die FCs für WIS (schwarzer Kreis) und SHR (rotes Quadrat) sowie deren 95 %-KI (Fehlerbalken) bezogen auf ein Alter von 6 Wochen (gestrichelte Linie). Gruppenvergleiche zu einem Alter von 6 Wochen sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben. **D** Dargestellt sind die einzelnen ΔC_T -Werte an den Altersstufen 6, 12, 22 und 30 Wochen. Ab einem Alter von 6 Wochen erhielt die Gruppe der SHR-Läufer die Möglichkeit zur körperlichen Aktivität. Je Gruppe und Zeitpunkt sind ab einem Alter von 12 Wochen sechs biologische Replikate (N = 6) als violetter Kreis (SHR-Kontrolle) und blaues Quadrat (SHR-Läufer) abgebildet. Verbunden sind die arithmetischen Mittelwerte. Gruppenvergleiche zwischen SHR-Kontrolle, SHR-Läufer und innerhalb der einzelnen Gruppen wurden mittels *two-way ANOVA* und *Šidák's multiple comparisons test* geprüft und sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben. **E und F** Dargestellt sind die FCs für SHR-Kontrolle (violetter Kreis) und SHR-Läufer (blaues Quadrat) sowie deren 95 %-KI (Fehlerbalken) bezogen auf das 6 Wochen alte Startkollektiv (gestrichelte Linie). Gruppenvergleiche zu einem Alter von 6 Wochen sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben..... 54

Abbildung 14: Altersabhängige Expression des 5-HT_{2A}Rs und 5-HT_{2B}Rs in WIS und SHR. **A-C** beziehen sich auf Analysen des 5-HT_{2A}Rs. **D-F** beziehen sich auf Analysen des 5-HT_{2B}Rs. **A und D** Dargestellt sind die einzelnen ΔC_T -Werte an den Altersstufen 6, 30 und 46 Wochen. Je Gruppe und Zeitpunkt sind sechs biologische Replikate (N = 6) als schwarzer Kreis (WIS) und rotes Quadrat (SHR) abgebildet. Verbunden sind die arithmetischen Mittelwerte. Gruppenvergleiche zwischen WIS und SHR und innerhalb der einzelnen Gruppen wurden mittels *two-way ANOVA* und *Šidák's multiple comparisons test* geprüft und sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben. **B, C, E und F** Dargestellt sind die FCs für WIS (schwarzer Kreis) und SHR (rotes Quadrat) sowie deren 95 %-KI (Fehlerbalken) bezogen auf das Startkollektiv mit einem Alter von 6 Wochen (gestrichelte Linie).

Gruppenvergleiche zu einem Alter von 6 Wochen sind als p-Wert über den Altersstufen angegeben..... 56

Abbildung 15: Heatmap-Diagramm der Expressionsanalysen im Herzgewebe. A Dargestellt ist der altersabhängige Verlauf der Genexpression bei WIS und SHR. B Dargestellt ist der altersabhängige Verlauf der Genexpression bei SHR-Kontrolle und SHR-Läufer. A und B Dargestellt sind die als Farbcode kodierten arithmetischen Mittelwerte der ΔC_T -Werte von sechs biologischen Replikaten (N = 6) je Gen (Y-Achse) und Altersstufe (X-Achse). Unterschiede in der relativen Genexpression über die Zeit können dem Farbcode entnommen werden. Niedrige ΔC_T -Werte entsprechen einer abnehmenden Expression, hohe ΔC_T -Werte zeigen dementsprechend eine zunehmende Expression an. Die Zuteilung der Farben zu den entsprechen ΔC_T -Werten ist der rechtsstehenden Legende zu entnehmen. Gruppenvergleiche innerhalb der einzelnen Gruppen wurden stets in Bezug zum 6 Wochen alten Startkollektiv mittels *two-way ANOVA* und *Šidák's multiple comparisons test* geprüft. Signifikante Ergebnisse (p-Wert < 0,05) sind als Stern (*) markiert angegeben..... 58

