

**Untersuchung der fibrotischen Effekte des
Dopaminagonisten Cabergolin an Herzklappen des
Schweins**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Alexandra Kekewska
aus Sofia (Bulgarien)

2013

Diese Arbeit wurde unter der Anregung und Leitung von Prof. Dr. H. Pertz vom November 2008 bis zum Dezember 2011 am Institut für Pharmazie der FU Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Heinz H. Pertz
Institut für Pharmazie
Freie Universität Berlin
Königin-Luise-Straße 2+4
14195 Berlin

2. Gutachter: Prof. Dr. G. Weindl
Institut für Pharmazie
Freie Universität Berlin
Königin-Luise-Straße 2+4
14195 Berlin

Disputation am: 29.05.2013

Mein Doktorvater Prof. Dr. H. Pertz stand mir bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit stets mit seiner wissenschaftlichen Erfahrung, vor allem aber jederzeit mit inspirierenden Diskussionen und hilfreichen Ratschlägen kompetent zur Seite. Dafür, für die Überlassung des Themas und für die angenehme Arbeitsatmosphäre möchte ich ihm ganz herzlich danken.

Ebenfalls herzlich danken möchte ich Prof. Dr. G. Weindl für seine wertvollen fachlichen Ratschläge bei der praktischen Laborarbeit sowie für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Für die Bereitstellung der Mittel (Projekt PE1428/2-1 der DFG) sowie der Promotionsstipendien danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Kommission zur Vergabe von Promotionsstipendien des Landes Berlin nach dem Nachwuchsförderungsgesetz (NaFöG).

Für die Durchführung der externen Untersuchungen an Dopamin D₂-Rezeptoren sei Herrn Prof. Dr. P. Gmeiner und Dr. H. Hübner von der Friedrich–Alexander-Universität, Erlangen gedankt.

Besonders verbunden bin ich auch Prof. Dr. B. Kleuser und Prof. Dr. M. Schäfer-Korting und ihren Arbeitskreisen. Sie gaben mir die Möglichkeit, meine Arbeiten im Zelllabor des Arbeitskreises durchzuführen. Frau Hannelore Gonska danke ich in diesem Zuge für die Einarbeitung in die Zellkultur und die ungezählten praktischen Tipps.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Peter Witte, Nora Reitner, Sunna Scholz und Ina Lucas für die angenehme Atmosphäre während der Betreuung des Praktikums des 4. Semesters bedanken.

Herrn Florian Jantschak danke ich für die stets kollegiale Zusammenarbeit im Labor.

Dr. Tobias Baselt, Dr. Kemal Yildiz, Dres. Cherine und Sigward von der Laue, Dr. Ulrike Stosch und Nathalie Eckel standen mir besonders im letzten Dissertationsjahr zur Seite. Für das aufmerksame Korrekturlesen dieser Arbeit und die ermutigenden Worte während des Zusammenschreibens der Dissertation gebührt Ihnen mein aufrichtiger Dank.

Dr. Tobias Baselt und Dr. Sven Schwertfeger danke ich für die technische Unterstützung bei der graphischen Gestaltung dieser Arbeit.

Für die angenehme Atmosphäre im Labor, vor allem aber für die Unternehmungen außerhalb des Labors und für ihre Freundschaft danke ich besonders Dr. Cherine Ali von der Laue, Nada Charbaji, Stephanie Bock und Nesrin Alnasif.

Ganz besonderer Dank gilt meinen lieben Eltern Irina und Valeri Kekevski. Sie haben mich während meines Studiums in Deutschland und während der Anfertigung dieser Arbeit nach Kräften unterstützt. Ohne ihren uneingeschränkten, liebevollen Rückhalt und ohne ihre Geduld wäre die Anfertigung dieser Arbeit undenkbar gewesen.

Schlussendlich sei den zahlreichen Freunden und Helfern von Herzen gedankt, die an dieser Stelle ungenannt geblieben sind. Sie haben mit ihrem Interesse, ihren Ermutigungen und ihrer moralischen Unterstützung einen Anteil am Gelingen dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Cabergolin, pharmakologische Eigenschaften und Anwendung bei der Therapie von M. Parkinson und der Hyperprolaktinämie	1
1.2 Fibrotische Erkrankungen der Herzklappen als unerwünschte Arzneimittelwirkung.....	5
1.2.1 Cabergolin-induzierte Herzklappenfibrosen	5
1.2.2 Fibrotische Effekte an Herzklappen in Zusammenhang mit anderen Therapeutika mit Ergolinstruktur	7
1.2.3 Amphetaminderivate in Zusammenhang mit Herzklappenfibrosen.....	9
1.2.4 Herzklappenfibrosen beim Karzinoidsyndrom.....	10
1.3 Pathologische Veränderungen an den Herzklappen bei der Fibrose	11
1.3.1 Aufbau und Funktion der Herzklappen.....	11
1.3.2 Pathologische Befunde bei der Herzklappenerkrankung	13
1.4 Molekulare Mechanismen der Herzklappenfibrose.....	15
1.4.1 Serotonin und serotonerge Rezeptoren	15
1.4.2 Rolle von Serotonin und Serotonin-Rezeptoraktivierung bei der Entstehung fibrotischer Herzklappenerkrankungen.....	20
1.4.3 Beteiligung von intrazellulären Signalwegen an der Herzklappenfibrose	23
1.5 Zielsetzung.....	25
2 Material und Methoden	27
2.1 Material.....	27
2.1.1 Technische Geräte	27
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	28
2.1.3 Chemikalien und Substanzen.....	28
2.1.4 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen	31
2.2 Methoden.....	36
2.2.1 Untersuchungen an isolierten Organen (Organbadstudien)	36
2.2.2 Isolierung der primären Kultur von Herzklappeninterstitialzellen	41
2.2.3 Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen.....	43
2.2.4 Proteinbiochemische Untersuchungen.....	44

2.2.5	Radiometrische Untersuchungen	47
2.2.6	Datenanalyse und Statistik	50
3	Ergebnisse	54
3.1	Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung des molekularen Fragments, das für den Cabergolinagonismus an den 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Rezeptoren verantwortlich ist.....	54
3.1.1	Effekte von Cabergolin und seinen Derivaten an 5-HT _{2A} -Rezeptoren in der Koronararterie des Schweins	55
3.1.2	Effekte von Cabergolin und seinen Derivaten an 5-HT _{2B} -Rezeptoren in der Pulmonalarterie des Schweins	60
3.1.3	Effekte von Cabergolin und 6-Methylcabergolin an rekombinanten humanen D _{2Long} - und D _{2Short} -Rezeptoren	64
3.2	Charakterisierung der kontraktile Effekte von Cabergolin an der Aortenklappe vom Schwein	67
3.3	Charakterisierung der Herzklappeninterstitialzellen vom Schwein	69
3.4	Einfluss von 5-HT, Cabergolin und 6-Methylcabergolin auf die Phosphorylierung von Extracellular-Signal Regulated Kinasen ERK 1/2 in Interstitialzellen der Herzklappen	71
3.5	Einfluss von 5-HT, Cabergolin und 6-Methylcabergolin auf die Biosynthese der extrazellulären Matrix (ECM)	74
3.5.1	Einfluss auf die Neusynthese von Kollagen (Einbau von [³ H]-Prolin)	74
3.5.2	Einfluss auf die Neusynthese von Glykosaminoglykan (GAG) (Einbau von [³ H]-Glucosamin)	77
3.6	Beteiligung von Signalkaskaden an den kontraktile Effekten der Schweineaortenklappe	78
3.7	Beteiligung von Signalkaskaden an der Biosynthese von Kollagen	80
3.8	Einfluss von Cabergolin und Serotonin auf die Zellproliferation und Beteiligung der ERK 1/2-Kinasen	81
3.9	Effekte von Tergurid auf die ECM-Biosynthese und ERK 1/2-Aktivierung	82
4	Diskussion	83
4.1	Einfluss der Seitenkette in Position 6 im Cabergolinmolekül auf die pharmakologischen Eigenschaften.....	83

4.1.1	Einfluss der Seitenkette in Positon 6 im Cabergolinmolekül auf die Eigenschaften an 5-HT _{2A} - und 5-HT _{2B} -Rezeptoren.....	83
4.1.2	Einfluss der Seitenkette in Positon 6 im Cabergolinmolekül auf die pharmakologischen Eigenschaften an D ₂ -Rezeptoren.....	85
4.1.3	Schlussfolgerungen.....	86
4.2	Bedeutung der 5-HT-Rezeptoren für die Kontraktionsfähigkeit und das mechanische Verhalten der Herzklappen.....	87
4.3	Zellspezifische Untersuchungen zum frühen Mechanismus der Cabergolin-induzierten Fibrose.....	89
4.3.1	Charakterisierung der VICs-Primärkultur.....	89
4.3.2	Cabergolin-induzierte Aktivierung der ERK 1/2 Signalkaskade.....	90
4.3.3	Mitogene Effekte von Cabergolin.....	94
4.3.4	Effekte von Cabergolin auf die Synthese der extrazellulären Matrix (ECM).....	95
4.4	Rolle der ERK 1/2 MAP-Kinase und der Src-Tyrosinkinase für die Cabergolin induzierten fibrotischen Veränderungen.....	98
4.4.1	Beteiligung der ERK 1/2 an der Cabergolin-induzierten Biosynthese der ECM.....	98
4.4.2	Rolle der Src-Kinasefamilie für die Cabergolin-induzierte Biosynthese der ECM.....	99
4.4.3	Rolle der ERK 1/2 Kinasen und der Src-Tyrosinkinasen für die Kontraktionsmechanismen der Aortenklappe.....	100
4.5	Antifibrotische Wirkung von Tergurid.....	101
4.6	Ausblick.....	104
5	Zusammenfassung.....	106
6	Summary.....	109
	Literaturverzeichnis.....	112

Abkürzungsverzeichnis

Ab	Antikörper
ADH	Aldehyddehydrogenase
ANOVA	einfaktorielle Varianzanalyse (analysis of variance)
BSA	Serumalbumin vom Rind (bovine serum albumin)
BW723C86	α -Methyl-5-(2-thienylmethoxy)-1 <i>H</i> -indol-3-ethanamin hydrochlorid
CHO-Zellen	Zellen aus den Ovarien chinesischer Hamster
CRC	Konzentrations-Wirkungskurve (concentration-response curve)
5-CT	5-Carboxamidotryptamin Maleat
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM/F12	Dulbecco`s modified Eagle`s medium/Ham`s Nutrition Mixture F 12, 1 :1
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EMA	European Medicines Agency
E_{\max}	maximaler beobachteter Effekt
ERK	extrazellulär regulierte Kinase (extracellular signal-regulated kinase)
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
GAG	Glykosaminoglykan
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G protein-coupled receptor, G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GR127935	<i>N</i> -[4-Methoxy-3-(4-methyl-1-piperazinyl)phenyl]-2'-methyl-4'-(5- methyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)-1,1'-biphenyl-4-carboxamid hydrochlorid
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
h-Rezeptor	humaner (Rezeptor)

HRP	Meerrettichperoxidase
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
IUPHAR	International Union of Basic and Clinical Pharmacology
kDa	Kilodalton
KHS	Krebs-Henseleit-Lösung
LAF	Laminar Air Flow, Sterilwerkbank
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
MAO	Monoaminoxidase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase (mitogen-activated protein kinase)
MDL100907	(<i>R</i>)-(+)- α -(2,3-Dimethoxyphenyl)-1-[2-(4-fluorophenyl)ethyl]-4-piperidinemethanol
MDMA	3,4-Methylendioxy- <i>N</i> -methyldamphetamin
MEK	Mitogen activated protein kinase kinase
min	Minute
MMP	Matrix-Metalloprotease
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PD	Parkinsonsche Krankheit (Parkinson's disease)
PD98059	2-(2-Amino-3-methoxyphenyl)-4 <i>H</i> -1-benzopyran-4-on
pEC ₅₀	negativer, dekadischer Logarithmus der molaren Stoffmengenkonzentration eines Agonisten, die halbmaximalen Effekt hervorruft
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfoxid
PP2	4-Amino-3-(4-chlorophenyl)-1-(<i>t</i> -butyl)-1 <i>H</i> -pyrazolo[3,4- <i>d</i>]-pyrimidin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA	Radioimmunopräzipitation-Pufferlösung
SB204741	<i>N</i> -(1-Methyl-1 <i>H</i> -5-indolyl)- <i>N</i> '-(3-methyl-5-isothiazolyl)harnstoff
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
S.E.M.	Standardfehler des Mittelwerts (standard error of the mean)
SERT	Serotonintransporter

[³⁵ S]GTPγS	Guanosin 5'-O-[gamma-thio]triphosphate
α-SMA	glattmuskuläres alpha-Aktin (α-smooth-muscle-actin)
Src	Src-Tyrosinkinase
TCA	Trichloressigsäure
TCB-2	(4-Bromo-3,6-dimethoxybenzocyclobuten-1-yl)-methylamin hydrobromid
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor β
TIMP	tissue inhibitor of MMPs
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Triton X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U0126	1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadien
U46619	9,11-dideoxy-9α,11α-epoxymethano-prostaglandin F _{2α}
VECs	Herzklappenendothelzellen (valvular endothelial cells)
VICs	Interstitialzellen der Herzklappen (valvular interstitial cells)
vWF	von Willebrand Faktor

1 Einleitung

1.1 Cabergolin, pharmakologische Eigenschaften und Anwendung bei der Therapie von M. Parkinson und der Hyperprolaktinämie

Cabergolin ((8 β)-*N*-[3-(Dimethylamino)propyl]- *N*-[(ethylamino)carbonyl]-6- (2-propenyl)-ergolin-8-carboxamid) ist ein therapeutisch verwendeter Arzneistoff, der anhand seiner chemischen Struktur zur Gruppe der synthetischen Ergoline gehört. Ergoline zählen zu den Indolalkaloiden und enthalten ein tetrazyklisches partiell hydrogeniertes Indol-[4,3-*f,g*]-Chinolin Grundgerüst, dessen Trivialnamen „Ergolin“ auch die Substanzklasse bezeichnet (Abb. 1) (Schiff, 2006). Isoliert wurden die Ergoline aus dem phytoparasitären Mutterkornpilz (*Claviceps purpurea*), der vor allem Roggen befällt (Hulvova et al., 2013). Die natürlichen und synthetischen Ergoline weckten das Forschungsinteresse durch ihr breites Spektrum an peripheren und zentralen pharmakodynamischen Wirkungen, die auf den Agonismus, Partialagonismus oder Antagonismus an adrenergen, dopaminergen und serotonergen Rezeptoren zurückzuführen sind (Emilien et al., 1999; Görnemann et al., 2008b; Mantegani et al., 1999; Pertz und Eich, 1999).

Cabergolin ist ein Agonist an den Dopamin D₂-Rezeptoren und wird bei der Therapie der Parkinson'schen Krankheit (Parkinson's disease PD) eingesetzt (Kvernmo et al., 2006). Die Parkinson'sche Krankheit (PD) ist eine chronische neurodegenerative Erkrankung, die mit dem Untergang dopaminergener Neuronen in der Substantia nigra sowie einem nachfolgenden Dopaminmangel im Striatum einhergeht und deren primäre Ursache ungeklärt ist (Radad et al., 2005). Die Gesamtprävalenz der PD in europäischen Industrieländern wird auf 65.6 bis 12 500 pro 100 000 geschätzt (von Campenhausen et al., 2005). Die Prävalenz der Erkrankung steigt mit dem Alter und beträgt 1.8 % in der europäischen Bevölkerung über 65 Jahre (de Rijk et al., 2000; Rajput, 1992). Die Hauptsymptomatik äußert sich in der Beeinträchtigung der motorischen Funktionen durch Ruhetremor, Rigidität und Bradykinesie. Weitere nichtmotorische Symptome sind vegetative Störungen, Demenz, Depression und Schlafstörungen (Samii et al., 2004). Der Dopamin-Vorläufer L-Dihydroxyphenylalanin (Levodopa) kann die motorischen Symptome effektiv kontrollieren und ist derzeit das wirksamste Mittel zur Therapie der PD (Munchau und Bhatia, 2000). Allerdings kommt es durch den Verlust von dopaminergen Nervenendigungen mit Fortschreiten der Erkrankung nach längerer Anwendungszeit zu motorischen Fluktuationen,

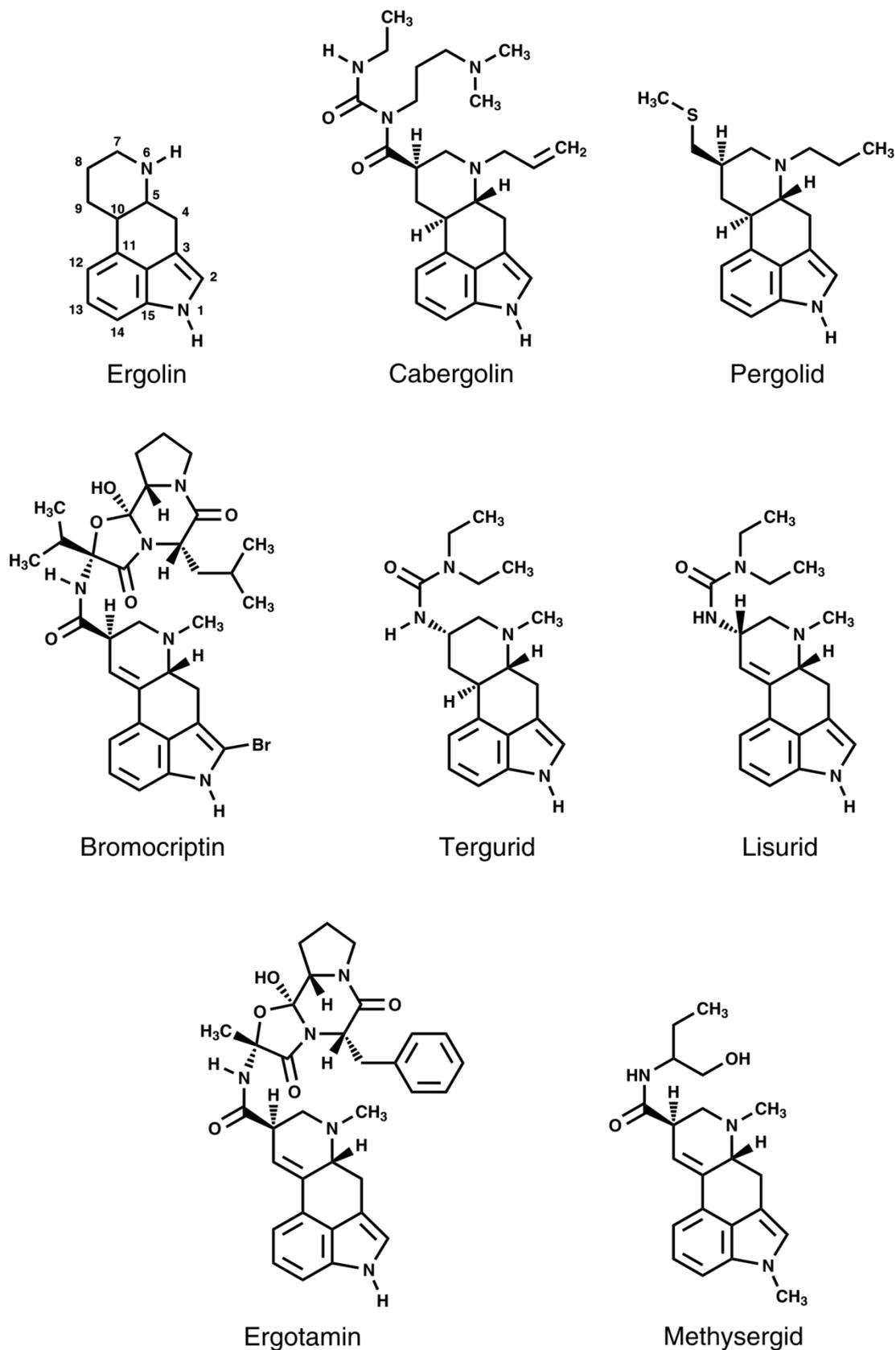


Abb. 1 Chemische Struktur von Ergolin und einigen therapeutisch verwendeten partialsynthetischen Ergolin-Derivaten.