Abbildung 16: Altersabhängige Expressionsveränderungen Serotoninstoffwechsel-assoziierter Enzyme im Rattenherz. Dargestellt sind die altersabhängigen Expressionsveränderungen der untersuchten Enzyme in einem Übersichtsbild mit nachfolgender Einordnung in den Serotonin- und MAO-A-Stoffwechsel. Die Expressionsveränderungen sind für WIS und SHR als Pfeile angegeben und befinden sich jeweils rechts oben neben den betreffenden Enzymen. Die Unterschiede in der Expression zwischen WIS und SHR sind durch einen Schrägstrich getrennt, wobei Pfeile links des Schrägstrichs auf WIS bezogen sind und Pfeile rechts des Schrägstrichs Expressionsveränderungen in SHR wiedergeben. Die Expressions-veränderungen sind stets in Bezug auf das 6 Wochen alte Startkollektiv gesetzt und entweder als Abnahme (\downarrow), Zunahme (\uparrow) oder keine relevante Veränderung (-) kodiert dargestellt. Sofern keine Expressionsanalyse für ein dargestelltes Element vorliegt, ist dieses mit einem Fragezeichen versehen. Besonders starke Ab- bzw. Zunahmen sind als doppelte Pfeile abgebildet. MAO-A ist bei WIS und SHR stark hochreguliert. Ein vermehrtes Angebot durch Serotonin (5-HT) erscheint aufgrund der deutlichen Abnahme der Expression des SERTs in WIS und SHR unwahrscheinlich. Möglicherweise wird vermehrt Serotonin intrazellulär über weitere Transporter aufgenommen (PMAT und OCT, Expression wurde für die untersuchte Kohorte nicht bestimmt). Ebenfalls von Bedeutung erscheint Noradrenalin (NA), das als spezifisches

MAO-A-Substrat durch ein hohes intrazelluläres Angebot eine Steigerung der Expression der MAO-A bedingen könnte. Die ALDH2 und die Katalase sind in ihrer Expression in WIS und SHR nicht relevant verändert. Es liegen jedoch Hinweise vor, die eine vorrangige Bedeutung der Glutathionperoxidase bei MAO-A-Überexpression nahe legen.¹⁴⁷ Die Glutathionperoxidase (Expression wurde für die untersuchte Kohorte nicht bestimmt) kann anfallendes Wasserstoffperoxid reduzieren, indem Glutathion zu Glutathiondisulfid oxidiert wird.⁸⁶ Darüber hinaus konnten keine relevanten Expressionsveränderungen der beiden Rezeptoren, 5-HT_{2A}R und 5-HT_{2B}R, beobachtet werden..... 71

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Rekalzifizierungs- und Zentrifugationsschritte. Beschrieben sind die vier erforderlichen Schritte der Rekalzifizierung und Zentrifugation im Rahmen der Zellisolation an der Langendorff-Perfusionsanlage. Das verwendete Powell-Medium wurde auf 37 °C erwärmt und durchgehend mit Carbogen begast. Vor Zugabe des Powell-Mediums wurde die erforderliche Menge an Calciumchlorid (CaCl₂) hinzugegeben und vermischt. 26

Tabelle 2: Kontraktionsparameter. Angegeben sind die Kontraktionsparameter, deren Einheit und Beschreibung, die durch das Programm Mucell als Excel-kompatible Tabelle ausgegeben wurden. Verwendet wurde bei jedem Parameter das arithmetische Mittel aus vier einzelnen Messungen. Im Regelfall beschränkte sich die Darstellung auf die relative Zellverkürzung (dL/L) in %. 29

Tabelle 3: Kontraktionsparameter unter Einfluss von Clg. Dargestellt sind die Mittelwerte der jeweiligen Kontraktionsparameter und deren p-Werte in Bezug zur Kontrollgruppe. Die statistische Testung erfolgte durch Anwendung eines *one-way ANOVAs* mit multiplem Testen unter Tukey-Korrektur. Die Kontrollgruppe wurde durch die äquivalente Zugabe von *Aqua bidest.* definiert. 76

Tabelle 5: Weitere Kontraktionsparameter unter kurzfristigem Einfluss von Serotonin und Clg. Dargestellt sind die Mittelwerte der jeweiligen Kontraktionsparameter und deren p-Werte in Bezug zur Kontrollgruppe. Die statistische Testung erfolgte durch Anwendung eines *one-way ANOVAs* mit multiplem Testen unter Tukey-Korrektur. Die Kontrollgruppe wurde durch die äquivalente Zugabe von *Aqua bidest.* definiert. 76

Tabelle 6: Weitere Kontraktionsparameter unter langfristigem Einfluss von Serotonin und Clg. Dargestellt sind die Mittelwerte der jeweiligen Kontraktionsparameter und deren p-Werte in Bezug zur Kontrollgruppe. Die statistische Testung erfolgte durch Anwendung eines *one-way ANOVAs* mit multiplem Testen unter Tukey-Korrektur. Die Kontrollgruppe wurde durch die äquivalente Zugabe von *Aqua bidest.* definiert. 77

12 Publikationsverzeichnis

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen als Kongressbeitrag oder Zeitschriftenartikel veröffentlicht und sind nachfolgend aufgeführt.

Knittel J., Schreckenbergr R., Heger J., Schlüter K-D. Monoamine oxidase A-mediated effects of serotonin on rat heart. (2022) Poster Session B, Acta Physiologica, 236.
<https://doi.org/10.1111/apha.13877>

Knittel J., Itani N., Schreckenbergr R., Heger J., Rohrbach S., Schulz R., Schlüter K-D. Monoamine Oxidase A Contributes to Serotonin—But Not Norepinephrine-Dependent Damage of Rat Ventricular Myocytes. *Biomolecules*. 2023; 13(6):1013.
<https://doi.org/10.3390/biom13061013>

13 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Die Unterschrift wurde in der veröffentlichten Fassung des Dokumentes entfernt.

Gießen, den 30.01.2024

Jonas Knittel

14 Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Klaus-Dieter Schlüter für die Möglichkeit der Promotion in seiner Arbeitsgruppe. Seine hervorragende wissenschaftliche Betreuung, Hilfestellungen bei Unklarheiten und nicht zuletzt auch die anhaltende Unterstützung, derer ich mir immer sicher sein konnte, haben diese Arbeit erst ermöglicht. Herzlichen Dank!

Ebenso möchte ich mich bei PD Dr. Rolf Schreckenbergs bedanken, der mir bei methodischen und fachlichen Fragen stets zur Seite stand. Darüber hinaus gilt mein Dank Prof. Dr. Rainer Schulz und PD Dr. Jacqueline Heger für den guten fachlichen Austausch und die daraus entstandenen weiteren Ansätze dieser Arbeit. Ebenfalls möchte ich mich für die methodische Unterstützung bei Dr. Martin Weber bedanken.

Ohne die angenehme zwischenmenschliche Atmosphäre innerhalb der Arbeitsgruppe und des Institutes wäre diese Arbeit ebenfalls nicht möglich gewesen. Hierzu bedanke ich mich bei den technischen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern: Anna Reis, Karin Westermann, Martin Heisler, Nadine Woitasky und Peter Volk. Auch bedanke ich mich für den kollegialen Zusammenhalt bei den Doktorandinnen und Doktoranden des Institutes: Annemarie Wolf, Felix Atmanspacher, Hanna Kutsche, Laureen Czech und Paulin Brosinsky.

Bedanken möchte ich mich auch bei dem Dekanat des Fachbereiches Medizin, das mir durch das JLU-TRAINEE-Programm eine finanzielle Förderung und den fachlichen Austausch zu weiteren Doktorandinnen und Doktoranden ermöglichte. Ebenso gilt mein Dank der Deutschen Physiologischen Gesellschaft ohne deren Förderung meine Teilnahme an der Europhysiology 2022 in Kopenhagen nicht möglich gewesen wäre.

Eine gute Arbeit ist niemals ohne den Rückhalt von Familie und Freunden möglich. Hierzu bedanke ich mich vor allem bei meiner Partnerin, Lea Schmidt, die mich in den letzten Jahren immer unterstützte und motivierte. Felix Hempel gilt ebenso mein Dank für die hervorragende freundschaftliche Unterstützung und ein offenes Ohr für alle meine Fragen. Philip Drobny danke ich für das Auffinden grammatikalischer Fehler und deren Korrektur.

15 Tabellarischer Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde in der veröffentlichten Fassung des Dokumentes entfernt.