Dyskinesien und Wirksamkeitsverlust („wearing off“) (Jankovic, 2002; Munchau und Bhatia, 2000). Nach 5 - 10 Jahren Behandlung mit Levodopa erleiden 50-80 % der Patienten motorische Komplikationen (Bracco et al., 2004; Rinne, 1978). Dopaminagonisten wie Cabergolin stimulieren postsynaptische D₂-Rezeptoren an nigrostriatalen dopaminergen Neuronen und verbessern die motorischen Symptome bei Parkinson-Patienten (Guttman und Jaskolka, 2001; Jenner, 2002). Es sind zwei verschiedene Splicing-Varianten der D₂-Rezeptoren bekannt: die kurze D_{2Short(S)} und die lange D_{2Long(L)} Isoform. Die D_{2S}- und die D_{2L}-Rezeptoren unterscheiden sich durch deren Effekte an den prä- und postsynaptischen Neuronen sowie bezüglich der Kontrolle von motorischen und kognitiven Funktionen (De Mei et al., 2009; Usiello et al., 2000; Wang et al., 2000). Weitere halbsynthetische Ergolinderivate für die Therapie von Morbus Parkinson sind Pergolid, Bromocriptin und Lisurid. Die neue Generation von Dopaminagonisten wie Ropinirol, Pramipexol und Piribedil besitzen keine Ergolinstruktur (Emilien et al., 1999). Weiterhin sind die Dopaminagonisten in der Lage, die kognitiven Funktionen bei Parkinson Patienten zu verbessern (Nagaraja und Jayashree, 2001; Weddell und Weiser, 1995). Durch die direkte und länger andauernde Rezeptorstimulation durch die Dopaminagonisten treten motorische Komplikationen bei Patienten mit initialer Monotherapie mit Dopaminagonisten seltener auf als bei der Initialtherapie mit L-DOPA (Inzelberg et al., 2003; Rascol et al., 2000; Tambaşco et al., 2012). Cabergolin hat eine längere Halbwertszeit (63 - 68 h) als andere Dopaminagonisten und kann daher einmal täglich verabreicht werden (Bracco et al., 2004). Durch die kontinuierliche länger andauernde dopaminerge Wirkung und das Vermeiden rascher Fluktuationen in der Rezeptorstimulation sind Dopaminagonisten oder der Zusatz eines Dopaminagonisten zur Therapie mit Levodopa vorteilhaft zur Vermeidung von Dyskinesien (Stocchi, 2003; Tambaşco et al., 2012). Eine doppelblinde, Levodopa kontrollierte Studie über 5 Jahre zeigte ein mehr als 50 % geringeres relatives Risiko für das Auftreten von motorischen Komplikationen in der Cabergolin-Gruppe verglichen mit der Levodopa-Gruppe (Bracco et al., 2004). Die Kombination aus Levodopa mit Dopaminagonisten verringert die unerwünschten motorischen Komplikationen und die Levodopadosierung und verlängert die Zeit, in der der Levodopa klinisch wirksam ist (Munchau und Bhatia, 2000; Rinne et al., 1998). Durch die Levodopa-sparende Wirkung kommt es zur Verminderung der bei der oxidativen Metabolisierung von Levodopa bzw. von Dopamin entstehenden freien Radikale und dadurch zu einem möglichen neuroprotektiven Effekt der Dopaminagonisten (Radad et al., 2005). Auch die Stimulation von dopaminergen

Autorezeptoren und die nachfolgende Verminderung von Dopaminsynthese und –metabolismus, antiapoptotische sowie direkte antioxidative Effekte werden als alternative mögliche Mechanismen für die neuroprotektiven Eigenschaften der Dopaminagonisten in der Literatur diskutiert (Herrero et al., 2011; Kitamura et al., 2003; Schapira, 2003). Dopaminagonisten sind Mittel der ersten Wahl bei der initialen Therapie von Patienten im Alter unter 70 Jahre (Munchau und Bhatia, 2000; Samii et al., 2004).

Weiterhin findet Cabergolin therapeutische Anwendung bei der Hyperprolaktinämie und zum Abstillen (Andreotti et al., 1995). Prolaktin ist ein Polypeptidhormon, das in spezialisierten laktotrophen Zellen der Adenohypophyse synthetisiert wird und die Milchsekretion stimuliert. Darüber hinaus ist Prolaktin an diversen biologischen Funktionen beteiligt, unter anderem an Verhalten, Metabolismus und Aufrechterhaltung der Homöostase (Freeman et al., 2000). Ein erhöhter Prolaktin-Plasmaspiegel wird meistens mit benignen Prolaktin-sezernierenden Tumoren der Hypophyse (Prolaktinomen) assoziiert und führt zur Infertilität und Amenorrhoe bei Frauen und zu Hypogonadismus, sexuellen Dysfunktionen und Galaktorrhoe bei beiden Geschlechtern (Colao und Lombardi, 1998). Dopamin bzw. Dopaminagonisten wie Cabergolin haben durch einen negativen Rückkopplungs-Mechanismus einen hemmenden Effekt auf die Prolaktinfreisetzung (Freeman et al., 2000; Moore, 1987). Die Stimulation der D₂-Rezeptoren an den laktotrophen Zellen im Hypophysenvorderlappen und die nachfolgende negative Kopplung an der Adenylylcyclase führt zur Hemmung der Prolaktinsekretion und -synthese (Ben-Jonathan und Hnasko, 2001). Desweiteren reduzieren Dopaminagonisten die Prolaktinomgröße (Colao et al., 1997). Cabergolin ist ein potenter Inhibitor der Prolaktin-Sekretion. Studien an gesunden männlichen Probanden zeigen, dass eine Einzeldosis von 0.2 mg bereits nach 4 Stunden und bis zu 4 Tagen den Prolaktinspiegel senken kann (Pontiroli et al., 1987). Eine zweimalwöchentliche Anwendung von Cabergolin in einer Dosierung von 0.5 bis 1 mg ist ausreichend für die Normalisierung des Prolaktinspiegels (Rains et al., 1995).

In den letzten Jahren zeigten einige Studien, dass Cabergolin auch bei der Behandlung anderer endokrinologischer Funktionsstörungen wie der Akromegalie und dem Cushing-Syndrom sowie bei dem „Restless legs“ Syndrom effektiv ist (Bertrand et al., 2010; Mattar et al., 2010; Oertel et al., 2006; Petrossians et al., 2010; Scholz et al., 2011; Vilar et al., 2011).

1.2 Fibrotische Erkrankungen der Herzklappen als unerwünschte Arzneimittelwirkung

1.2.1 Cabergolin-induzierte Herzklappenfibrosen

Sowohl zahlreiche klinische Studien als auch Beobachtungsstudien berichten in den letzten Jahren über einen kausalen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Herzklappenfibrosen und Herzklappenfunktionsstörungen wie Regurgitation (Rückfluss von Blut infolge einer Klappeninsuffizienz) mit der Anwendung von Cabergolin und Pergolid als Antiparkinsonmittel (Abb. 1) (Andersohn und Garbe, 2009; Antonini und Poewe, 2007; Horvath et al., 2004; Pinero et al., 2005; Rasmussen et al., 2011). Der erste Fallbericht über diese unerwünschten Nebenwirkungen erschien im Jahr 2002 und zeigte eine ungewöhnliche Morphologie mit fibrotischen Läsionen der Klappen sowie schwerwiegende Regurgitationen an drei Patienten, die Pergolid für PD einnahmen (Pritchett et al., 2002). In einer echocardiographischen Studie im Jahr 2004 fanden van Camp et al. eine mittelschwere bis schwerwiegende Herzklappen-erkrankung bei 19 % der mit Pergolid behandelten Patienten vs. 0 % bei den Patienten, die nicht mit Ergotderivaten behandelt wurden. Sechs Monate nach Absetzen der Pergolideinnahme wurde in 2 von 6 untersuchten Patienten eine Regression der Erkrankung gefunden. Schade et al. (2007) evaluierten in einer retrospektiven Studie Daten aus der britischen „General Practice Research Database“ von 11 417 Patienten, die Dopaminagonisten einnahmen und keine medizinische Vorgeschichte einer Herzerkrankung hatten. Die Inzidenzrate der aufgetretenen Herzklappenregurgitationen war bei Patienten, die mit Pergolid oder Cabergolin behandelt wurden, im Vergleich zu Kontrollgruppe erhöht, aber nicht bei den Patienten, die Lisurid, Bromocriptin oder die Dopaminagonisten der neuen Generation wie Ropinirol und Pramipexol oder eine andere pharmakologische Behandlung der PD erhielten. Das Risiko für Regurgitationen war bei einer Tagesdosis von mehr als 3 mg pro Tag sowohl für Cabergolin als auch für Pergolid sowie bei einer Behandlungsdauer länger als 6 Monate höher. Eine weitere echocardiographische Studie berichtete über eine signifikant höhere Prävalenz von mittelschweren bis schwerwiegenden Regurgitationen in allen Herzklappen bei Patienten behandelt mit Cabergolin (28.6 %) oder Pergolid (23.4 %) im Vergleich zur Kontrollgruppe (5.6 %) oder zur Patientengruppe, die Dopaminagonisten ohne Ergolinstruktur einnahmen (0 %) (Zanettini et al., 2007). Die Autoren zeigten eine Korrelation zwischen der mittleren kumulativen Dosis Cabergolin oder Pergolid und dem Schweregrad der Regurgitationen. In einer Nachfolgestudie wurden die Fälle mit

schwerwiegenden Regurgitationen 22 Monate nach der Einstellung der Behandlung mit Cabergolin oder Pergolid erneut echokardiographisch untersucht (Zanettini et al., 2011). Bei ungefähr der Hälfte der Patienten, bei denen nur eine der Herzklappen betroffen war und bei ca. einem Drittel der Patienten, bei denen mehrere Herzklappen betroffen waren, zeigte sich eine Regression der Erkrankung. Bei Patienten, die weiterhin mit Cabergolin oder Pergolid behandelt wurden, wurde eine Progression beobachtet. Infolge der vermehrten Berichte und klinischen Studien über die fibrotischen Nebenwirkungen an den Herzklappen wurde Pergolid im Jahr 2007 vom US-amerikanischen Markt zurückgenommen (Antonini und Poewe, 2007). Cabergolin und Pergolid sind derzeit in Europa noch zugelassen, allerdings werden sie nicht mehr als Mittel der ersten Wahl bei der Therapie der PD eingestuft und die maximale Tagesdosis wurde für beide Substanzen auf 3 mg reduziert (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, 2008; European Medicines Agency, 2008). Vor Beginn sowie regelmäßig während einer Langzeitanwendung beider Arzneistoffe sind diagnostische Untersuchungen auf Herzklappenerkrankungen notwendig.

Es ist derzeit nicht eindeutig geklärt, ob die Behandlung mit niedrig dosiertem Cabergolin für die Therapie der Hyperprolaktinämie ebenfalls mit einem erhöhten Risiko für Auftreten von Herzklappenfibrosen behaftet ist. Eine klinische Studie mit 119 Patienten, behandelt mit Cabergolin für Hyperprolaktinämie oder Akromegalie mit einer mittleren Dosis von 1 mg pro Woche für die mittlere Dauer von 115 Monaten zeigte, dass die Prävalenz von klinisch relevanten (mittelschweren bis schwerwiegenden) Klappenregurgitationen zwischen der Cabergolin- und der Kontrollgruppe nicht signifikant verschieden war (Lafeber et al., 2010). Die Studie ergab keine Korrelation zwischen der kumulativen Cabergolindosis und dem Auftreten der Regurgitationen. Die Mehrheit der Studien aus den letzten Jahren bestätigt dieses Ergebnis und berichtet, dass bei der niedrigen Dosierung von Cabergolin kein erhöhtes Risiko für Herzklappenerkrankungen besteht (Boguszewski et al., 2012; Herring et al., 2009; Lancellotti et al., 2008; Vallette et al., 2009). Einige Studien ergaben jedoch kontroverse Ergebnisse. Colao et al. (2008) berichten eine signifikant höhere Prävalenz von mittelschweren trikuspidalen Regurgitationen bei den mit Cabergolin behandelten Hyperprolaktinämiepatienten als in der Kontrollgruppe (54 % vs. 18 %). Außerdem traten die Regurgitationen häufiger auf bei den Patienten, die eine höhere kumulative Dosis erhielten. In einem Bericht über 78 Patienten wurde eine höhere Prävalenz von leichten Regurgitationen gefunden (41 vs. 26 %; $P=0.042$) verglichen mit 78 gesunden Probanden als Kontrolle (Kars et al., 2008). Allerdings konnte in derselben Studie kein

Unterschied in der Prävalenz von mittelschweren bis schwerwiegenden Regurgitationen und keine Relation zwischen der kumulativen Dosis und dem Auftreten von Regurgitationen in allen Schweregraden festgestellt werden (Kars et al., 2008). Wakil et al. (2008) zeigten eine höhere Prävalenz von leichten Regurgitationen auf der rechten Herzseite. Leichte Regurgitationen sind allerdings als klinisch nicht relevant einzustufen (Lafeber et al., 2010; Weissman et al., 1998). Mehrere Studien an Parkinsonpatienten ergaben eine Korrelation zwischen der kumulativen Cabergolindosis und dem Risiko für Herzklappenschäden (Schade et al., 2007; Zanettini et al., 2007). Dieser Zusammenhang wurde auch in einer Studie aus Japan ersichtlich, wo die empfohlene Pergolid-Tagesdosis für die Therapie der PD deutlich geringer war als in den europäischen Ländern (1.4 mg statt 3.6 mg) (Yamamoto et al., 2006). Hingegen entsprach die Cabergolin-Tagesdosis der in europäischen Studien. Folglich zeigte sich eine signifikant höhere Prävalenz von Valvulopathien bei der Cabergolin- nicht aber bei der Pergolid-Gruppe. Die mittlere Dosierung bei der Therapie der Hyperprolaktinämie ist nur 0.5 bis 1 mg pro Woche, daher ist kein erhöhtes Risiko für Valvulopathien zu erwarten. Allerdings ist die Therapie der Hyperprolaktinämie mit Dopaminagonisten langfristig oder lebenslang; daher ist ein profibrotischer Langzeiteffekt von Cabergolin nicht auszuschließen (Stephens et al., 2007). Zusätzliche langfristige Studien sind nötig, um das Risiko für niedrig-dosiertes Cabergolin endgültig zu bewerten.

Einige Berichte zeigen, dass die fibrotischen Nebenwirkungen von Cabergolin und Pergolid sich nicht nur auf die Herzklappen beschränken (Agarwal et al., 2004; Gupta und Promnitz, 2005; Müller und Fritze, 2003). Andersohn und Garbe (2009) identifizierten mithilfe des Systems zur Meldung von unerwünschten Arzneimittelwirkungen der US-amerikanischen Zulassungsbehörde FDA „Adverse Event Reporting System“ mehrere Fälle von perikardialen, retroperitonealen und pleuralen Fibrosen sowie von pulmonalen Veränderungen, assoziiert mit der Anwendung von Cabergolin und Pergolid.

1.2.2 Fibrotische Effekte an Herzklappen in Zusammenhang mit anderen Therapeutika mit Ergolinstruktur

Die Antiparkinsonmittel Cabergolin und Pergolid sind nicht die einzigen Ergoline, die fibrotische Veränderungen an den Herzklappen verursachen. Methysergid und Ergotamin sind Ergolinderivate, die für die Migräneprophylaxe zugelassen sind. Bereits 1967, lange Zeit vor den ersten Berichten über die Cabergolin- und Pergolid-induzierten

Herzklappenfibrosen, berichtete Graham über die Entstehung einer Klappeninsuffizienz bei der Anwendung von Methysergid (Graham, 1967). Weitere Berichte in der Literatur beschreiben Herzklappenerkrankungen assoziiert mit Langzeitanwendung von Methysergid und Ergotamin (Hauck et al., 1990; Wilke et al., 1997). Die pathologischen Befunde zeigten Läsionen an verdickten Herzklappensegeln mit Plaque-artigen Gebilden aus proliferierenden Myofibroblasten, eingebettet in einer nicht vaskularisierten kollagenhaltigen Matrix auf beiden Herzseiten (Hendriks et al., 1996; Redfield et al., 1992).

Dennoch kommen die schwerwiegenden Nebenwirkungen auf den Herzklappen nicht bei allen Verbindungen mit Ergolinstruktur vor. Bisher sind keine Herzklappenfunktionsstörungen in Zusammenhang mit dem Dopaminagonisten Lisurid beschrieben worden (Hofmann et al., 2006).

Tergurid ist ein weiteres halbsynthetisches Ergotderivat (Abb. 1). Diese Substanz ist ein partieller Agonist an den D_{2S}-Rezeptoren (Newman-Tancredi et al., 2002a) und ist von klinischer Bedeutung für die Therapie der Hyperprolaktinämie (Ciccarelli und Camanni, 1996; Dallabonzana et al., 1986; Venturini et al., 1986). Im Gegensatz zu Cabergolin und Pergolid sind aus der Literatur zum jetzigen Zeitpunkt keine Fälle fibrotischer Nebenwirkungen in Zusammenhang mit Tergurid bekannt. Für Tergurid wurde eine protektive Wirkung auf die Serotonin-induzierte Herzklappenfibrose in Ratten in vivo nachgewiesen (Hauso et al., 2007).

Bromocriptin wird ähnlich wie Cabergolin bei der PD und der Hyperprolaktinämie eingesetzt. Seit den 1980-er Jahren existieren mehrere Berichte in der Literatur über pleuropulmonale und retroperitoneale fibrotische Veränderungen als Folge einer Medikation mit Bromocriptin (Bowler et al., 1986; Demonet et al., 1986; McElvaney et al., 1988; Todman et al., 1990), aber es wurde nur ein klinischer Fall einer durch Bromocriptin induzierten schwerwiegenden Herzklappenfibrose beschrieben (Serratrice et al., 2002). In einer neueren Studie wird über ein erhöhtes Risiko für VHD unter Bromocriptin-Behandlung berichtet, allerdings war die Häufigkeit einer milden oder moderaten bis schweren Regurgitation im Vergleich zur Kontrollgruppe grenzwertig signifikant ($P = 0.08$) (Tan et al., 2009). Eine retrospektive Studie zeigte keine erhöhte Häufigkeit für das Auftreten von Valvulopathien in der Bromocriptin-behandelten Gruppe (Kim et al., 2006).

1.2.3 Amphetaminderivate in Zusammenhang mit Herzklappenfibrosen

Fenfluramin und Phentermin, wurden in 1973 bzw. 1959 in den USA als Appetitzügler zur Behandlung der Adipositas zugelassen (Bhattacharyya et al., 2009). Im Jahr 1996 wurde Dexfenfluramin, das aktive d-Stereoisomer von Fenfluramin, auf den Markt gebracht (Connolly und McGoon, 1999). Von der chemischen Struktur her sind alle drei Substanzen dem Amphetamin verwandt (Abb. 2).

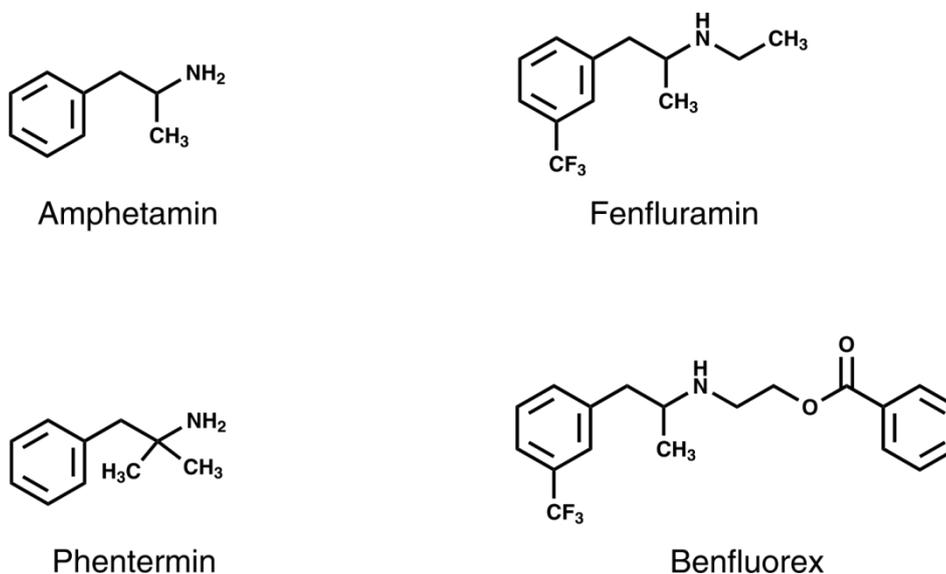


Abb. 2 Chemische Struktur von Amphetamin und Appetitzüglern, die dem Amphetamin verwandt sind.

Die Kombination aus Fenfluramin und Phentermin erwies sich sowohl wegen der besseren Wirksamkeit als auch wegen weniger unerwünschten Wirkungen durch die geringere Dosierung der einzelnen Substanzen als vorteilhafter gegenüber der Monotherapie (Weintraub et al., 1984; Weintraub et al., 1992). Connolly et. al. berichteten 1997 zum ersten Mal über Herzklappenerkrankungen in Zusammenhang mit der Anwendung von Fenfluramin/Phentermin. Bei 24 Frauen, die die Appetitzüglerkombination für 5 bis 19 Monate eingenommen hatten, wurden Regurgitationen und eine veränderte Klappenmorphologie in beiden Herzhälften gefunden (Connolly et al., 1997). In einer echokardiographischen Studie mit 233 Patienten, die mit Fenfluramin/Phentermin einzeln oder in Kombination behandelt wurden und 233 Kontrollprobanden, zeigte sich eine signifikante Prävalenz der Herzklappenerkrankungen in der Appetitzügler Gruppe (22.7 % vs. 1.3 %) (Khan et al., 1998). Im Jahr 2002 ergab eine Meta-Analyse von insgesamt 11 Studien eine geringere Prävalenz als zunächst von Khan et. al. (1998) berichtet, dennoch wurden Klappenregurgitationen bei 1 von 8 Patienten, die Appetitzügler länger als 90 Tage einnahmen,

gefunden (12 % vs. 5.9 %) (Sachdev et al., 2002). Das Risiko für die Entstehung von Herzklappenregurgitationen bei der Anwendung von Appetitzüglern steigt mit der Länge der Behandlungszeit (Jollis et al., 2000). 1997, kurz nach dem ersten Bericht von Connolly et al. über die fibrotischen Nebenwirkungen an den Herzklappen, wurden Fenfluramin und Phentermin freiwillig vom Markt genommen (Donnelly, 2008). Des Weiteren wurde Fenfluramin auch mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung einer pulmonalen Hypertonie in Verbindung gebracht (Abenhaim et al., 1996).

Benfluorex ist ein weiterer Appetitzügler und dem Fenfluramin chemisch verwandt (Abb. 2) (Noize et al., 2006). Es wurde seit 1976 für die Behandlung von Hyperlipidämie und Übergewicht bei Diabetikern verwendet (Frachon et al., 2010). In den letzten Jahren erschienen einige Anwendungsberichte, die Herzklappenerkrankungen als Folge der Benfluorex-Behandlung beschrieben (Boudes et al., 2011; Boutet et al., 2009; Le Ven et al., 2011; Noize et al., 2006; Tribouilloy et al., 2010). 2009 nahm die europäische Zulassungsbehörde EMA Benfluorex vom europäischen Markt (Droogmans et al., 2011).

Das Amphetamin-Derivat 3,4-Methylendioxy-*N*-methylamphetamin (MDMA), enthalten in der Modedroge „Ecstasy“, könnte ebenfalls Valvulopathien verursachen. Eine echokardiographische Studie an 29 Jugendlichen, die regelmäßig MDMA nahmen und 29 Kontrollprobanden im gleichen Alter, zeigte auffällige echokardiographische Befunde bei 28 % der Probanden aus der MDMA-Gruppe verglichen mit 0 % aus der Kontrollgruppe (Droogmans et al., 2007a). Das Valvulopathie-Potential von MDMA muss durch weitere Untersuchungen bestätigt werden, allerdings zeigt eine *in vitro* Untersuchung eine proliferative Wirkung von MDMA auf Herzklappeninterstitialzellen (Setola et al., 2003).

1.2.4 Herzklappenfibrosen beim Karzinoidsyndrom

Maligne gastrointestinale Karzinoidtumore stammen von den enterochromaffinen Zellen und führen zu einer übermäßigen Sekretion von Serotonin und anderen vasoaktiven Substanzen. Nach dem Erlangen der freigesetzten überschüssigen Mengen an Serotonin in den systemischen Kreislauf, meistens bei Lebermetastasen des Karzinoidtumors, kommt es zu charakteristischen klinischen Symptomen wie Flush, Diarrhö, Bronchospasmus, bezeichnet als Karzinoidsyndrom (Bhattacharyya et al., 2007). In 40 bis 70 % der Fälle mit Karzinoidsyndrom ist eine Herzerkrankung mit fibrotischen Plaques der Herzklappen und des Endokards und mit Herzklappenfunktionsstörungen vorhanden (Lundin et al., 1988; Pellikka et al., 1993; Robiolio et al.,

1995). Die beobachteten pathologischen Veränderungen der Herzklappen beim Karzinoidsyndrom sind mit den Veränderungen bei den Arzneimittel-induzierten Herzklappenfibrosen identisch (Connolly et al., 1997; Seghatol und Rigolin, 2002). Die mittlere Überlebensdauer der Karzinoidpatienten mit einer Manifestation in den Herzklappen nach der Erstdiagnose ist deutlich kürzer als bei Patienten ohne begleitender Herzklappenerkrankung (Møller et al., 2005; Pellikka et al., 1993).

1.3 Pathologische Veränderungen an den Herzklappen bei der Fibrose

1.3.1 Aufbau und Funktion der Herzklappen

Die Herzklappen koordinieren den Blutstrom während des Herzzyklus, gewährleisten den Fluss stets in einer Richtung ohne Blutzellen zu zerstören und thrombotische Ereignisse auszulösen (Butcher et al., 2004; Hinton und Yutzey, 2011; Schoen, 2005). Das zyklische Öffnen und Schließen der Herzklappen wiederholt sich ca. 30 Millionen Mal pro Lebensjahr und setzt das Klappengewebe einer enormen mechanischen Belastung aus (Butcher und Nerem, 2006). Ausgehend vom anatomischen Aufbau ist zwischen den Taschenklappen (Synonym Semilunarklappen) und Segelklappen zu unterscheiden. Die Taschenklappen (Aorten- und Pulmonalklappe) bestehen aus drei gleichgroßen halbmondförmigen Klappensegeln, die den Blutrückfluss in der linken bzw. rechten Herzkammer während der Diastole verhindern (Abb. 3) (Schoen, 2005). Die Segelklappen (Atrioventrikularklappen) verhindern den Rückfluss von den Herzkammern zu den Vorhöfen während der Systole. Dazu gehören die Mitralklappe auf der linken und die Trikuspidalklappe auf der rechten Herzseite (Abb. 3). Die Segelklappen bestehen aus unsymmetrischen ungleichgroßen Segeln, die am Papillarmuskel durch Sehnenfäden (Chordae tendineae) befestigt sind. Letztere verhindern das Umklappen der Segel während der Systole (Sacks et al., 2009).

Die Herzklappen bestehen histologisch aus einem komplexen Netzwerk aus Interstitialzellen, umgeben von der extrazellulären Matrix (ECM). Man unterscheidet drei Gewebeschichten, nämlich: Fibrosa, Spongiosa und Ventricularis bei den Taschenklappen, bzw. Atrialis bei den Segelklappen unterteilt ist (Abb. 3). Die ECM wird von den Interstitialzellen auf- und abgebaut und besteht aus Kollagen, elastischen Fasern, Glykosaminoglykanen (GAG) und Proteoglykanen (PG) (Messier et al., 1994; Taylor et al., 2003). Besonders reich an Kollagen-Fasern ist die äußere, zur Blutauslassseite hin orientierte Schicht der Klappensegel, die Fibrosa (Abb. 3).

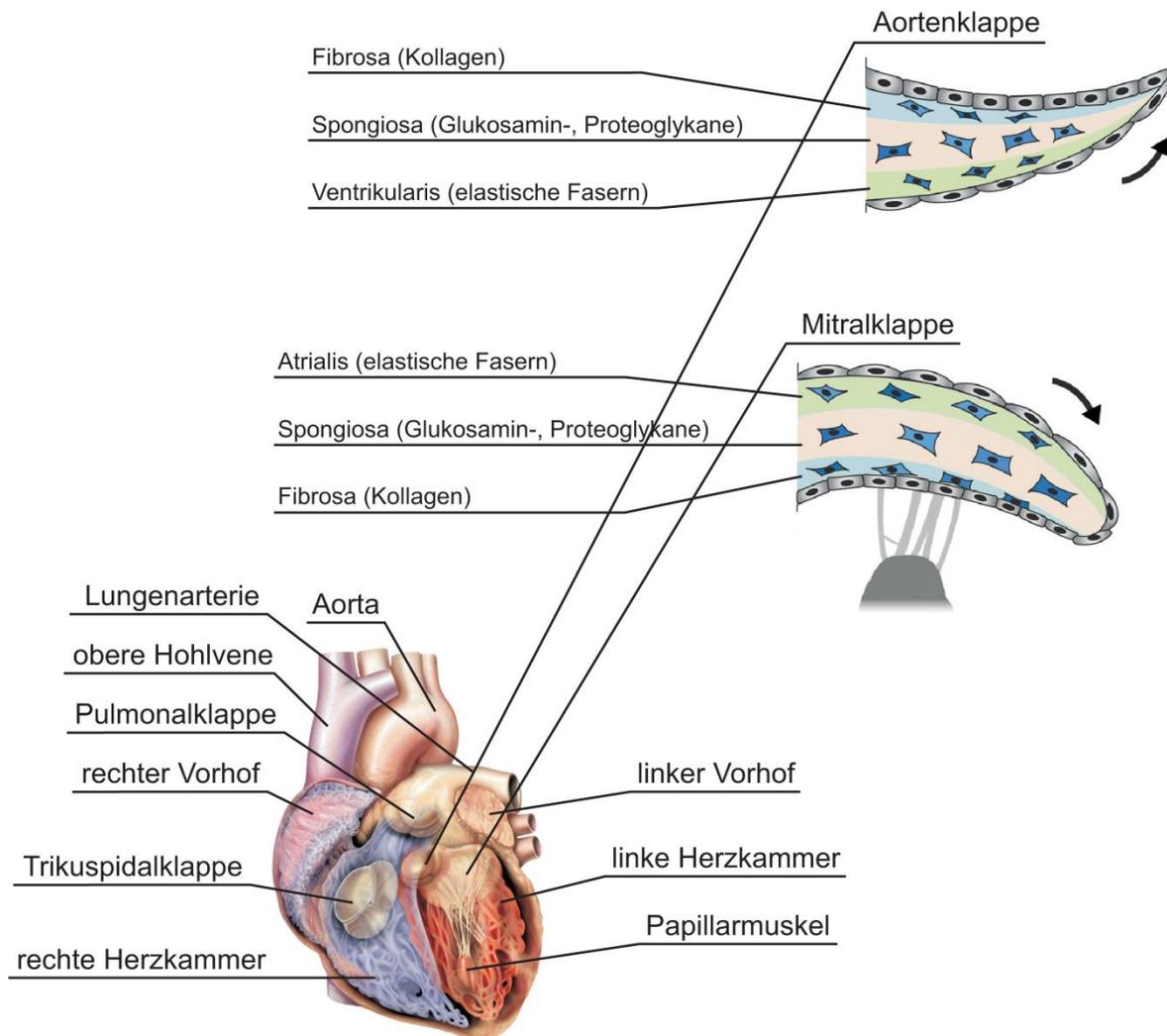


Abb. 3 Schematische Darstellung der Lage der Herzklappen im Herzen und des anatomischen Aufbaus der Aorten- und Mitralklappe. Quellen: (Bischoff und Aikawa, 2011), (Wikipedia, Wikimedia Commons, lizenziert unter GNU-Lizenz für freie Dokumentation, Patrick J. Lynch, medical illustrator)

Die Kollagenfasern tragen zur mechanischen Festigkeit des Klappengewebes bei (Elangbam, 2010; Schoen, 2005; Xu und Grande-Allen, 2010). Glykosaminoglykane und Proteoglykane sind vor allem in der mittleren Spongiosa-Schicht der Klappensegel vorhanden und bestimmen wichtige Eigenschaften des Klappengewebes wie Viskoelastizität und Druck- und Spannungswiderstand (Grande-Allen et al., 2003; Stephens et al., 2008). Die Ventricularis-Schicht bei den Taschenklappen und die Atrialis bei den Segelklappen bekleiden die Bluteinlassseite der Klappensegel und bestehen aus elastischen Fasern und Kollagen (Abb. 3). Die Ventricularis und Atrialis verleihen den Herzklappen die nötige Elastizität, so dass sich ihre Form während des Herzzyklus ändern kann (Elangbam, 2010; Xu und Grande-Allen, 2010).

In den Herzklappen wurden Endothel- und Interstitialzellen gefunden. Die Herzklappenendothelzellen (valvular endothelial cells VECs) bekleiden die Klappensegel mit einer Monoschicht und verhindern thrombotische Ereignisse an der Kontaktfläche (Lester et al., 1993; Risberg, 1989). Die Herzklappeninterstitialzellen (valvular interstitial cells VICs) kommen in allen drei Schichten des Klappengewebes vor und weisen strukturelle und funktionelle Eigenschaften auf, die sowohl für Fibroblasten als auch für Glattmuskelzellen charakteristisch sind (Filip et al., 1986; Messier et al., 1994; Xu und Grande-Allen, 2010). Ein wichtiges Merkmal der Interstitialzellen ist die Expression von Glattmuskelzell-Markern wie des glattmuskulären alpha-Aktin (α -smooth-muscle-actin α -SMA) sowie anderer für die Muskeln relevante kontraktile Proteine (Taylor et al., 2003). Einige Autoren betrachten die VICs als heterogene Zellpopulation mit bis zu fünf verschiedenen Phänotypen, die ineinander übergehen und die VICs somit an die Veränderungen in den mechanischen und hämodynamischen Bedingungen anpassen (Liu et al., 2007; Mulholland und Gotlieb, 1996; Rabkin-Aikawa et al., 2004; Schoen, 2008). Die Hauptfunktion der VICs ist die ständige Aufrechterhaltung der Herzklappenstruktur, die infolge des Blutflusses geschädigt werden kann (Roosens et al., 2013). Diese Zellen sind durch Integrine an der ECM befestigt und sind für die Synthese und den Abbau der ECM-Bestandteile verantwortlich. Durch die Expression von Abbauenzymen wie die Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und deren physiologischen Gegenspielern, die Gewebeinhibitoren der MMPs (TIMPs), können die VICs den Umbau der Matrix regulieren (Dreger et al., 2002; Mulholland und Gotlieb, 1996). Die Interstitialzellen lassen sich durch mechanische Belastung oder exogene Stimuli in den aktiveren Myofibroblasten-Phänotyp umwandeln (Walker et al., 2004; Xu und Grande-Allen, 2010; Yperman et al., 2004). Das Vorkommen von Myofibroblasten ist ein Teil der natürlichen Reparaturprozesse nach einer Gewebeverletzung, spielt jedoch auch bei pathologischen Prozessen eine wichtige Rolle.

1.3.2 Pathologische Befunde bei der Herzklappenerkrankung

Die Erhaltung der ECM-Struktur sowie ständiger ECM-Umbau von den VICs ist maßgebend für die Langlebigkeit und Funktionsfähigkeit der Herzklappen. Veränderungen in Menge und Struktur der ECM sind bei diversen pathologischen Zuständen der Herzklappen beschrieben (Elangbam, 2010). Beim Karzinoidsyndrom wurden Plaque-artige Gebilde auf den Herzklappen mit einem erhöhten Gehalt an proliferierenden Myofibroblasten, Kollagen und Proteoglykanen beobachtet (Di Luzio

und Rigolin, 2000; Simula et al., 2002). Ähnliche histopathologische Befunde wurden bei der Pergolid-, Cabergolin- und Fenfluramin-induzierten-Herzklappenfibrose beschrieben (Connolly et al., 1997; Pinero et al., 2005; Pritchett et al., 2002; Volmar und Hutchins, 2001). Myxomatöse Herzklappen enthielten mehr Kollagen verglichen zu gesundem Gewebe (Cole et al., 1984; Henney et al., 1982). Der Gehalt an GAG ist sowohl in myxomatösen Herzklappen deutlich erhöht (Grande-Allen et al., 2003; Gupta et al., 2009; Rabkin et al., 2001) als auch nach Behandlung mit anorexigenen Arzneimitteln (McDonald et al., 2002).

Serotonin- oder Arzneimittel-induzierte fibrotische Prozesse sind durch die Anhäufung von überschüssigen ECM und proliferierenden VICs, Verkürzung, Verdickung und erhöhte Steifigkeit der Herzklappen charakterisiert (Bernheim et al., 2007; Droogmans et al., 2007b; Gustafsson et al., 2005; Horvath et al., 2004; Pellikka et al., 1993; Schoen, 2008). Dies führt zur funktionellen Beeinträchtigungen wie Regurgitationen (Blutrückfluss), Überlastung der Herzkammer und zur darauffolgenden Dysfunktion des Myokards und Herzinsuffizienz (Carabello und Crawford, 1997; Elangbam, 2010). Damit stellen Erkrankungen der Herzklappen ein bedeutendes Gesundheitsrisiko dar (Hinton und Yutzey, 2011; Rosamond et al., 2008; Schoen, 2005; Xu und Grande-Allen, 2010). Regurgitationen der Herzklappen führen zu einer erhöhten kardiovaskulären Morbidität (Detaint et al., 2008; Enriquez-Sarano et al., 2005). Derzeit ist die einzige langfristige Therapieoption bei schwerwiegenden Herzklappenerkrankungen der chirurgische Ersatz durch mechanische oder organische Kunstklappen oder der Austausch der Aorten- durch die Pulmonalklappe (die sog. Ross Methode) (Butcher et al., 2011; Hutcheson et al., 2011).

1.4 Molekulare Mechanismen der Herzklappenfibrose

1.4.1 Serotonin und serotonerge Rezeptoren

Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) ist ein Gewebshormon und ein Neurotransmitter, der in Säugetieren durch Hydroxylierung aus L-Tryptophan bereitgestellt wird. Nach diesem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt folgt die Decarboxylierung (Nichols und Nichols, 2008). Serotonin wird schnell durch die Enzyme Monoaminoxidase (MAO) und Aldehyddehydrogenase (ADH) zu 5-Hydroxy-indolessigsäure metabolisiert (Abb. 4) (Fanburg und Lee, 1997). Die Hauptspeicherorte für Serotonin sind die enterochromaffinen Zellen im Gastrointestinaltrakt, die Blutplättchen in der Peripherie, sowie serotonerge Neurone im ZNS (Barnes und Sharp, 1999; Fanburg und Lee, 1997). In die Zellen wird Serotonin überwiegend durch den Na⁺-abhängigen Serotonin-Transporter aufgenommen, so dass weniger als 10 % vom gesamten Serotonin frei im Blutplasma vorliegt (Fanburg und Lee, 1997).

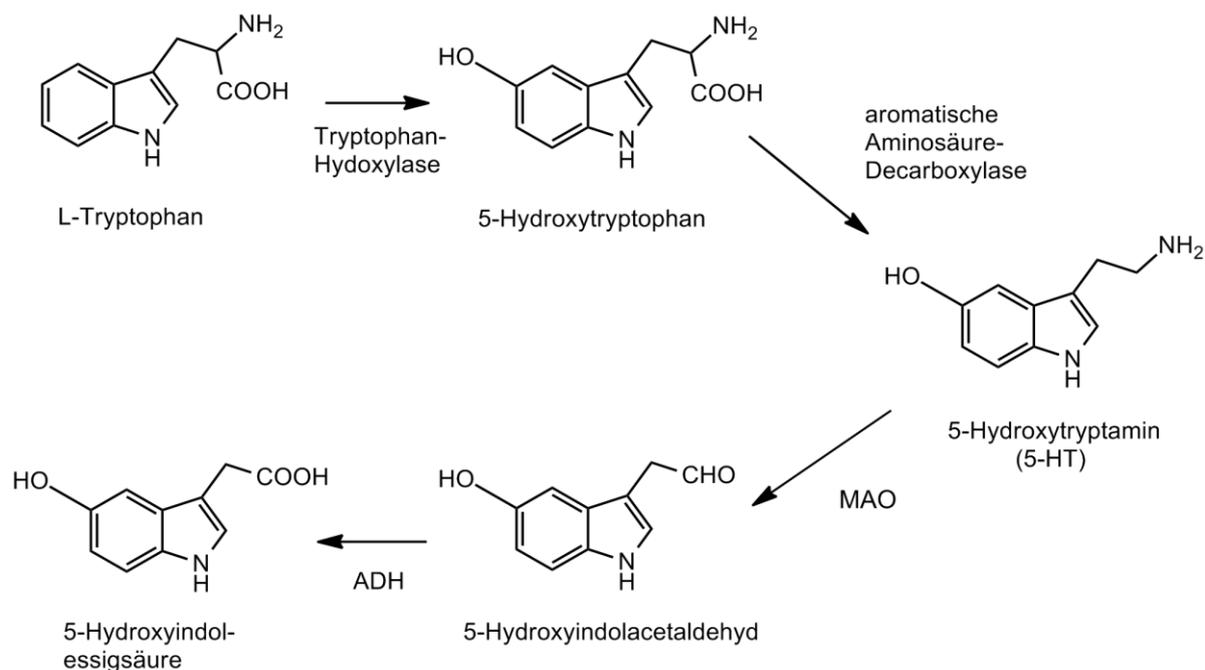


Abb. 4 Biosynthese und Metabolismus von Serotonin.

Serotonin reguliert Verhaltensfunktionen wie Schlaf, Appetit, Aggressivität, Kognition, Gedächtnis und ist bei der Pathogenese einiger psychischer Störungen wie Schizophrenie, Depression, Angst- und Essstörungen von Bedeutung (Berger et al., 2009; Dourish, 1995; Leysen, 2004; Roth, 1994). Auch im kardiovaskulären System kann Serotonin komplexe und teilweise gegensätzliche Wirkungen wie z.B. Tachykardie oder Bradykardie, Vasodilatation oder Vasokonstriktion, sowie Blutdruckanstieg und -

Senkung auslösen (Villalón und Centurión, 2007). Serotonin zeigt eine mitogene Wirkung in verschiedenen Zellarten, wie z.B. in vaskulären Glattmuskelzellen (Fanburg und Lee, 1997).

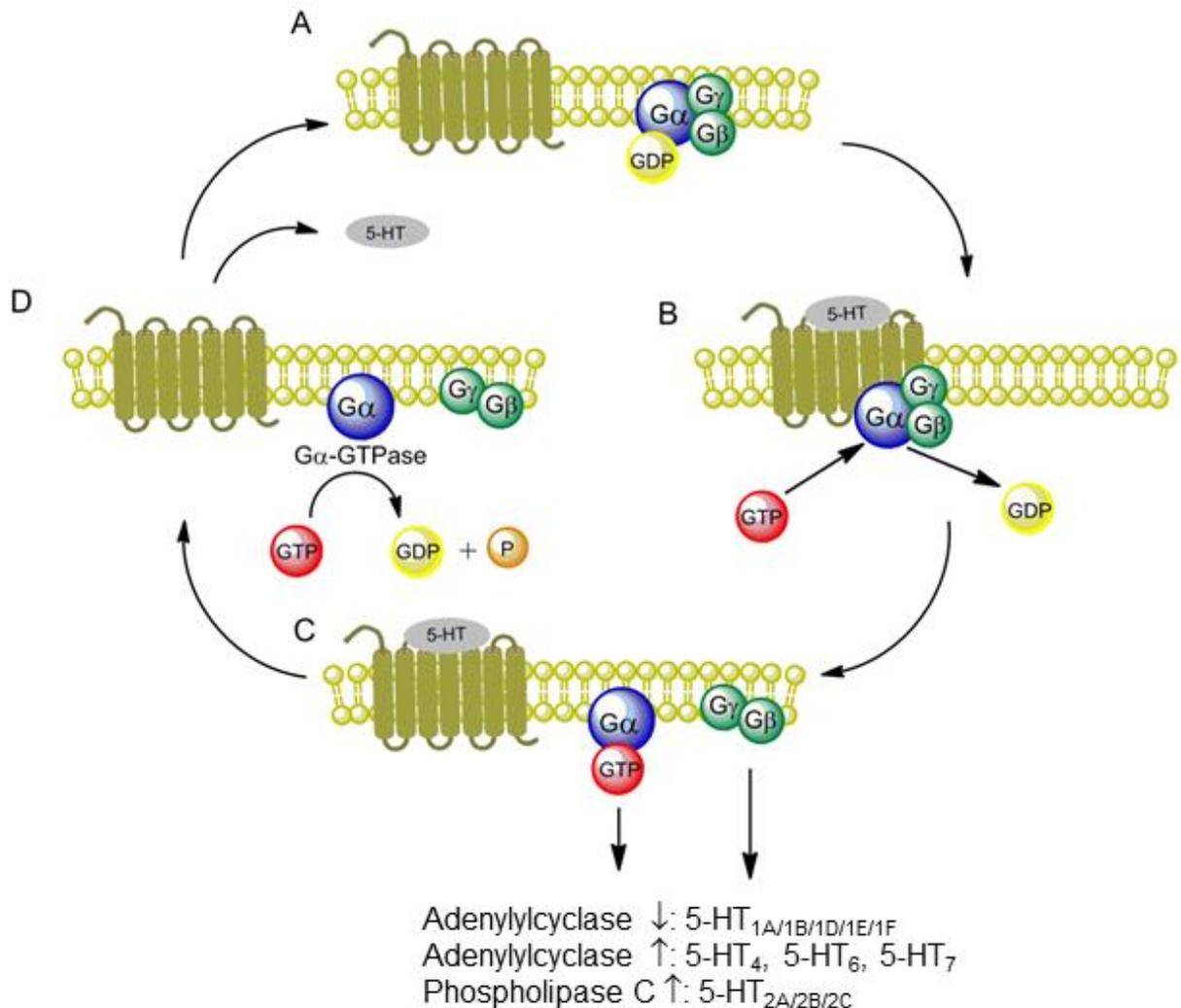


Abb. 5 Schematische Darstellung der Funktion der G-Protein-gekoppelten-5-HT-Rezeptoren nach Siegel et al. (1999). A: Ruhezustand; B: Die Bindung des Liganden 5-HT am Rezeptor bewirkt die Bindung des G-Proteins am Rezeptor und den Austausch von GDP durch GTP; C: Aktivierung des Rezeptors und Trennung der G α - und G $\beta\gamma$ -Einheiten, die ihrerseits bestimmte Effektormoleküle aktivieren; D: Die GTP-ase Aktivität der G α -Untereinheit spaltet GTP zu GDP und der Rezeptor kehrt in den Ruhezustand zurück.

Die Diversität der biologischen Wirkung von Serotonin lässt sich durch die Interaktion mit verschiedenen 5-HT-Rezeptortypen erklären, die aufgrund der Struktur, der Transduktionsmechanismen und des pharmakologischen Profils in 7 Hauptfamilien gruppiert wurden (Hoyer et al., 1994; Hoyer et al., 2002). Der 5-HT₃-Rezeptortyp ist

einzigartig in der Serotoninrezeptorfamilie und stellt funktionell einen Ligand-gesteuerten Ionenkanal dar (Maricq et al., 1991). Alle anderen 5-HT-Rezeptoren gehören zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) (Hoyer et al., 2002). Die GPCR sind aus 7 transmembranären Domänen bestehende Proteine, die an ein heterotrimeres G-Protein gebunden sind. Die Bindung des Liganden an den Rezeptor zieht dessen Konformationsänderung und die Aktivierung des G-Proteins nach sich (Abb. 5). Dies führt zum Austausch des an der $G\alpha$ -Untereinheit gebundenen GDP durch GTP und deren Abspaltung von der $G\beta\gamma$ -Einheiten (Hamm, 1998; Johnston und Siderovski, 2007; Tuteja, 2009). Die freien $G\alpha$ - und $G\beta\gamma$ -Einheiten aktivieren ihrerseits nachgeschaltete Effektormoleküle, welche die sog. „second messengers“ bilden und dadurch die Signalübertragung ins Zellinnere sichern (Nichols und Nichols, 2008; Raymond et al., 2001). Die $G\alpha$ -GTP-ase spaltet GTP zu GDP und Phosphat, wodurch sich die $G\alpha$ - und $G\beta\gamma$ -Einheiten wieder zusammenlagern und der Rezeptor in den inaktiven Zustand überführt wird (Abb. 5).

Die 5-HT₁-Rezeptoren binden vor allem an G_{i/o}-Proteine und sind dadurch negativ an der Adenylylcyclase gekoppelt und hemmen die Bildung von cAMP als „second messenger“ (Hannon und Hoyer, 2008). Es existieren fünf 5-HT₁-Rezeptortypen, die im Menschen 40-63% Sequenzhomologie zeigen (Hannon und Hoyer, 2008). Die 5-HT_{1B}- und 5-HT_{1D}-Rezeptoren zeigen Ähnlichkeiten in der Struktur und im pharmakologischen Profil (Hannon und Hoyer, 2008). An den Blutgefäßen vermitteln die 5-HT_{1B}-Rezeptoren konstriktorische Effekte. So bewirkt der 5-HT_{1B/1D}-Rezeptoragonist Sumatriptan die Vasokonstriktion der kranialen Arterien und wird bei der Therapie des akuten Migräneanfalls verwendet (Villalón und Centurión, 2007). In verschiedenen Zellarten sowohl mit nativen als auch mit transfizierten Rezeptoren wurde die Aktivierung von ERK 1/2 durch die 5-HT_{1B}-Rezeptoren sowie die Stimulation der DNA-Synthese gezeigt (Mendez et al., 1999; Seuwen et al., 1988).

Die Gruppe der 5-HT₂-Rezeptoren besteht aus drei Subtypen, die 5-HT_{2A}-, 5-HT_{2B}- und 5-HT_{2C}-Rezeptoren, die eine beachtliche strukturelle Homologie bezüglich deren Aminosäuresequenz sowie deren Sekundärstruktur aufweisen (Hoyer et al., 2002). Die 5-HT₂-Rezeptoren binden überwiegend an G_q-Proteine und sind somit positiv an die Phospholipase C (PLC) gekoppelt. Die aktivierte PLC zieht die Freisetzung von Diacylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP₃) als „second messenger“ nach sich und die Freisetzung von intrazellulären Ca²⁺ Ionen sowie den Influx von extrazellulären Ca²⁺ und die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) (Conn et al., 1986; Leysen, 2004; Roth et al., 1984; Watson et al., 1995). Unabhängig vom klassischen PLC-Signalweg

können alle drei 5-HT₂-Rezeptoren auch die Phospholipase A2 (PLA2) aktivieren und die nachfolgende Freisetzung des "second messenger" Arachidonsäure auslösen (Felder et al., 1990; Tournois et al., 1998). Bemerkenswert ist die Fähigkeit einiger Agonisten diese Signalwege in unterschiedlichem Ausmaß zu aktivieren (Berg et al., 1998).

Die 5-HT_{2A}-Rezeptoren sind in der Lage, die extrazellulär signal-regulierten mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK-MAPK durch diverse Mechanismen zu aktivieren. In Glattmuskelzellen wird die ERK-Phosphorylierung durch die PLC vermittelt, und in Mesangiumzellen ist die Aktivierung der PKC beteiligt (Florian und Watts, 1998; Grewal et al., 1999; Watts, 1998). In Herzklappeninterstitialzellen vom Schaf wird der ERK-Signalweg durch die PKC und die Src-Tyrosin-Kinase vermittelt (Xu et al., 2002). Ein anderer Weg für die 5-HT_{2A}-vermittelte Aktivierung der ERK-Signalkaskade ist die G $\alpha_{i/o}$ assoziierte G $\beta\gamma$ -Freisetzung, die die Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade einschaltet und zur Phosphorylierung der PLA2 führt (Kurrasch-Orbaugh et al., 2003)

Die 5-HT_{2A}-Rezeptoren sind reichlich in verschiedenen anatomischen Strukturen des ZNS vorhanden und deren Aktivierung von Agonisten wie LSD führt zu halluzinogenen Effekten sowie zu typischen Kopfbewegungen (head twitches) bei Nagetieren (Leysen, 2004). Der Antagonismus an zentralen 5-HT_{2A}-Rezeptoren zeigt eine positive Auswirkung auf die Symptome der Schizophrenie (Leysen, 2004). Dies führte zur Entwicklung von atypischen Neuroleptika wie Risperidon, die neben dem Antagonismus an zentralen D₂-Rezeptoren auch einen Antagonismus oder inversen Agonismus an 5-HT_{2A}-Rezeptoren bewirken (Meltzer et al., 1989; Seeman, 2002; Weiner et al., 2001). Durch Aktivierung von 5-HT_{2A}-Rezeptoren an der Thrombozytenmembran wirkt Serotonin synergistisch zu ADP bei der Induktion der Thrombozytenaggregation (De Clerck et al., 1984; Leysen et al., 1984). Letzteres führt zur Freisetzung von gespeichertem Serotonin aus den Blutplättchen und zu einer Verstärkung des Effektes auf die Thrombozytenaggregation durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus (Frishman et al., 1995). Der selektive 5-HT_{2A}-Rezeptorantagonist Sarpogrelat wird therapeutisch bei ischämischen Herzkrankheiten, begleitet von thrombotischen Ereignissen, verwendet (Nagatomo et al., 2004; Saini et al., 2004). Die 5-HT_{2A}-Rezeptoren vermitteln kontraktile Effekte an der glatten Muskulatur in diversen Gewebearten, wie z.B. an den Bronchien, Uterus und Ileum sowie an Blutgefäßen in verschiedenen Spezies (Hoyer et al., 2002; Villalón und Centurión, 2007). An den Koronararterien vom Menschen und vom Schwein löst Serotonin eine 5-HT_{2A}-vermittelte Vasokonstriktion aus (Bax et al., 1993; Cushing und Cohen, 1992; 1993).

Der 5-HT_{2A/2C}-Rezeptorantagonist Ketanserin senkt den peripheren Gefäßwiderstand und zeigt eine antihypertensive Wirkung am Menschen und in experimentellen Modellen (Du et al., 2003; Liu et al., 1991; van Schie et al., 2002). Jedoch wird der 5-HT_{2A}-Antagonismus als zugrundeliegender Mechanismus für die antihypertensive Wirkung von Ketanserin kontrovers diskutiert. Die Blockade α_1 -adrenerger Rezeptoren trägt ebenfalls zur Ketanserin-Wirkung bei (van Zwieten et al., 1992; Vanhoutte et al., 1988).

5-HT_{2B}-Rezeptoren sind im Gehirn vom Menschen in einem geringeren Ausmaß im Vergleich zu den 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2C}-Typen exprimiert (Kursar et al., 1994). Deren biologische Funktion im ZNS ist ungeklärt, jedoch wurde eine anxiolytische Wirkung und Fresssucht des 5-HT_{2B}-Rezeptoragonisten BW 723C86 im Rattenmodell gezeigt (Duxon et al., 1997). In der Peripherie sind die 5-HT_{2B}-Rezeptoren in der pulmonalen und gastrointestinalen glatten Muskulatur sowie in Blutgefäßen lokalisiert (Leyssen, 2004). Im GIT vermitteln die 5-HT_{2B}-Rezeptoren Kontraktionen der glatten Muskulatur, wie zum Beispiel am Rattenfundus und am menschlichen Ileum und Kolon (Beattie und Smith, 2008; Nagatomo et al., 2004). Einige experimentelle hypertensive Modelle zeigen eine erhöhte Expression von 5-HT_{2B}-Rezeptoren in der arteriellen glatten Muskulatur sowie eine erhöhte 5-HT-induzierte Kontraktionsfähigkeit der Blutgefäße (Watts et al., 2012). Eine Überexpression der 5-HT_{2B}-Rezeptoren ist auch an der Pathologie der essentiellen pulmonalen Hypertonie beteiligt (Launay et al., 2002). In einigen Zellarten, wie vaskuläre Endothelzellen, sind 5-HT_{2B}-Rezeptoren durch einen PDZ-Bindemotiv am C-terminalen Ende des Rezeptors an NO-Signalwege gekoppelt, so dass deren Aktivierung die Freisetzung von NO und eine Vasorelaxation bewirkt (Manivet et al., 2000). Agonismus an 5-HT_{2B}-Rezeptoren löst eine Vasorelaxation an der Pulmonalarterie vom Schwein und an der Jugularvene der Ratte aus (Ellis et al., 1995; Glusa und Pertz, 2000; Jähnichen et al., 2005a). Auch an cerebralen Blutgefäßen bewirken 5-HT_{2B}-Rezeptoren eine endothelabhängige Vasodilatation, worauf die prophylaktische Wirkung einiger 5-HT_{2B} Antagonisten bei der Migränetherapie beruht (Schmuck et al., 1996). 5-HT_{2B}-Rezeptoren aktivieren das Protoonkogen p21ras und anschließend die ERK 1/2 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen und stimulieren somit die Zellproliferation (Launay et al., 1996). Des Weiteren wurde eine gegenseitige Aktivierung, „cross-talk“, zwischen dem 5-HT_{2B}-Rezeptor und Thyrosin-Kinasen wie c-Src und dem PDGF-Rezeptor nachgewiesen, deren Aktivierung für die Proliferation notwendig ist (Nebigil et al., 2000). 5-HT_{2B}-Rezeptoren sind an der Regulation der Funktion und Struktur des Herzens beteiligt. Während eine Überexpression der 5-HT_{2B}-

Rezeptoren eine kardiale Hypertrophie verursacht, führt die Dysfunktion der 5-HT_{2B}-Rezeptoren zu einer linksventrikulären Dilatation im Mausmodell (Nagamoto 2004). Auch in der Embryogenese des Gehirns und des Herzen spielen 5-HT_{2B}-Rezeptoren eine wichtige Rolle, da die Hemmung der Expression dieser Rezeptoren zu letalen morphologischen Defekten führt (Nebigil und Maroteaux, 2001).

Aufgrund der geringen Relevanz weiterer 5-HT-Rezeptortypen für die Fragestellung des vorliegenden Forschungsvorhabens wird auf diese nicht näher eingegangen.

1.4.2 Rolle von Serotonin und Serotonin-Rezeptoraktivierung bei der Entstehung fibrotischer Herzklappenerkrankungen

Obwohl der genaue Mechanismus der Pathogenese der Herzklappenfibrose nicht vollständig geklärt ist, wird vermutet, dass Serotonin bzw. die Aktivierung bestimmter Serotonin-Rezeptoren die Karzinoid- bzw. die Arzneimittel-induzierte Herzklappenerkrankung verursachen (Connolly und McGoon, 1999; Gustafsson et al., 2008).

Mitogene Eigenschaften von Serotonin wurden bei diversen Zelltypen wie Fibroblasten, Glattmuskel- und Mesangiumzellen belegt (Fanburg und Lee, 1997; Grewal et al., 1999; Nebigil et al., 2000). Die proliferative und fibrotische Wirkung von Serotonin am Herzklappengewebe wurde in vivo am Rattenmodell demonstriert. Nach täglicher parenteraler Serotonin-Verabreichung über drei Monate zeigten echokardiographische und histologische Untersuchungen der Tiere typische fibrotische Befunde an den Klappengeweben. Die übermäßige Proliferation von Myofibroblasten zusammen mit der Anhäufung der extrazellulären Matrix führte zur Ausbildung von Plaquengebilden und Verdickung der Klappensegel (Gustafsson et al., 2005). Ein weiterer Beweis für die entscheidende Rolle von Serotonin bei der Entstehung der Herzklappenfibrose liefert eine in vivo Studie an genetisch veränderten Mäusen mit einem defekten Gen für das Serotonin-Transporter Protein (SERT). Diese SERT-Knockout-Mäuse entwickelten Fibrose und Hyperplasie der Klappensegel (Mekontso-Dessap et al., 2006).

Die Entstehung der Herzklappenerkrankungen beim Karzinoidsyndrom ist mit der Freisetzung von überschüssigen Mengen an Serotonin und mit der daraus folgenden erhöhten Serotonin im Plasma verbunden (Møller et al., 2003; Robiolio et al., 1995). Auch die erhöhte Urinkonzentration des Serotoninabbauprodukts 5-Hydroxyindolessigsäure im Urin korreliert mit einer höheren Prävalenz von Herzklappenerkrankungen und kann als Diagnosemarker verwendet werden (Bhattacharyya et al., 2011; Lundin et al., 1988; Møller et al., 2003).

Veränderungen der Herzklappen infolge eines Karzinoidtumors treten überwiegend auf der rechten Herzseite auf (Bhattacharyya et al., 2007; Kulke und Mayer, 1999; Modlin et al., 2008). Die linke Herzseite ist nur bei ca. 10 % der Fälle betroffen (Gustafsson et al., 2008). Durch den intensiven Serotonin-Metabolismus im Lungenparenchym wird das Blut während der Passage im Lungenkreislauf vom zirkulierenden Serotonin befreit (Bhattacharyya et al., 2007; Fishman, 1999). Daher ist nur die rechte, nicht aber die linke Herzseite einer übermäßigen Serotoninkonzentration beim Karzinoidsyndrom ausgesetzt. Diese Beobachtung unterstreicht die Bedeutung von Serotonin als Hauptmediator der fibrotischen Veränderungen beim Karzinoidsyndrom.

Appetitzügler mit fibrotischen Nebenwirkungen besitzen eine indirekte serotonerge Wirkung. Fenfluramin, sein d-Stereoisomer Dexfenfluramin, sowie deren Hauptmetabolit Norfenfluramin, erhöhen die Serotoninfreisetzung von den Nervenendigungen und Thrombozyten und hemmen die Serotoninwiederaufnahme in die präsynaptischen Neuronen (Baumann et al., 2000; Fishman, 1999). Allerdings konnte in einem in vivo Rattenmodell gezeigt werden, dass die Serotoninplasmakonzentration während der chronischen Fenfluramin-Verabreichung im nichttoxischen nanomolaren Bereich bleibt (Zolkowska et al., 2008). Somit ist der erhöhte Serotoninspiegel als Ursache für die fibrotischen Nebenwirkungen von Fenfluramin abzulehnen. Vielmehr lässt sich das Auftreten der Herzklappenfibrosen durch die direkte serotonerge Wirkung von Fenfluramin erklären. Norfenfluramin zeigt eine hohe Affinität für die 5-HT_{2B}- und 5-HT_{2C}-Rezeptoren und eine mittlere Affinität für 5-HT_{2A}-Rezeptoren (Fitzgerald et al., 2000). Funktionelle Studien an rekombinanten Rezeptoren zeigten, dass Norfenfluramin ein potenter 5-HT_{2A}-Rezeptor-Partialagonist und 5-HT_{2B}-Rezeptor-Vollagonist ist (Rothman et al., 2000). Es wird in der Literatur postuliert, dass auch MDMA und die Migränetherapeutika Methysergid und Ergotamin fibrotische Wirkungen über einen direkten serotonergen Mechanismus verursachen. MDMA sowie sein *N*-demethylierter Metabolit MDA aktivieren 5-HT_{2B}-Rezeptoren in vitro (Setola et al., 2005). Die Ergolin-Derivate Ergotamin, Methysergid und sein Metabolit Methylergonovin zeigen eine hohe Affinität für alle 5-HT₂-Rezeptoren. Ergotamin und Methylergonovin sind Vollagonisten an den 5-HT_{2A}- und Partialagonisten an den 5-HT_{2B}-Rezeptoren (Rothman et al., 2000). Auch bei den Dopaminagonisten für die Therapie der PD korreliert das fibrotische Potential mit den serotonergen Eigenschaften. Cabergolin und Pergolid haben eine hohe Bindungsaffinität an die serotonergen Rezeptoren vom Typ 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} und 5-HT_{1D} und eine schwächere Affinität für 5-HT_{1B} (Kvernmo et al., 2006). Vertreter der zweiten Generation Dopaminagonisten ohne Ergolinstruktur wie Pramipexol und

Ropinirol, die keine fibrotische Wirkungen verursachen, haben dagegen keine oder nur eine sehr schwache Bindungsaffinität für diese Serotonin-Rezeptoren (Kvernmo et al., 2006).

Das Vorhandensein verschiedener Vertreter der Serotonin-Rezeptor-Familie in den Herzklappen bestätigt, dass eine serotonerge Stimulation Effekte auf dieses Gewebe ausüben kann. In menschlichen Herzklappen, Schweine- und Rattenherzklappen sind 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Rezeptoren vorhanden. Die 5-HT_{2C}-Rezeptoren sind dagegen nicht oder nur sehr schwach exprimiert (Fitzgerald et al., 2000; Gustafsson et al., 2005; Monoranu et al., 2012). Von den Vertretern der 5-HT₁-Subfamilie konnten die 5-HT_{1B}- und 5-HT_{1D}-Rezeptoren in allen vier Herzklappen vom Menschen nachgewiesen werden (Roy et al., 2000b).

Welcher Serotonin-Rezeptor Subtyp für die Entstehung der Herzklappenfibrose verantwortlich ist, ist in der Literatur nicht einheitlich belegt. Mehrere Untersuchungen postulieren einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung der 5-HT_{2B}-Rezeptoren und der Pathogenese der Herzklappenerkrankungen. Die Überexpression der 5-HT_{2B}-Rezeptoren führt zur Entstehung einer kardialen Hypertrophie im Mausmodell in vivo (Nebigil et al., 2003). Die histopathologische Untersuchung der Pergolid-induzierten Herzklappenfibrose im in vivo Rattenmodell zeigte neben den typischen fibrotischen Veränderungen auch eine 5-HT_{2B}-Rezeptor-Überexpression (Droogmans et al., 2007b). Fenfluramin, MDMA sowie deren Metabolite, führen zu einer gesteigerten DNA-Synthese bzw. einer gesteigerten Proliferationsrate in humanen Herzklappeninterstitialzellen, die durch die Aktivierung von 5-HT_{2B}-Rezeptoren vermittelt wurde (Setola et al., 2003). Ob Cabergolin ebenfalls zu einer gesteigerten DNA-Synthese bzw. zu einer gesteigerten Proliferationsrate in den Herzklappen führt, wurde bis jetzt nicht untersucht. Bei den therapeutisch verwendeten Ergolinderivaten konnte eine Korrelation zwischen dem Auftreten von Valvulopathien und die agonistische Potenz an den 5-HT_{2B}-Rezeptoren gezeigt werden. Tergurid und Lisurid wurden nicht mit Valvulopathien in Verbindung gebracht und erwiesen sich als stille Antagonisten an 5-HT_{2B}-Rezeptoren. Im Gegensatz dazu erwiesen sich die Substanzen mit fibrotischen Nebenwirkungen als partielle Agonisten oder Vollagonisten an diesen Rezeptoren (Jähnichen et al., 2005b).

Neben der Aktivierung der 5-HT_{2B}-Rezeptoren ist die Aktivierung der 5-HT_{2A}- oder der 5-HT_{1B}-Rezeptoren als Ursache für die Arzneimittel-induzierten Valvulopathien nicht auszuschließen. Die Aktivierung der 5-HT_{2A}-Rezeptoren ist mit der Übertragung proliferativer und fibrotischer Signale in Mesangiumzellen verbunden (Grewal et al.,

1999). In vitro Studien an Herzklappeninterstitialzellen vom Schaf zeigen eine Beteiligung der 5HT_{2A}-Rezeptoren an den fibrotischen Veränderungen. In diesem Modell führte die 5-HT_{2A}-Rezeptoraktivierung zur Überexpression von TGF- β 1, einem bekanntem Hauptmediator fibrotischer Veränderungen (Xu et al., 2002). Serotonin beeinträchtigt die Funktionsfähigkeit von isolierten intakten Klappensegeln in vitro. Dieser Effekt ist auf die Kontraktion des Herzklappengewebes zurückzuführen und wird ebenfalls durch 5-HT_{2A}-Rezeptoren vermittelt (Chester et al., 2001). Die Untersuchung der proliferativen Wirkung von Serotonin bzw. der Steigerung der DNA-Synthese in Interstitialzellen aus der Mitralklappe des Hundes ergab, dass diese durch die Aktivierung der 5-HT_{2A}- und der 5-HT_{1B}-Rezeptoren übertragen wird (Connolly et al., 2009). Die in der Studie von Setola et al. (2003) demonstrierte proliferative Wirkung von Serotonin und Norfenfluramin auf humanen Interstitialzellen konnte nach Blockade der 5-HT_{2B}-Rezeptoren nicht vollständig gehemmt werden. Diese Beobachtung unterstützt die Annahme, dass andere Serotoninrezeptortypen an dem proliferativen Effekt beteiligt sein könnten. Histologische Untersuchungen von Herzklappengewebe beim Karzinoidsyndrom zeigten eine erhöhte Proliferationsrate im Vergleich zu gesundem Gewebe, die zumindest teilweise durch 5-HT_{1B}-Rezeptoren vermittelt wurde (Rajamannan et al., 2001).

1.4.3 Beteiligung von intrazellulären Signalwegen an der Herzklappenfibrose

Die „mitogen-activated protein kinases“ (MAPK) sind Proteinkinase-Kaskaden, die extrazelluläre Signale auf intrazelluläre Angriffspunkte übertragen und wichtige zelluläre Prozesse regulieren (Chang et al., 2003; Chang und Karin, 2001; Steelman et al., 2004). Zu der Familie der MAPK gehören auch die Serin/Threonin-Kinasen „extracellular signal-regulated“-Kinasen (ERK) 1 und 2 (Johnson und Lapadat, 2002). Die Aktivierung von ERK 1 und 2 erfolgt durch einen Mechanismus von nacheinander schaltbaren Phosphorylierungsschritten, der eine Verstärkung und Regulation der Signalübertragung gewährleistet (Pearson et al., 2001; Rubinfeld und Seger, 2005). Die ERK-Signalkaskade kann durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren sowie durch Tyrosinkinasen aktiviert werden (Lopez-Illasaca, 1998; Luttrell et al., 1996; Luttrell et al., 1997b; Sugden und Clerk, 1997). Die im Herzklappengewebe vorhandenen 5-HT_{2A}-, 5-HT_{2B}- und 5-HT_{1B}-Serotoninrezeptorsubtypen sind in der Lage, die ERK Signalkaskade zu aktivieren (Knauer et al., 2009; Mendez et al., 1999). Nach der spezifischen Phosphorylierung durch die in der Signalkaskade vorgeschaltete MAP Kinase Kinase MEK1/2, dringen die aktivierten ERK 1 und 2 in den Zellkern ein und aktivieren

bestimmte Transkriptionsfaktoren, die für Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Bedeutung sind (Adachi et al., 1999; Matsubayashi et al., 2001; Zehorai et al., 2010). Neben der Regulation von physiologischen Prozessen können die ERK-Kinasen auch pathologische Prozesse beeinflussen. Grewal et al. (1999) zeigten die Beteiligung der ERK 1/2 Kinasen sowohl direkt in der frühen proliferativen Phase der glomerulären Fibrose als auch indirekt in der späten Phase durch die nachfolgende ERK 1/2 abhängige Expression von TGF- β 1. Die erhöhte Aktivität der ERK 1/2 gilt als ein früher mitogener Marker in fibrotischen Erkrankungen der Herzklappen (Setola et al., 2003; Xu et al., 2002). Sowohl für Serotonin als auch für Norfenfluramin und MDMA konnte eine aktivierende Wirkung auf die ERK-Phosphorylierung gezeigt werden (Setola et al., 2003). Die Wirkung von Cabergolin oder anderen Ergolin-Verbindungen auf diesem Signalweg ist bis jetzt nicht untersucht worden. Auch in Bezug auf andere pathologische Zustände der Herzklappen, wie die Kalzifizierung des Gewebes, spielt die ERK-Aktivierung eine zentrale Rolle (Gu und Masters, 2009).

Die Familie der Src-Tyrosinkinasen sind intrazelluläre Proteine, die mit strukturell unterschiedlichen Rezeptoren interagieren und diverse zelluläre Funktionen, unter anderem der Regulation der Zellproliferation und Zelldifferenzierung haben (Parsons und Parsons, 2004; Thomas und Brugge, 1997). Es ist bekannt, dass Tyrosinkinasen als enzymatische Effektormoleküle Signale von aktivierten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) weiterleiten. Gleichzeitig können Tyrosinkinasen die Aktivität der GPCR regulieren (McGarrigle und Huang, 2007; Thomas und Brugge, 1997). Für die Wechselwirkung zwischen GPCR und zytosolischen Tyrosinkinasen, wie die Src-Proteine, werden in der Literatur diverse Mechanismen diskutiert. Eine direkte Aktivierung der Src-Kinasen durch die Untereinheiten des G-Proteins (G-Protein abhängig) oder durch andere an GPCR-gekoppelten Proteine wie die β -Arrestine (G-protein unabhängig) ist beschrieben worden (McGarrigle und Huang, 2007). Ein anderer Mechanismus ist die Src-Aktivierung im Rahmen des Cross-talks zwischen GPCR und Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität (Daub et al., 1996; Luttrell und Luttrell, 2004; Luttrell et al., 1997a).

Auch für die 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Rezeptoren ist die Aktivierung der Src-Tyrosinkinasen belegt worden (Lu et al., 2008; Nebigil et al., 2000; Xu et al., 2002). Es wurde postuliert, dass Serotonin und Src-Tyrosinkinasen zur Stimulation der Mitogenese sowie zur Erhöhung der TGF- β 1-Rezeptoraktivität führen und somit an der Pathogenese der Herzklappenfibrose beteiligt sind (Elangbam, 2010; Ignatz und Massagué, 1986; Jian et al., 2002; Roth, 2007; Waltenberger et al., 1993).

1.5 Zielsetzung

Dass die Entstehung fibrotischer Veränderungen an den Herzklappen bei den Ergolinen nicht gleichermaßen vertreten ist, lässt sich möglicherweise durch die Unterschiede in der chemischen Struktur und die daraus resultierenden unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften an den serotonergen Rezeptoren erklären.

In vorherigen Studien der Arbeitsgruppe Prof. Pertz wurde durch gezielte Modifikationen des Pergolidmoleküls die N(6)-Propylgruppe als die pharmakophore Struktur identifiziert, die für die pharmakologischen Eigenschaften an den 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}- Rezeptoren entscheidend ist (Görnemann et al., 2008a). So wurde postuliert, dass die Länge der Seitenkette an der Position N-6 im Ergolingrundgerüst den serotonergen Agonismus und dadurch auch das fibrotische Nebenwirkungsprofil bestimmt. Um diese Hypothese zu bestätigen, sollte sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch für Cabergolin überprüft werden. Zu diesem Zweck sollten die pharmakologischen Eigenschaften an den 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Rezeptoren verschiedener Cabergolin-Derivate mit Modifikationen in der Position 6 des Ergolingrundgerüsts charakterisiert und mit den entsprechenden Pergolid-Derivaten verglichen werden. Dazu sollten funktionelle in vitro Modelle an Rezeptoren vom Schwein eingesetzt werden.

Die Interstitialzellen VICs sind die Hauptzellpopulation im Klappengewebe und erfüllen die Funktion der Erhaltung und Umbau der Struktur der Herzklappen (Messier et al., 1994; Mulholland und Gotlieb, 1996). Erkrankungen der Herzklappen gehen mit einer Aktivierung der VICs in dem Myofibroblasten-Phänotyp einher. Charakteristisch für die Valvulopathien sind die erhöhte Proliferationsrate der aktivierten VICs und Störungen bei der Biosynthese der ECM (Hinton et al., 2006; Liu et al., 2007). Die Auswirkungen von Cabergolin auf die ECM-Synthese als ein Zeichen fibrotischer Veränderungen sollte in einer Primärkultur aus Aorten- und Mitralinterstitialzellen vom Schwein untersucht werden.

Weiterhin sollte die Beteiligung der ERK1/2 Kinasen und der Src-Tyrosinkinasen als frühe potentielle Mechanismen der Fibrose überprüft werden. Die wissenschaftlichen Veröffentlichungen über die Arzneimittel-induzierte Herzklappenfibrose sind nicht einheitlich bezüglich des genauen Fibrose-vermittelnden Serotoninrezeptortyps; daher sollte auch die Beteiligung verschiedener Serotoninrezeptortypen überprüft werden.

In in vitro Studien konnte eine direkte kontraktile Wirkung von Serotonin auf das Herzklappengewebe gezeigt werden, die die Funktionsfähigkeit der Herzklappen

beeinflussen könnte (Chester et al., 2000). Daher sollte die Wirkung von Cabergolin auf die Kontraktionsfähigkeit der Aortenklappe sowie die Beteiligung der verschiedenen Rezeptortypen und Signalkaskaden an diesem Effekt in funktionellen pharmakologischen Studien untersucht werden.

Dopaminagonisten vom Ergolin-Typ mit antagonistischen Eigenschaften an den 5-HT_{2A} und 5-HT_{2B}-Rezeptoren wie Tergurid verursachen keine fibrotischen Nebenwirkungen und können sogar eine protektive Wirkung bei fibrotischen Erkrankungen am Herzen und der Lunge aufweisen (Antoniou, 2011; Hauso et al., 2007). Zu einer vollständigeren Überprüfung der in dieser Arbeit zugrundeliegenden Hypothese sollten die antifibrotischen Eigenschaften von Tergurid im VIC-Zellkulturmodell untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Technische Geräte

Analysenwaage Mettler Toledo XS205	Mettler-Toledo, Gießen
Autoklav Tuttnauer	Ara-Service D. Mohnke, Berlin
Bandelin Sonorex TK52	Bandelin Electronics, Berlin
Brutschrank HeraCell	Heraeus, Hanau
Einkammer-Organbäder, 20 ml, temperierbar	TSE, Bad Homburg
Einkanalpipetten, Discovery (Volumenbereich 2–5000 µl)	Abimed, Langenfeld
Elektromechanischer Druckwandler	Fleck, Mainz
Elektrophoresekammer Multigel long	Biometra, Göttingen
Entwicklungskassette	Kodak, München
Fluoreszenzmikroskop Keyence BZ 8 000	Keyence, Neu-Isenburg
Gefrierschrank Hera Freeze, -80 C	Heraeus, Hanau
Kompensograph C1016	Siemens, Erlangen
Magnetrührer IKA-Combimag RCT	IKA®-Werke, Staufen
Mikroplattenreader FLUOstar OPTIMA®	BMG Labtech, Offenburg
Mikroplattenschüttler VWR	VWR International, Darmstadt
Neubauer-Zählkammer (0,0025 mm ² /0,1 mm)	Carl-Zeiss, Jena
Organhäkchen, Edelstahl, d=0.3 mm	Eigenanfertigung
Phasenkontrast-Mikroskop Axiovert 135	Carl-Zeiss, Jena
Phasenkontrast-Mikroskop Axiovert 40	Carl-Zeiss, Jena
pH-Meter	Knick, Nürnberg
Reagenzglasschüttler, IKA Lab Dancer	IKA®-Werke, Staufen
Reinstwassersystem Labostar	SG, Barsbüttel
Rocking Platform VWR	VWR International, Darmstadt
Scheren und Pinzetten zum Präparieren	Carl Teufel, Emmingen
Semi-Dry-Blottingkammer	G&P Kunststofftechnik, Kassel
Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Sterilarbeitsbank LaminAir®	Heraeus, Hanau
Szintillationszähler 1450 Microbeta™ Plus	Wallac, Freiburg

Thermoblock TB1	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge Mikro 20	Hettich, Tuttlingen
Transducer TF6V5	FMI, Seeheim-Jugenheim
Verstärker, Transducer Coupler 4711	TSE, Bad Homburg
Vierkanal-x-t-Kompensationsschreiber	Siemens, München
Vortex	Heidolph, Schwabach
Waagen Sartorius AW4202, BL 150	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad GFL	GFL mbH, Burgwedel
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	Carl Roth, Karlsruhe
Filterpapier Whatman	VWR International, Darmstadt
Filterplatten 96-Loch, Millipore HTS	VWR International, Darmstadt
Kammerobjektgläser Lab-Tek II, steril	Brand, Wertheim
Kryoröhrchen, steril	Carl Roth, Karlsruhe
Nalgene Freezing Container	VWR International, Darmstadt
Pipette, serologisch, steril, 5, 10, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen 10, 200, 1000, 5000 µl	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilm Kodak Biomax® light	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Spritze ohne Kanüle Terumo 5, 10, 30 ml	VWR International, Darmstadt
Spritzenvorsatzfilter, steril, 0.2 µm	VWR International, Darmstadt
Transfermembran, Westran® S PVDF	VWR International, Darmstadt
Vakuumfiltrationssystem TPP 500 ml, steril	NeoLab, Heidelberg
Zellkulturflaschen 25, 75 cm ²	NeoLab, Heidelberg
Zellkulturplatten, 24-Loch, BD Falcon™	VWR International, Darmstadt
Zellkulturplatten, 96-Loch, TPP	Biochrom, Berlin
Zellkulturschaber, TPP	Biochrom, Berlin
Zellkulturschalen TPP, 5 und 10 cm	Biochrom, Berlin
Zentrifugenröhrchen, steril 15, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.3 Chemikalien und Substanzen

5-Carboxamidotryptamin (5-CT)	GSK, München
5-Hydroxytryptamincreatininsulfat (5-HT)	Sigma Aldrich, Taufkirchen

Acrylamid 30% Fertiglg.	VWR International, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Aprotinin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Bradykinintriacetat	Sigma Aldrich, Taufkirchen
BW723C86	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Cabergolin	Tocris, Biozol, Eching
Calciumchloriddihydrat	Merck, Darmstadt
Carbogen	Air Liquide, Düsseldorf
Cocainhydrochlorid	Merck, Darmstadt
Color Burst™ (Protein Marker)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
DAPI	Sigma Aldrich, Taufkirchen
D-Glucosemonohydrat	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DMEM/Ham's F12	Sigma Aldrich, Taufkirchen
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Essigsäure, konzentriert	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Ethanol	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Fetales Kälberserum (FCS), HyClone®	Thermo Fischer Scientific
Filmentwickler Kodak GBX	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Filmfixierer Kodak GBX	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Fluoromount®	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Glucosamin hydrochlorid, D-[6- ³ H]-	Perkin Elmer, Deutschland
GR127935	Glaxo Wellcome Research, UK
GTPγS, [35S]	Perkin Elmer, Deutschland
Glycin	Biomol, Hamburg
Indometacin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Ketanserintartrat	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Kollagenase Typ II	Sigma Aldrich, Taufkirchen
L-Ascorbinsäure	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Leupeptin hydrochlorid	Sigma Aldrich, Taufkirchen
LumiGlo® Chemiluminiszenz Reagenz	New England Biolabs, Frankfurt
Magermilchpulver	Apotheke

Magnesiumsulfatheptahydrat	Merck, Darmstadt
MDL100907	ABX, Radeberg
Methanol	Sigma Aldrich, Taufkirchen
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin (TEMED)	VWR International, Darmstadt
Naphthol blue black (Amidoschwarz 10B)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Natriumdesoxycholat	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat 20% Lsg (SDS)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Natriumfluorid	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Natriumorthovanadat (Na ₂ VO ₄)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
PD98059	Tocris, Biozol, Eching
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Pepstatin A	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Phenelzinsulfat	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma Aldrich, Taufkirchen
PP 2	Tocris, Biozol, Eching
Prazosin hydrochlorid	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Prolin, L-[2,3,4,5- ³ H]-	Perkin Elmer, Deutschland
Red/Blue Loading Buffer Pack 3X	New England Biolabs, Frankfurt
Restore™ Stripping buffer	Thermo Fischer Scientific
Salzsäure	Sigma Aldrich, Taufkirchen
SB204741	Tocris, Biozol, Eching
Serumalbumin vom Rind (BSA)	Biomol, Hamburg
Szintillationsflüssigkeit Optiphase® Supermix	Wallac, Freiburg
TCB-2	Tocris, Biozol, Eching
Tergurid	Alfarma, Cernosice, Tschechien
Thymidin, [Methyl- ³ H]-	Perkin Elmer, Deutschland
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Tris Base, TrisHCl	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Triton X-100	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Trypsin	Biochrom, Berlin
Tween 20	Biozol, Eching
U0126	New England Biolabs, Frankfurt

U46619

Upjohn, Deutschland

2.1.4 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen**2.1.4.1 Lösungen für Organbadstudien**

	<i>KHS-Lsg. A (in mM)</i>	<i>KHS-Lsg. B (in mM)</i>
NaCl	118	118
KCl	4.7	4.7
NaHCO ₃	25	25
KH ₂ PO ₄	1.2	1.2
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.5	1.6
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.2	1.2
D-Glucose·H ₂ O	10	10

2.1.4.2 Lösungen für die Zellkultur*Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)*

0.2 g/l	KCl
8.0 g/l	NaCl
0.2 g/l	KH ₂ PO ₄
1.44 g/l	Na ₂ HPO ₄

gelöst in Aqua bidest.

Trypsin-EDTA-Lösung

1.67 mg/ml	Trypsin
0.67 mg/ml	EDTA

gelöst in PBS

Antibiotikallösung

100 U/ml	Penicillin
100 µg/ml	Streptomycin

gelöst in PBS

Einfriermedium

10 %	DMSO
10 %	FCS
1 %	Antibiotikallösung
gelöst in DMEM/F12	

Wachstumsmedium

10 % FCS
1 % Antibiotikallösung
gelöst in DMEM/F12

Basalmedium

0.5 oder 0.2 % FCS
1 % Antibiotikallösung
gelöst in DMEM/F12

2.1.4.3 Lösungen zur Zellyse*Lysepuffer für die Zellyse (RIPA-Puffer):*

50 mM	Tris HCl, pH 8.0
150 mM	NaCl
1 %	Triton X-100
0.5 %	Natriumdeoxycholat
0.1 %	SDS

Unmittelbar vor Gebrauch wurden folgende Phosphatase- und Protease-Inhibitoren hinzugefügt:

2 µg/ml	Aprotinin
10 µg/ml	Leupeptin
1 µg/ml	Pepstatin A
1 mM	PMSF
10 mM	NaF
1 mM	Na ₂ VO ₄
5 mM	EDTA

2.1.4.4 Lösungen für die Proteinanalyse**Lösungen für die Proteinquantifizierung:***Farbstofflösung 10-fach konzentriert*

1.3 g/100 ml	Amidoschwarz-10B
30 %	Eisessig
10 %	Methanol
60 %	Aqua dest.

Waschlösung:

30 %	Eisessig
10 %	Methanol
60 %	Aqua dest.

Lösungen für Western Blot und SDS-PAGE:*Sammelgellösung zur Herstellung eines 5 % igen Polyacrylamidgels*

0.65 ml	Acrylamid 30 %
1.25 ml	Tris/SDS Puffer 4X pH 6.8
3.05 ml	Aqua bidest.
36 µl	APS, 10 %-Lösung
6 µl	TEMED

Trenngellösung zur Herstellung eines 10 % igen Polyacrylamidgels

5.0 ml	Acrylamid 30 %
3.75 ml	Tris/SDS Puffer 4X pH 8.8
6.25 ml	Aqua bidest.
60 µl	APS, 10 %-Lösung
12 µl	TEMED

Tris/SDS Puffer pH 8.8 4-fach konzentriert

36.34 g	Tris HCl
0.8 g	SDS
150 ml	Aqua bidest., pH mit HCl auf 8.8 einstellen und ad 200 ml auffüllen

Tris/SDS Puffer pH 6.8 4-fach konzentriert

12.11 g	Tris HCl
0.8 g	SDS
150 ml	Aqua bidest., pH mit HCl auf 6.8 einstellen und ad 200 ml auffüllen

Laufpuffer 10-fach konzentriert

30.2 g	Tris
144 g	Glycin
10 g	SDS
800 ml	Aqua bidest., pH auf 8.3 einstellen und ad 1000 ml auffüllen

Laufpuffer

100 ml	10x Laufpuffer
900 ml	Aqua bidest.

Blotting Puffer 10-fach konzentriert

30.2 g	Tris Base
144 g	Glycin
800 ml	Aqua bidest., pH auf 8.3 einstellen und ad 1000 ml auffüllen

Blotting Puffer

100 ml	Blotting Puffer 10X
200 ml	Methanol
Aqua bidest. ad 1000 ml	

PBST

0.01 % Tween 20 in PBS

Block-Puffer

5 % Magermilchpulver in PBST

2.1.4.5 Lösungen für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen

Lösung zur Permealisation

0.25 % Triton X-100 in PBS

Blocklösung

1 % BSA in PBST

Primärantikörperlösungen

Primärantikörper verdünnt in Block-Lösung im Verhältnis 1 : 800 für den polyclonalen anti-von Willebrand Faktor (vWF) Ab, Wirt: Kaninchen, 1 : 200 für den Monoklonaler anti- α -SMA-Ab, Wirt: Maus.

Sekundärantikörperlösungen

Sekundärantikörper verdünnt in Block-Lösung im Verhältnis 1 : 500

2.1.4.6 Lösungen für die radiometrischen Untersuchungen*HEPES-Puffer, pH 7.4*

20 mM	HEPES
10 mM	MgCl ₂
100 mM	NaCl
40 µg/ml	Saponin

Waschpuffer, pH 7.4

140 mM	NaCl
10 mM	KCl
1.5 mM	KH ₂ PO ₄
8 mM	Na ₂ HPO ₄

2.1.4.7 Herstellung von Lösungen der Testsubstanzen

Von allen Substanzen wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von 1 oder 10 mM in demineralisiertem Wasser hergestellt. Abweichend davon wurden folgende Lösungsmittel verwendet: DMSO (SB204741, PD98059, PP2, U0126), 50 % Ethanol (Indometacin, Prazosin). Cabergolin, die Cabergolin-Derivate und MDL100907 wurden nach Zusatz einer äquimolaren Menge HCl in 50 % Ethanol gelöst. GR127935 wurde zunächst in 40 % des Wasserendvolumens angelöst, auf 70 °C erhitzt und nach der Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Lösung auf das Endvolumen gebracht. Die Stammlösungen wurden bei -20 °C gelagert. Für die Experimente an isolierten Organen wurden die benötigten Konzentrationen kurz vor Gebrauch durch schrittweises Verdünnen mit demineralisiertem Wasser hergestellt. Für die Untersuchungen an Zellkulturen wurden die Stammlösungen verdünnt, sterilfiltriert und unter Einsatz steriler PBS Lösung weitere Verdünnungen erhalten, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. In den Kontrollexperimenten wurden die entsprechenden Lösungsmittelvolumina eingesetzt. Die Stammlösungen der Protease- und Phosphataseinhibitoren wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Aliquots wurden unmittelbar vor Gebrauch aufgetaut und nur einmal verwendet. Für die Herstellung der Stammlösungen in den angegebenen Konzentrationen wurden folgende Lösungsmittel verwendet: demineralisiertes Wasser für Aprotinin (0.5 mg/ml), Leupeptin (1 mg/ml), Natriumfluorid (500 mM), Natriumorthovanadat (100 mM, der pH-Wert wird mit HCl auf 9 eingestellt), Ethanol für PMSF (100 mM) und Methanol für Pepstatin A (1 mg/ml).

2.2 Methoden

2.2.1 Untersuchungen an isolierten Organen (Organbadstudien)

2.2.1.1 Vorbereitung der Organe und allgemeine Durchführung

Isolierte Organe von Schlachtschweinen (*Sus scrofa*) wurden von der Lehr- und Versuchsanstalt Teltow-Ruhlsdorf zur Verfügung gestellt. Es wurden weibliche oder kastrierte männliche Schweine mit einem Gewicht von 100 bis 120 kg verwendet. Die Tiere wurden mit einem Stromschlag betäubt und durch Ausbluten aus der Hauptschlagader getötet. Unmittelbar danach wurden die Organe (Herz und Lunge) entnommen und in einer gekühlten (4 °C) Krebs-Henseleit-Pufferlösung (KHS) transportiert. Ein bis zwei Stunden post mortem erfolgte die Präparation des Zielgewebes aus den Organen sowie eine feinere Abtrennung von benachbartem Gewebe. Die Vorbereitung wurde in gekühlter KHS-Puffer unter ständiger Begasung mit Carbogen (O₂:CO₂ /95:5) durchgeführt.

Die Gewebesegmente wurden mithilfe von L-förmigen Edelstahlhäkchen (Ringsegmente aus Pulmonal- und Koronararterien) oder von Schlinge und Faden (Gewebestreifen aus Aortenklappe) in den Organbädern befestigt. Diese wurden vorher mit KHS-Pufferlösung gefüllt, auf 37 °C temperiert und kontinuierlich mit Carbogen begast. Isometrische Änderungen in der Kontraktionskraft wurden durch einen elektromechanischen Transducer (TF6V5) und Verstärker (Transducer-Coupler TSE 4711) registriert und mit einem Schreiber (Siemens C 1016 Compensograph) aufgenommen.

Nach dem Einbringen der Gewebesegmente wurde eine Basalkraft von 20 mN (Aortenklappenstreifen: 5 mN) in allen Organbädern eingestellt. Nach einer Ruhephase von 30 min wurde die Pufferlösung getauscht und die Basalkraft erneut auf 20 mN bzw. 5 mN eingestellt. Nach weiteren 30 min erfolgten je nach Versuchsaufbau zwei Vorkontraktionen bzw. Vorrelaxationen und anschließend eine weitere Ruhephase vor der Aufnahme der Konzentrations-Wirkungskurve (concentration-response curve, CRC). Die Methode für die Aufnahme der CRC wurde je nach Gewebeart gewählt. Für die Untersuchungen an Koronararterien und Aortenklappen wurden die getesteten Agonisten in konzentrationssteigenden halben logarithmischen Schritten hinzugefügt. Diese kumulative Methode konnte bei den Untersuchungen an den Pulmonalarterien nicht angewendet werden. Stattdessen wurde nach der nichtkumulativen Methode die

Wirkung der einzelnen Konzentrationen in separaten Organbädern mit je einem Gewebesegment erfasst.

Um die Badflüssigkeit auszutauschen, wurde die Flussrate der Apparatur vor dem Einbringen der Testorgane auf 40ml/min eingestellt. Dies entspricht einem zweifachen kompletten Tausch der Badflüssigkeit pro Minute und diente der Sicherstellung einheitlicher Waschbedingungen.

Bei der Durchführung von Experimenten in Anwesenheit von Testantagonisten wurden diese in der Ruhephase vor der Stimulation mit den Testagonisten in die Pufferlösung hinzugefügt und für 30 bis 60 min mit den Gewebesegmenten präinkubiert.

Bei allen Experimenten wurden parallel zu den Testsubstanzen Kontrollkurven mit Serotonin aufgenommen.

2.2.1.2 Untersuchungen an 5-HT_{2A}-Rezeptoren in der Koronararterie vom Schwein

Um pharmakologische Effekte an den 5-HT_{2A}-Rezeptoren zu untersuchen, wurde die Schweinekoronararterie als funktionelles Modell verwendet. Es ist bereits bekannt, dass Serotonin über 5-HT_{2A}-Rezeptoren an diesem Gewebe Kontraktionen auslöst (Cushing und Cohen, 1993; Görnemann et al., 2008a). Beide Äste der linken Koronararterie Ramus interventricularis anterior und Ramus circumflexus, wurden wie in Kap. 2.2.1.1 beschrieben aus Schweineherzen entnommen und in Ringsegmente mit einer Länge von 2 - 3 mm geschnitten (Abb. 6). Um die Endothelschicht auf der Lumenseite der Gefäße zu zerstören, wurde jeder Ring mit einer Pinzette gerollt.



Abb. 6 Präparation der Koronararterie des Schweins mit abgeschnitten Ringsegmenten und Befestigung an L-förmigen Edelstahlhäkchen (Foto Dr. Tilo Görnemann).

Die Arterienringe wurden dann senkrecht durch zwei Häkchen in Organbäder befestigt. Die Organbäder wurden zuvor bereits auf 37 °C temperiert, mit Carbogen begast und mit der Krebs-Henseleit Lösung befüllt. Danach wurde eine Ruhespannung von 20 mN eingestellt. Es folgte eine Ruhephase von 30 min zur Stabilisierung der Arteriensegmente. Danach wurde die Flüssigkeit in den Organbädern erneuert, wobei

eine feste Spülzeit von 3 min eingestellt wurde. Nach weiteren 30 min Ruhephase wurde die Spannung nochmals auf 20 mN justiert. Durch Zugabe von 50 mM KCl in die Badflüssigkeit wurde die erste Kontraktion induziert (Abb. 7, Kurve A). Nach dem Erreichen des maximalen kontraktileffekts, der durch ein Plateau in der Aufnahmekurve registriert wurde, wurde die Spannung durch eine erneute Spülzeit von 5 min auf dem Basalwert zurückgesetzt. Eine zweite Kontraktion mit 50 mM KCl wurde induziert (Abb. 7, Kurve B). Nach Erreichen der zweiten Plateau-Phase wurden 0.1 μ M Bradykinin dazugegeben. Durch das Fehlen einer Bradykinin-induzierten Relaxation der Arterien wurde die vollständige Beseitigung der Endothelschicht überprüft. Arteriensegmente, die in der Anwesenheit von Bradykinin relaxierten, wurden von der Untersuchung ausgeschlossen. Es folgten eine Spülung von 5 min, eine Ruhephase von 15 min und eine erneute Spülphase von 3 min. Sobald die Experimente in Anwesenheit von Testantagonisten durchgeführt wurden, wurden diese in die Bäder dazugegeben. Bei allen Experimenten wurde zusätzlich in die Badflüssigkeit Prazosin 0.1 μ M, Cocain 6 μ M und Indometacin 5 μ M hinzugefügt, um α_1 -Adrenorezeptoren zu blockieren, die Wiederaufnahme von Serotonin und die Aktivität der vaskulären Cyclooxygenase zu hemmen. Nach 60 min wurden kumulative Konzentrations-Wirkungskurven der getesteten Agonisten (5-HT, Cabergolin und seine Derivate) aufgenommen (Abb. 7, Kurve C). Jede Konzentration der Agonisten wurde nach Erreichen des Maximaleffekts der vorherigen Konzentration appliziert. Die pharmakologischen Effekte wurden als Prozent der maximalen KCl-induzierten Kontraktion (100 %) berechnet.

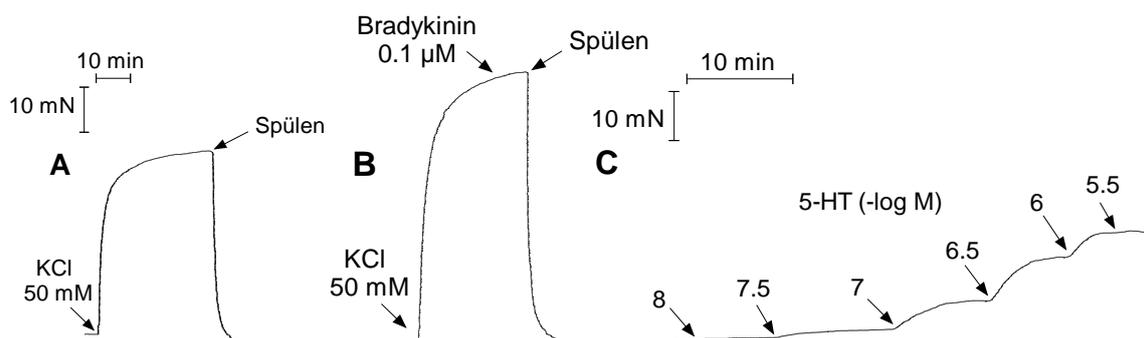


Abb. 7 Representative Darstellung des Verlaufs der 5-HT_{2A}-Rezeptor-vermittelten Kontraktionen an der Koronararterie des Schweins in Organbadstudien.

2.2.1.3 Untersuchungen an 5-HT_{2B}-Rezeptoren in der Pulmonalarterie vom Schwein

Die Untersuchung der Effekte an 5-HT_{2B}-Rezeptoren erfolgte an der isolierten Pulmonalarterie des Schweins. Es wurde bereits beschrieben, dass Serotonin eine relaxierende Wirkung auf die Schweinekoronararterie ausübt (Glusa und Pertz, 2000). Pulmonalarterien wurden aus beiden Lungen wie in Kap. 2.2.1.1 beschrieben entnommen. Die Arterien wurden in einzelne Ringsegmente mit einer Länge von 2-3 mm geschnitten und mit Edelstahlhäkchen in den Organbädern befestigt. Während der Gewebepräparation wurde auf die Erhaltung einer intakten Endothelschicht geachtet. Für diese Untersuchung wurde die Krebs-Henseleit-Lösung A verwendet. Zunächst wurde eine Basalspannung von 20 mN eingestellt. Während der Stabilisierungsphase von 60 min wurde die Badflüssigkeit nach 30 min getauscht. Die Ruhespannung wurde nochmal auf 20 mN eingestellt. In einem Abstand von 45 min wurden die Gefäße einmal mit 30 mM KCl und dreimal mit 0.01 µM 9,11-Dideoxy-9α,11α-epoxymethanoprostaglandin F_{2α} (U 46619) kontrahiert (Abb. 8, Kurven A, B und C). Nachdem die Kontraktion konstant geblieben war, wurde 5 min mit KHS-Lösung A gespült, um KCl oder U 46619 auszuwaschen und die Gefäße wieder zur Ruhespannung zu bringen. Falls erforderlich, wurde nach 15 min die Ruhespannung wieder auf 20 mN eingestellt. Um die Integrität der Endothelschicht zu überprüfen, wurde nach Erreichen des Maximaleffekts der zweiten U 46619-induzierten Kontraktion 0.01 µM Bradykinin dazugegeben (Abb. 8, Kurve B). Die relaxierenden Eigenschaften der Endothelschicht wurden für intakt befunden, wenn durch die Zugabe von Bradykinin mindestens 80 % der Kontraktion abnahm. In diesem Fall wurden die entsprechenden Arteriensegmente weiter verwendet. Die relaxierenden Effekte von 5-HT, Cabergolin und seinen Derivaten wurden nach der Stabilisierung der dritten Kontraktion mit U 46619 untersucht (Abb. 8, Kurve D). Die CRC für 5-HT wurde nach der kumulativen Technik aufgenommen, wohingegen für Cabergolin und seine Derivate nur die nichtkumulative Methode anwendbar war. Da bekannt ist, dass manche Gewebearten nur auf die erste Konzentration von Ergotalkaloid-Derivaten ansprechen, wurde für jede Agonistenkonzentration je ein Organbad mit einem separaten Gewebesegment verwendet (Müller-Schweinitzer, 1990). Die Experimente wurden parallel in Ab- und Anwesenheit des 5-HT_{2B}-Rezeptorantagonisten SB 204741 (3 µM) durchgeführt. Die Zugabe erfolgte 30 min vor der Aufnahme der CRC. Wenn Cabergolin-Derivate mit antagonistischen oder partialagonistischen Eigenschaften getestet wurden, wurden diese für 60 min vor der Aufnahme der 5-HT-CRC inkubiert. Nach Erreichen des

maximalen relaxierenden Effektes wurde $0.01 \mu\text{M}$ Bradykinin hinzugefügt und die vollständige Relaxation ausgelöst (Abb. 8, Kurve D). Die relaxierenden Effekte in die CRC wurden als Prozent des maximalen erreichbaren Effekts bei der vollständigen Relaxation nach der Zugabe von Bradykinin berechnet.

Serotonin kann gegensätzliche Wirkungen auf die Regulation des Tonus der Blutgefäße aufweisen, daher kann es erforderlich sein 5-HT-Rezeptorsubtypen, die unter diesen Testbedingungen eine Kontraktion auslösen, zu hemmen, um den relaxierenden Effekt von 5-HT beobachten zu können (McLennan und Taylor, 1984). Aus diesem Grund wurden alle Experimente in der kontinuierlichen Anwesenheit von $0.1 \mu\text{M}$ Ketanserin durchgeführt, um eine Aktivierung der glattmuskulären 5-HT_{2A} -Rezeptoren zu hemmen.

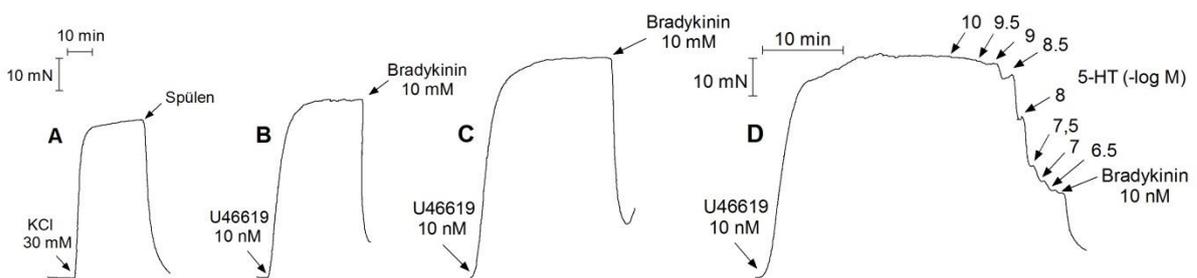


Abb. 8 Representative Darstellung des Verlaufs der 5-HT_{2B} -Rezeptor-vermittelten Relaxation an der Pulmonalarterie des Schweins in Organbadstudien.

2.2.1.4 Untersuchungen an isolierten Aortenklappen vom Schwein

Die drei Segel der Aortenklappe wurden, wie in Kap. 2.2.1.1. beschrieben, aus Schweineherzen entnommen. Aus jedem Segelblatt wurde in Längsrichtung das freie Ende abgeschnitten, so dass aus jedem Segelblatt nur der mittlere Streifen mit einer Breite von ca. 5 mm verblieb. Anschließend wurden alle drei Streifen auf gleiche Länge gebracht und mit Hilfe einer Stahlnadel und Faden im Organbad befestigt. Untersuchungen an verschiedenen Regionen der Klappensegel zeigten, dass die kontraktile Fähigkeit dieses Gewebes in dem zentralen Bereich am stärksten ist, verglichen mit dem freien Rand oder der Basalregion an der Grenze mit dem Aortenstamm (Kershaw et al., 2004). Außerdem unterschieden sich die Kontraktionen in den Längs- und Querrichtungen in der Kontraktionskraft. In der Längsrichtung wurde eine größere Kontraktionskraft gemessen als in der Querrichtung. Basierend auf diesen Untersuchungen wurden alle Experimente an dem zentralen Bereich der Klappensegel in Längsrichtung gemessen. Für diese Untersuchung wurde die KHS-Lösung B verwendet. Zu Beginn der Experimente wurde die Ruhespannung auf 5 mN eingestellt.

Es folgte eine Ruhephase von 60 min, in der die Badflüssigkeit zweimal ausgetauscht (Spülzeit von 5 min) und die Ruhespannung bei Bedarf wieder auf 5 mN eingestellt wurde. Nach der Stabilisierungsphase wurde eine Vorkontraktion durch Zugabe von 3 μ M Serotonin ausgelöst. Nach Erreichen des Kontraktionsmaximums wurden die Gewebestreifen mehrmals mit frischer KHS-Lösung B gewaschen. Bei einigen Experimenten wurden Antagonisten hinzugefügt, und die CRC wurde nach weiteren 30 min nach der kumulativen Methode aufgenommen. Die kontraktile Effekte wurden als Prozent der Vorkontraktion mit 5-HT berechnet.

2.2.2 Isolierung der primären Kultur von Herzklappeninterstitialzellen

2.2.2.1 Gewinnung und Kultivierung von primären Herzklappeninterstitialzellen

Für die zellspezifischen Untersuchungen wurde eine Primärkultur von Herzklappeninterstitialzellen isoliert. Herzen von Schlachtschweinen wurden von der Lehr- und Versuchsanstalt Teltow-Ruhlsdorf bezogen. Unmittelbar nach dem Schlachten wurden die Herzen in sterile Transportgefäße überführt und in KHS-Lösung B getränkt. Die KHS-Lösung wurde vorher für 15 min mit Carbogen begast und anschließend durch einen Membranfilter mit Porengröße 0.22 μ m sterilfiltriert. Unmittelbar vor dem Gebrauch wurde die so vorbereitete Puffer-Lösung mit 100 U/ml Penicillin und 0.1 mg/ml Streptomycin versetzt. Unter der LAF-Werkbank wurden mithilfe von sterilem Skalpell und Scheren die Mitralklappen- und Aortenklappen entnommen. Mit dem Skalpell wurde auf beiden Seiten vorsichtig die Endothelschicht der Klappensegel entfernt. Das Gewebe wurde in kleine Fragmente geschnitten (2 bis 5 mm) und in einer Lösung von Kollagenase Typ II in DMEM/F12 (2 mg/ml) bei 37 °C in einem Inkubationsschüttler bei niedriger Drehzahl geschwenkt. Die Kollagenase löste die Zellen aus dem Zellverband ab. Zur Beendigung der Enzymreaktion wurde zu der entstandenen Zellsuspension fetales Kälberserum (FCS) hinzugefügt. Das FCS diente als Enzymsubstrat. Die Gewebestücke und die suspendierten Zellen wurden zweimal für 5 min zentrifugiert und anschließend mit PBS-Lösung gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in vorgewärmtem Wachstumsmedium resuspendiert und in 150 cm²-Zellkulturflaschen eingesät. Die so gewonnenen Zellen wurden als 0. Passage bezeichnet und wurden aus 3 bis 4 verschiedenen Spendern vereinigt. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C und einer Atmosphäre mit 5 % CO₂ und mindestens 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium zum ersten Mal gewechselt, um tote und nicht anhaftende Zellen zu entfernen. Danach wurden die Zellen alle 48 h mit frischem Medium versorgt. Beim Erreichen von 80-90 %

Konfluenzgrad wurden die Zellen weiter passagiert (Siehe 2.2.2.2.) oder im flüssigen Stickstoff aufbewahrt (Siehe 2.2.2.4.). Für die Untersuchungen wurden Zellen der ersten bis dritten Passage verwendet. Zur Supplementierung der Zellkulturmedien wurde ein kommerziell erhältliches dialysiertes FCS verwendet, um eine Desensibilisierung der Serotoninrezeptoren und eine Aktivierung der VICs zu vermeiden. Konventionelle Seren, die weder dialysiert noch durch andere Methoden von niedermolekularen Bestandteilen befreit wurden, können hohe Mengen an Serotonin enthalten, bedingt durch die Zerstörung von Thrombozyten während der Gewinnung und Verarbeitung.

2.2.2.2 Passagierung

Nachdem ein Konfluenzgrad von 80 - 90 % erreicht wurde, wurden die Zellen passagiert, um eine Anhäufung von Zellen aufeinander und ein Wachstum in mehreren Schichten zu verhindern.

Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen wurden mit vorgewärmter PBS-Lösung gewaschen und mit steriler Trypsin/EDTA-Lösung für 5 min im Brutschrank inkubiert. Das Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen wurde unter dem Lichtmikroskop beobachtet und wenn nötig durch ein leichtes Anklopfen der Flasche unterstützt. Durch Zugabe vom Stoppmedium wurde die Trypsinaktivität beendet, die Zellsuspension wurde zentrifugiert (5 min/1000 Umdrehungen) und anschließend im frischen Wachstumsmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde dann entweder im Verhältnis von 1:3 oder 1:4 in 75 cm² Zellkulturflaschen gesplittet oder nach einer Ermittlung der Zellzahl für zellspezifische Untersuchungen verwendet (Kap. 2.2.2.3).

2.2.2.3 Quantifizierung von Zellen für zellspezifische Untersuchungen

Bei der Durchführung von zellspezifischen Untersuchungen ist das Einsäen einer definierten Zellzahl von großer Bedeutung. Eine zu hohe Zelldichte kann zu Wachstum der Zellkultur in mehreren Schichten führen, wogegen eine zu geringe Dichte zum verlangsamten Wachstum führt. Die Zellzahl in einer Zellsuspension wurde mithilfe einer Neubauer Zählkammer (Hämozytometer) erfasst. Ein Deckglas wird auf die Kammer gedrückt und befestigt bis die Ausbildung von Newton-Ringen zu sehen ist. Die Zellsuspension wird vorsichtig geschüttelt, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu gewährleisten. Danach werden 10 µl Suspension zwischen Deckgläschen und Zellkammer aufgetragen. Unter dem Lichtmikroskop werden die Zellen in vier Felder der Kammer ausgezählt. Die Gesamtzahl der Zellen in X ml Suspension ergibt sich aus:

$$\frac{\text{Ausgezählte Zellzahl für 4 Felder}}{4} * 10^4 * X \text{ ml} = \text{Gesamtzahl der Zellen in der Suspension}$$

Die Suspension wurde für 5 min bei 1000 Umdrehungen zentrifugiert und das Zellpellet in das gewünschte Volumen Zellmedium aufgenommen. So konnte eine Zellsuspension mit einer definierten Zellzahl pro Volumen erhalten werden und durch Ausrechnen des benötigten Volumens eine bestimmte Zellzahl eingesät werden.

2.2.2.4 Kryokonservierung der Zellen

Nach Erreichen eines Konfluenzgrades von 80 - 90 % der primären Zellkultur (P_0) wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Hilfe von Trypsin abgelöst und in eine Suspension überführt. Die Zahl der Zellen wurde bestimmt und nach Abzentrifugieren wurde das Zellpellet in einem genauen Volumen Einfriermedium aufgenommen, so dass die Zelldichte $10^6/1$ ml Einfriermedium betrug und in Kryoröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden zunächst in eine Doppelwandbox, deren Ummantelung Isopropylalkohol enthielt, überführt und für mindestens 24 h bei - 80 C aufbewahrt. Danach erfolgte die Überführung in den flüssigen Stickstofftank.

Das Auftauen der Zellen erfolgte dagegen möglichst schnell. Aus dem flüssigen Stickstoff wurden die Röhrchen in einem auf 37° C vortemperierten Wasserbad erwärmt und die aufgetaute Suspension unmittelbar danach im vorgewärmten Wachstumsmedium aufgenommen. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel um DMSO-Reste aus dem Einfriermedium zu beseitigen.

2.2.3 Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Die indirekte Immunfluoreszenz ist eine Methode zur Detektion, Lokalisierung und halbquantitativen Bestimmung von Proteinen in Zellen, basierend auf der Antigen-Antikörper-Reaktion. Für diese Untersuchung wurden sterile Objektgläser, geteilt in vier separate Kammern, mit einem gemeinsamen Deckel verwendet (Lab-Tek II, Brand, Wertheim). $4 * 10^4$ Zellen wurden in jeder Kammer ausgesät und für 48 h im Wachstumsmedium inkubiert. Nach Absaugen des Mediums wurde einmal mit PBS gewaschen, und die Zellen wurden für 5 min mit eiskaltem Methanol fixiert. Danach wurden die Objektgläser für 5 min mit einer Lösung zur Permealisation versetzt, um die Detektion intrazellulärer Proteine zu erleichtern. Es folgten drei weitere Waschschrte mit PBS und die Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit Blocklösung für 30 min. Die Primärantikörperlösung wurde hergestellt und auf ein Stück Parafilm tropfenweise pipettiert (60 μ l pro Kammer). Das Objektglas wurde unter Vermeidung

der Ausbildung von Luftblasen auf den Parafilm gelegt, so dass die anhaftenden Zellen mit dem Antikörper in Kontakt kamen und über Nacht bei 4 °C stehen gelassen. Am nächsten Tag folgten drei Waschschriffe mit PBS und die Detektion mit dem sekundären Antikörper für 1 h unter Lichtausschluss, wie für den primären Antikörper beschrieben. Nach weiteren drei Waschschriffen erfolgte die Färbung der Zellkerne mit dem DNA-Farbstoff DAPI (0.1 µg/ml) für 1 min. Die DAPI-Lösung wurde einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Deckglas auf dem Objektglas mit Fluoromount®-Reagenz unter Vermeidung der Ausbildung von Luftblasen fixiert. Die Fluoromount®-Reagenz fixierte das Deckglas auf dem Objektglas und schützte die Fluoreszenzfarbstoffe vor zu schnellem Ausbleichen. Die so angefertigten Präparate wurden auf dem Fluoreszenzmikroskop Keyence BZ 8000 beobachtet und digital aufgenommen.

2.2.4 Proteinbiochemische Untersuchungen

2.2.4.1 Proteinextraktion

VIC's wurden in Zellkulturschalen ausgesät und nach Erreichen der 80 – 90 % Konfluenz auf Basalmedium mit 0.2 % FCS für 48 h umgestellt. Danach wurde das Medium nochmals ausgetauscht. Wenn die Experimente in Anwesenheit von Testantagonisten durchgeführt wurden, wurden diese 30 min vor der Stimulation mit den zu testenden Substanzen dazugegeben. Die Stimulationsdauer für die Aktivierung von phospho-ERK betrug 5 min. Das Medium wurde abgesaugt, und die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Zu jeder Schale wurden 200 µl Lysepuffer dazugegeben, das unmittelbar zuvor mit Proteinaseinhibitoren supplementiert wurde. Nach 20 minütiger Lyse auf Eis wurde für 2 min mit einem Zellkratzer gekratzt, um die vollständige Zellyse und die Abtrennung vom Kulturgefäß zu sichern. Die Lysate wurden in 1.5 ml Eppendorff-Tubes pipettiert und für 30 min in einer vorgekühlten Zentrifuge bei 4 °C 15000 g zentrifugiert. Der gelöste Proteinüberstand wurde in neue Tubes pipettiert, und der Pellet wurde verworfen. Soweit die Weiterverarbeitung der Proben nicht am selben Tag erfolgte, wurden diese bei – 20 °C aufbewahrt.

2.2.4.2 Bestimmung des Proteingehalts

Der Proteingehalt, der wie in 2.2.4.1. beschrieben gewonnenen Proben, wurde mit einer modifizierten Methode nach Popov und Schaffner bestimmt (Popov et al., 1975; Schaffner und Weissmann, 1973). Die Methode basiert auf der Ausfällung von Proteinen als unlösliche Farbstoffkomplexe mit saurer, methanolischer Amidoschwarz-

10B-Lösung. Der Test erfolgte in 96-Loch-Platten mit einem Filterboden mit einer Porengröße von 40 µm. Nach Ablauf der Fällungsreaktion wurden die Protein-Farbstoffkomplexe abzentrifugiert. Die überschüssige Farbstofflösung in dem Filtrat wurde verworfen, und das Pellet wurde dreimal gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 0.1 M NaOH solubilisiert und die Absorption in einem ELISA-Reader bei 620 nm abgelesen. Die freigesetzte Farbstoffmenge ist der Proteinausgangsmenge direkt proportional. Bei jeder Messung wurde parallel eine Kalibriergerade durch Verdünnung einer Stammlösung von Bovinem Serumalbumin (BSA) als Standard erstellt (Tabelle 1). Die Berechnung der Proteinkonzentration der Proben erfolgte über die Regressionsgleichung der Kalibriergerade. Die Bestimmung wurde dreifach ausgeführt und die Mittelwerte berechnet.

Tabelle 1 Herstellung der Kalibriergerade für die Bestimmung des Proteingehalts

Nummer der Standardlösung	Konzentration in µg/ml	Volumen in µl der BSA-Stammlösung (5 mg/ml)	Volumen in µl des Lysepuffers
S1	1750	350	650
S2	1500	300	700
S3	1250	250	750
S4	1000	200	800
S5	750	150	850
S6	500	100	900
S7	250	50	950
Blindlösung	0	0	1000

2.2.4.3 Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proben wurden mit dem entsprechenden Volumen eines kommerziell-erhältlichen 3-fachen Probenladepuffers (Red/Blue Load Buffer 3X) verdünnt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Dadurch wurden die Proteine denaturiert und die Disulfidbrücken durch das in dem Ladepuffer erhaltene Dithiothreitol (DTT) reduziert. Zwischen zwei Glasplatten wurden zunächst die Trenngellösungen gegossen und mit Isopropanol beschichtet, um eine Austrocknung und unregelmässige Polymerisation des Gels zu verhindern. Nachdem das Trenngel ausreichend polymerisiert war, wurde darauf die Sammelgellösung gegossen und ein Kamm in die Lösung eingetaucht, um die

Probentaschen zu formen. Nach vollständiger Polymerisation wurden die Kämme entfernt und jeweils zwei Gelsysteme in die Elektrophoresekammer gebracht. Das Volumen, das 20 µg Gesamtproteinmenge für jede Probe entsprach, wurde auf die Geltaschen aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine nach deren Molekulargewicht erfolgte in einem diskontinuierlichen System nach Laemmli bei 40 mA. Auf jedem Gel wurde ein kommerziell erhältlicher, vorgefärbter Proteingrößenmarker aufgetragen, der zum Nachverfolgen des Trennprozesses diente.

2.2.4.4 Western Blot (Halbtrockenverfahren, engl. Semi-Dry-System) und Detektion

Die aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe des Semi-Dry-Systems auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) übertragen. Die Trenngele wurden zurechtgeschnitten und für 10 min in Blotpuffer äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde zunächst für 1 min in Methanol aktiviert, kurz in Wasser gewaschen und ebenfalls für 10 min in Blotpuffer äquilibriert. Auf die Semi-Dry-Blotting-Kammer wurden in der gegebenen Reihenfolge folgende Schichten aufeinander gelegt: drei Blätter mit Blotpuffer getränktem Whatman-Papier, eine PVDF-Membran, Trenngel und weitere drei Blätter Whatman-Papier. Die angelegte Stromstärke betrug 1.5 mA/1 cm² bei einer Transferdauer von 90 min.

Anschließend erfolgte die Visualisierung der Proteinbanden durch indirekte Immunodetektion. Zur Sättigung der freien Bindungsstellen wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur mit Blocklösung geschwenkt. Es folgten vier Waschschriffe für jeweils 10 min mit PBST und die Markierung mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schwenken. Die Verdünnung der primären Antikörper erfolgte in 5 % BSA in PBST (1:1000 für den ph ERK-Ab, 1:750 für den Gesamt-ERK-Ab). Die Membranen wurden erneut vierfach gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper geschwenkt, der zuvor in Blocklösung verdünnt wurde (1:5000). Nach vier weiteren Waschschriffen wurde die Membran mit dem LumiGlo®-Reagenz unter Lichtausschluss (dunkle Kammer) versetzt, zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt und in einer Expositionskassette in Kontakt mit Röntgenfilm gebracht. Die ausgestrahlte Chemilumineszenz führte zu einer Schwarzfärbung des Röntgenfilms an den Stellen, wo der sekundäre Antikörper spezifisch gebunden war. Der sekundäre Antikörper war an das Enzym Meerrettich-Peroxidase HRP gekoppelt. Das LumiGlo®-Reagenz enthielt Luminol, das unmittelbar vor Gebrauch mit Wasserstoffperoxid versetzt und von dem Enzym HRP in die Dianionform überführt

wurde, welche Licht emittiert. Anschließend wurde der exponierte Film mit Entwickler und Fixierer behandelt und eingescannt.

Nach der Visualisierung der spezifischen Proteinbanden wurde durch die sog. „Stripping“-Technik eine erneute Verwendung der Membranen ermöglicht. Dafür wurden sie zunächst mit PBST gewaschen und anschließend mit einem kommerziell-erhältlichen Stripping-Puffer für 15 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Nach einem erneuten Blockschritt konnten die Membranen ein zweites Mal mit spezifischen Antikörpern detektiert werden.

2.2.5 Radiometrische Untersuchungen

2.2.5.1 Untersuchung der Synthese der extrazellulären Matrix (ECM)

Um die Biosynthese der extrazellulären Matrix (ECM) in Interstitialzellen von Herzklappen zu untersuchen, wurden radioaktiv-markierte Verbindungen verwendet. Es wurden kommerziell erhältliche Tritium [³H]-markierte Substanzen, die als Bausteine für die Makromoleküle der ECM fungieren, eingesetzt. Der Einbau der markierten Moleküle in den Interstitialzellen diente als Indiz für die Neusynthese der entsprechenden Makromoleküle. Aufgrund des häufigen Vorkommens von L-Prolin und L-Hydroxyprolin in der Aminosäuresequenz der Kollagenhelix, diente das mit Tritium markierte-L-Prolin ([³H]-L-Prolin) als ein geeigneter Indikator für die Kollagensyntheseaktivität der Zellen (Nimni, 1983). Um die Neusynthese von Glykosaminoglykanen (GAG) zu bewerten, wurde mit Tritium markiertes Glucosamin ([³H]-Glucosamin) verwendet, da Glucosamin als Hauptbauelement für GAG-Moleküle dient (Järveläinen et al., 2009).

Zellen der ersten bis dritten Passage wurden mit einer Dichte von 3×10^4 pro Loch in 24-Loch-Platten ausgesät und bis Erreichen von 80-90 % Konfluenzgrad mit Wachstumsmedium inkubiert (48 – 72 h). Danach wurde das Wachstumsmedium gegen Basalmedium mit 0.5 % FCS umgetauscht. Es erfolgte ein erneuter Mediumwechsel nach 24 h und die Zugabe der Testsubstanzen. Das Basalmedium enthielt zusätzlich Ascorbinsäure (100 µg/ml), die für die korrekte Kollagenbiosynthese und für die Quervernetzung der Kollagenhelices nötig ist (Nimni, 1983). Bei Untersuchungen in der Anwesenheit von Serotonin wurde der MAO-Inhibitor Phenelzin (10 µM) zum Basalmedium addiert, um die Metabolisierung von Serotonin zu 5-Hydroxyindolessigsäure während der Inkubationszeit zu verhindern (s. Kap. 1.4.1). Hingegen war der Zusatz von Phenelzin in der Anwesenheit von Cabergolin nicht notwendig, da Cabergolin nicht über das MAO-Enzymsystem abgebaut wird (Battaglia et al., 1993; Cocchiara und Benedetti, 1992). Wenn die Experimente in Anwesenheit

von Testantagonisten durchgeführt wurden, wurden diese 30 min vor der Zugabe der Agonisten gegeben. Weitere 30 min nach der Zugabe aller Testsubstanzen wurde der Tritium-Marker dazugegeben. Für die Collagen-Synthese wurde 0.5 μCi [^3H]-Prolin pro Loch verwendet. Dies entsprach 10 μl einer 1:20 Verdünnung der Stammlösung (1 mCi/ml, spezifische Aktivität 94.4 Ci/mmol). Für die Untersuchung der Glykosaminoglykansynthese wurden 3 μCi [^3H]-Glucosamin Hydrochlorid pro Loch pipettiert, was 30 μl der 1:10 Verdünnung der Stammlösung entsprach (1 mCi/ml, spezifische Aktivität 35.5 Ci/mmol). Nach weiteren 48 h Inkubationszeit, wurde das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden vorsichtig mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit 500 μl eiskalter Trichloressigsäure TCA (10 %) bei 4 °C für 1 h versetzt. Nach dem Absaugen der TCA wurden die Zellen erneut mit 500 μl eiskaltem PBS gewaschen und mit 200 μl einer Lösung von 0.3 M NaOH und 0.1 % SDS unter Schütteln (1 h, 150 U/min, 37 °C) aufgeschlossen. Der Zellaufschluss wurde in 2 ml Kunststoffröhrchen überführt und mit 1.5 ml Scintillations-Cocktail durch Schütteln vermischt. Die radioaktive Strahlung aus den Proben induzierte die Fluoreszenz des Scintillations-Cocktails und konnte dadurch in einem Szintillationszähler quantifiziert werden.

Die Experimente wurden dreifach oder vierfach durchgeführt und daraus die Mittelwerte gebildet. Die Auswertung der Daten erfolgte durch Dividieren der Mittelwerte für die jeweilige Behandlung durch die Mittelwerte der Negativkontrolle. Als Negativkontrolle wurde die entsprechende Menge Lösungsmittel statt Substanzlösung hinzugefügt und die Zellen unter den gleichen Versuchsbedingungen behandelt. Die so ermittelte Einbaurrate zeigte die x-fache Veränderung in der Syntheseaktivität im Vergleich zur Negativkontrolle.

Die Experimente wurden unter der Beachtung der Regeln für radioaktives Arbeiten durchgeführt. Nach jedem Arbeitsvorgang wurde ein Wischtest durchgeführt. Mithilfe von Ethanol-getränktem Filterpapierstücke wurden Arbeitsgeräte oder Arbeitsflächen gewischt. Die Filterstücke wurden in 2 ml Kunststoffröhrchen mit Scintillationscocktail eingetaucht, vermischt und die strahleninduzierte Fluoreszenz wurde quantifiziert. Dabei wurden mindestens 6 Stellen auf radioaktive Kontamination untersucht. Die Messwerte von Wischtests, sowie der Verbrauch und Bestellungen von radioaktiven Substanzen wurden stets dokumentiert.

2.2.5.2 Untersuchung der Zellproliferation

Eine gut etablierte Methode zur Untersuchung der Zellproliferation *in vitro* ist die Markierung von Zellen mit radioaktiven Nukleotiden wie das Tritium-haltige Methylthymidin ($[^3\text{H}]$ -Methylthymidin). Dieser Proliferationstest beruht auf der Messung der Strahlung der eingebauten $[^3\text{H}]$ -Methylthymidin während der S-Phase des Zellzyklus als Maß für die neusynthetisierte DNA (Goncharova et al., 2007).

3×10^4 Zellen pro Loch wurden in 24-Loch Platten ausgesät und für 24 h inkubiert. Danach wurde das Wachstumsmedium mit Basalmedium (0.2 % FCS) ausgetauscht, um den Zellzyklus in die G_0/G_1 -Phase zu synchronisieren (Goncharova et al., 2007). Nach weiteren 24 h wurde das Basalmedium nochmal ausgetauscht und die Testsubstanzen dazugegeben, wobei Antagonisten 30 min vor der Zugabe von Agonisten hinzugefügt wurden. Das Basalmedium enthielt zusätzlich Ascorbinsäure (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und den MAO-Hemmer Phenelzin (10 μM). Nach 4 h wurden 1 μCi $[^3\text{H}]$ -Methylthymidin pro Loch hinzugefügt, was 10 μl einer 1:10 Verdünnung der Stammlösung entsprach (1 mCi/ml, spezifische Aktivität 23-27 Ci/mmol). Nach dem Ablauf von weiteren 20 h wurden die Zellen, wie bereits in Kap. 2.2.5.1 beschrieben, zunächst mit TCA fixiert und anschließend alkalisch aufgeschlossen. Die strahleninduzierte Fluoreszenz wurde im Scintillationszähler quantifiziert. Die Versuche wurden in Triplikat oder in Quadruplikat durchgeführt, und die Auswertung erfolgte wie in Kap. 2.2.5.1 beschrieben. Auch diese Untersuchung wurde unter der Beachtung der Regeln für radioaktives Arbeiten durchgeführt.

2.2.5.3 Dopamin D_2 -Rezeptor-Bindungstudien ($[^{35}\text{S}]$ GTP γ S-Binding-Assay)

Mit Hilfe einer $[^{35}\text{S}]$ GTP γ S-Bindungsstudie wurde die agonistische Potenz ausgewählter Substanzen an rekombinanten humanen $D_{2\text{Long(L)}}$ - und $D_{2\text{Short(S)}}$ - Rezeptoren untersucht (Harrison und Traynor, 2003; Schlotter et al., 2005). Die Studie wurde von Herrn Dr. H. Hübner (Friedrich Alexander Universität, Erlangen) übernommen.

Zu diesem Zweck wurden CHO-Zellmembranen verwendet, die humanen $D_{2\text{L}}$ - und $D_{2\text{S}}$ - Rezeptoren stabil exprimieren (Hayes et al., 1992) Die Vorbereitung der Membranhomogenate erfolgte wie bereits in Hübner et al. (2000) beschrieben. Die Rezeptordichte betrug 0.78 pmol/ μg für die $D_{2\text{L}}$ - bzw. 3.37 pmol/ μg für die $D_{2\text{S}}$ - Rezeptoren. Nach Verdünnung der Membranhomogenate mit HEPES-Puffer wurden die Testsubstanzen und Guanosindiphosphat (1 μM in HEPES-Puffer) in 96-Loch-Platten dazu pipettiert, so dass das Endvolumen auf 200 μl pro Loch eingestellt wurde. Die Verdünnung der Testsubstanzen erfolgte in HEPES-Puffer, supplementiert mit

0.1 mM DTT. Die Untersuchung erfolgte in 5-facher Bestimmung (5 Replikate pro Testkonzentration). Nach 30 min Inkubationszeit bei 37 °C wurde 0.1 nM [³⁵S]GTPγS (spezifische Aktivität 1250 Ci/mmol) pro Loch dazugegeben und für weitere 30 min inkubiert. Durch eine schnelle Filtration durch GF/B-Filter mittels eines automatischen Zellsammlers wurde die Reaktion beendet. Die Filter wurden fünfmal mit eiskaltem Waschpuffer gewaschen und bei 60 °C für drei Stunden getrocknet. Die Strahleninduzierte Fluoreszenz in jedem Filter wurde in einem Scintillationszähler quantifiziert. Die Auswertung erfolgte durch Normalisierung der Daten aus jedem einzelnen Experiment relativ zu dem vollen Effekt des Referenzagonisten – Quiniprol (selektiver D₂-Agonist (Levant et al., 1992)). Aus den Mittelkurven der einzelnen Experimente wurden mittels nichtlinearer Regression die pEC₅₀-Werte der getesteten Substanzen als Maß für deren agonistischen Potenz berechnet.

2.2.6 Datenanalyse und Statistik

2.2.6.1 Charakterisierung der pharmakologischen Parameter

Die Bestimmung der pharmakologischen Parameter von Cabergolin und seinen Derivaten erfolgte nach den Empfehlungen des Komitees für Rezeptornomenklatur und Wirkstoffklassifizierung der IUPHAR (Jenkinson et al., 1995; Neubig et al., 2003). Vollagonisten und Partialagonisten wurden durch folgende Begriffe charakterisiert.

pEC₅₀ Der negative dekadische Logarithmus der molaren Stoffmengenkonzentration, die 50 % des maximal möglichen Effekts auslöst/hervorrufft. Der pEC₅₀-Wert diente in der vorliegenden Arbeit zur Einschätzung der Potenz (potency) eines Agonisten.

E_{max} Der maximale Effekt, der bei definierten experimentellen Bedingungen in einem bestimmten Gewebe von einem Agonisten hervorgerufen werden kann, bezogen auf den maximalen Effekts des vollen Agonisten oder einer Referenzverbindung (z.B. KCl) unter denselben Bedingungen. In dieser Arbeit wurde E_{max} als ein Maß für die Wirksamkeit (efficacy) eines Agonisten angesehen.

pK_P Der negative dekadische Logarithmus der molaren Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten des Partialagonist-Rezeptorkomplexes. Für Partialagonisten mit einer geringen E_{max} liegt der der pK_P-Wert nahe am pEC₅₀-Wert.

Die pK_P-Werte können durch zwei Methoden bzw. funktionelle Experimente bestimmt werden. Nach der Methode von Kenakin (1993) werden die pK_P-Werte von Partialagonisten in Agonisten-Experimenten ermittelt. Dabei werden Konzentrationen

des vollen Agonisten A (5-HT) und des partiellen Agonisten P (Ergot-Derivat), die unter gleichen Bedingungen den gleichen Effekt auslösten (äquieffektive Konzentrationen) nach folgender Gleichung verglichen:

$$c(A) = m \cdot \left(\frac{c(A)}{c(P)} \right) + b$$

Wobei $c(A)$ und $c(P)$ die äquieffektiven Konzentrationen von A bzw. P darstellen, m ist die Steigung und b der Ordinatenabschnittspunkt der Ausgleichsgerade $c(A)$ gegen $c(A)/c(P)$. K_P wird aus der Steigung nach folgender Gleichung berechnet:

$$K_P = m \cdot \left(\frac{\varepsilon_P}{\varepsilon_A} - 1 \right)$$

Mit ε_A und ε_P sind die "intrinsic efficacies" von A bzw. P dargestellt. Im Falle eines schwachen Partialagonisten, ist $\varepsilon_P \ll \varepsilon_A$, daraus ergibt sich für K_P :

$$K_P = -m$$

$$pK_P = \log m$$

Partialagonisten sind durch eine geringere Wirksamkeit, als die des Vollagonisten am selben Rezeptor charakterisiert. Somit weisen Partialagonisten agonistische als auch antagonistische Eigenschaften auf. Demzufolge lassen sich die pK_P -Werte auch in Experimenten bestimmen, bei denen die Partialagonisten als Antagonisten eingesetzt werden. Nach der Methode von Marano und Kaumann (Marano und Kaumann, 1976) werden äquieffektive Konzentrationen des vollen Agonisten (5-HT) in Abwesenheit und Anwesenheit des Partialagonisten (P) nach folgender Gleichung verglichen:

$$c(A) = m \cdot c(A)^* + b$$

Wobei $c(A)$ die molare Konzentration von A in Abwesenheit von P und $c(A)^*$ die molare äquieffektive Konzentration von A in Anwesenheit von P ist, m und b sind jeweils die Steigung und der Ordinatenabschnittspunkt der gewichteten Regressionsgerade $c(A)$ gegen $c(A)^*$ (Marano Plot).

Aus der Steigung des Marano Plots wird K_P nach folgender Gleichung ermittelt:

$$m = \frac{1}{1 + \left(1 - \frac{\varepsilon_P}{\varepsilon_A}\right) \cdot \frac{c(P)}{K_P}}$$

$$K_P = \frac{c(P) \cdot m}{1 - m} \cdot \left(1 - \frac{\varepsilon_P}{\varepsilon_A}\right)$$

Wenn $\varepsilon_P \ll \varepsilon_A$, wie bei schwachen Agonisten der Fall ist, ergibt sich für K_P

$$K_P = \frac{c(P) \cdot m}{1 - m}$$

$$\log [(1/m) - 1] = \log c(P) - \log K_P$$

In der vorliegenden Arbeit wurde als Maß für die antagonistische Affinität der Begriff pA_2 -Wert verwendet:

pA_2 Der negative dekadische Logarithmus der molaren Stoffmengenkonzentration eines Antagonisten, die es erforderlich macht, die Agonistenkonzentration zu verdoppeln, um den gleichen Effekt zu erzielen.

Es wurde der sog. scheinbare pA_2 -Wert „*apparent pA_2* “ aus Experimenten mit einer Antagonistenkonzentration nach der folgenden Gleichung ermittelt, wobei r ("concentration ratio") das Verhältnis der EC_{50} des Agonisten in Anwesenheit und Abwesenheit des Antagonisten darstellt (Furchgott, 1972):

$$pA_2 = -\log c(B) + \log (r - 1)$$

2.2.6.2 Statistik

Die Daten wurden als Mittelwerte \pm S.E.M. („standard error of the mean“, Standardfehler des Mittelwerts), mit Angabe der Anzahl der Experimente n präsentiert. Für den Vergleich von zwei Mittelwerten mit homogenen Varianzen aus verschiedenen Behandlungen wurde der Zwei-Stichproben- t -Test nach Student (zweiseitig) angewendet. Wurden mehr als zwei Mittelwerte miteinander verglichen, wurde die einfaktorische Varianzanalyse (one-way-ANOVA) mit anschließendem Dunnett's Post-Test durchgeführt. Stichproben, bei denen mittels des F -Tests nach Fischer keine Varianzhomogenität nachgewiesen werden konnte, wurden mit dem modifizierten t -Test

nach Welch verglichen. Die Unterschiede zweier Mittelwerte wurden für statistisch signifikant befunden, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5 % war ($P < 0.05$). Die Erstellung/Konstruktion der Konzentrations-Wirkungskurven (CRC) erfolgte nach Kurvenanpassung durch nichtlineare Regression und Bearbeitung der Daten mit einer „Vier-Parameter-Logistik-Funktion“ (*Hill-Gleichung*).

$$E = \frac{E_{\max}}{1 + 10^{(-pEC_{50} - \log c(A))n_H}}$$

Ein iteratives Verfahren zur Minimierung der Summe der Abstandsquadrate wurde verwendet. Die Bearbeitung/Berechnung erfolgte mit der Software GraphPad Prism 5, San Diego, CA, USA.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung des molekularen Fragments, das für den Cabergolinagonismus an den 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Rezeptoren verantwortlich ist

Die Aktivierung von 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Rezeptoren ist potentiell für die schwerwiegenden fibrotischen Veränderungen an den Herzklappen verantwortlich (s. Kap. 1.4.2) Daher sollte zunächst untersucht werden, welches Fragment des Cabergolin-Moleküls 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Rezeptoren aktiviert. Hierfür wurde die Allyl-Seitenkette an der N(6)-Position durch fünf weitere Substituenten ersetzt (siehe Abb. 9). Aufgrund von vorherigen Untersuchungen in der Arbeitsgruppe Prof. Pertz an der verwandten Substanz Pergolid wurde postuliert, dass der N(6)-Substituent entscheidend für die agonistischen Eigenschaften ist (s. Kap. 1.5). Die Wirksamkeit der Substanzen wurde mittels funktioneller Experimente am Modell der Schweinekoronararterie für 5-HT_{2A}-Rezeptoren und der Schweinepulmonalarterie für 5-HT_{2B}-Rezeptoren untersucht. Für ausgewählte Verbindungen wurden anschließend die pharmakologischen Effekte an Dopamin D₂-Rezeptoren untersucht.

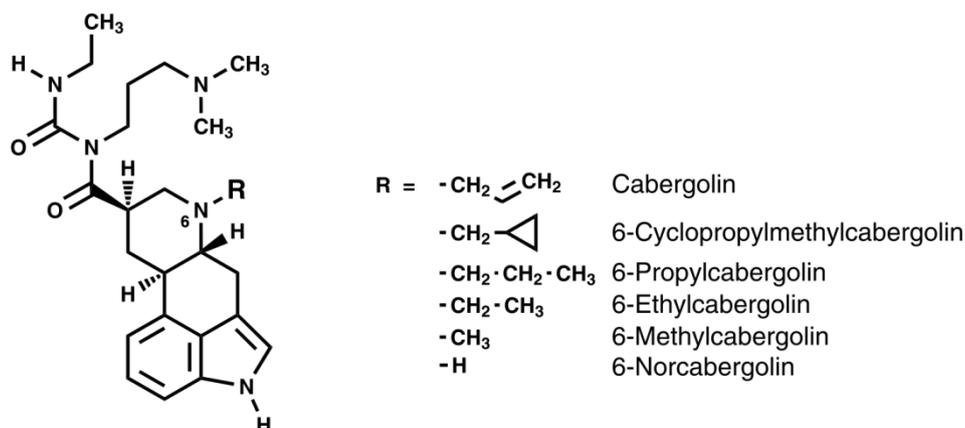


Abb. 9 Struktur von Cabergolin und seinen Derivaten mit Modifikationen in Position 6.

3.1.1 Effekte von Cabergolin und seinen Derivaten an 5-HT_{2A}-Rezeptoren in der Koronararterie des Schweins

Um die pharmakologischen Eigenschaften von Cabergolin und seinen Derivaten an den 5-HT_{2A}-Rezeptoren zu untersuchen, wurde das Modell der Schweinekronararterie angewendet (Görnemann et al., 2008a). Dieses Modell beruht auf der Fähigkeit von 5-HT und anderen serotonergen Liganden die Koronararterie zu kontrahieren. Die Aktivierung der 5-HT_{2A}-Rezeptoren ist an die Bildung von Inositoltrisphosphat und der Freisetzung von Ca⁺⁺-Ionen gekoppelt (Hoyer et al., 1994) (s. Kap.1.4.1). Die Effekte der in dieser Arbeit untersuchten Substanzen wurden durch Aufzeichnen der Spannung der Arteriensegmente bei der isometrischen Kontraktion in Organbädern gemessen.

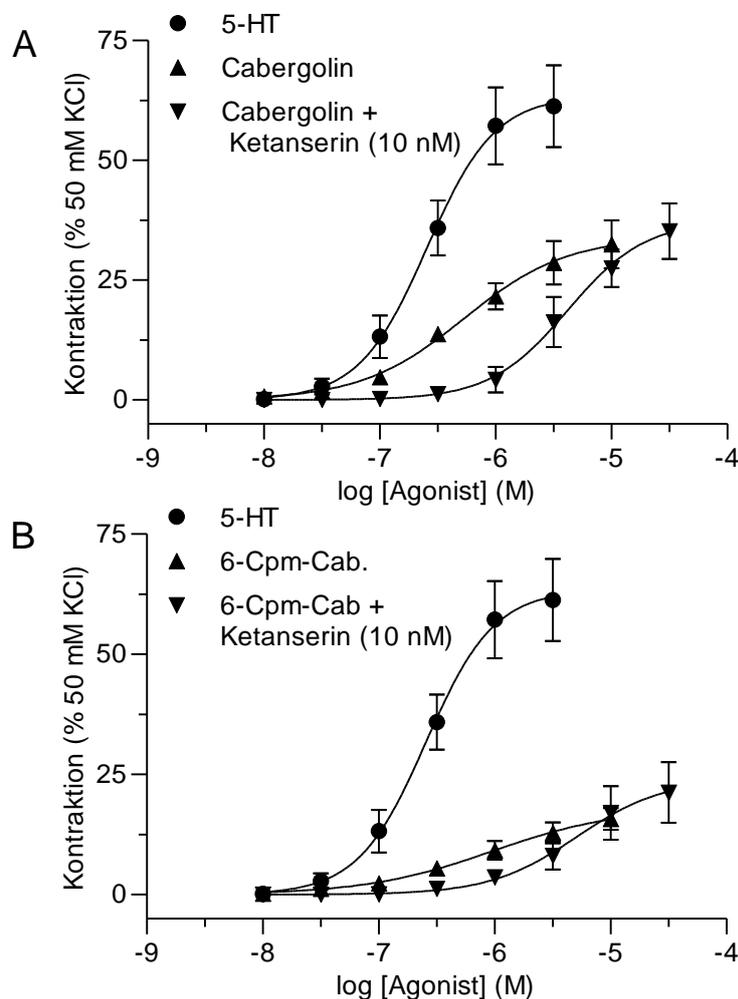


Abb. 10 Kontraktile Effekte von 5-HT, Cabergolin (A) und 6-Cyclopropylmethylcabergolin (B) an der Schweinekronararterie. Dargestellt sind Mittelwerte (% einer Vorkontraktion mit KCl) \pm S.E.M..

Anzahl der Tiere s. Tabelle 2.

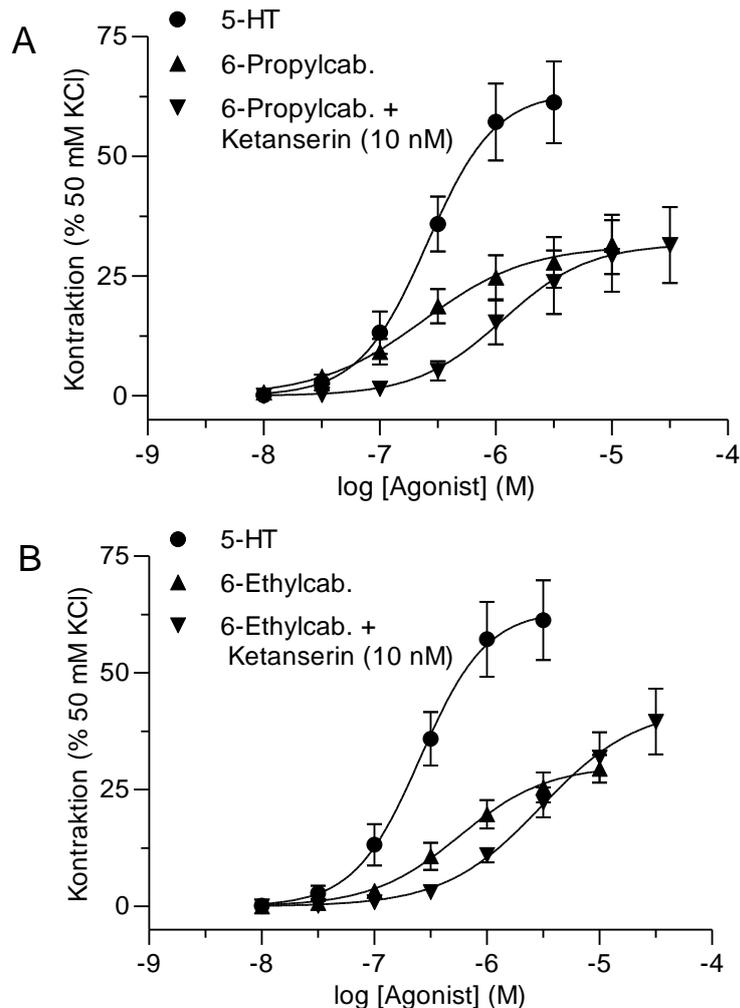


Abb. 11 Kontraktile Effekte von 5-HT, 6-Propylcabergolin (A) und 6-Ethylcabergolin (B) an der Schweinekoronararterie. Dargestellt sind Mittelwerte (% einer Vorkontraktion mit KCl) \pm S.E.M.. Anzahl der Tiere s. Tabelle 2.

Gleichzeitig wurde eine Kontrollkurve mit dem Vollagonisten Serotonin aufgenommen. Cabergolin, sowie 6-Ethylcabergolin, 6-Propylcabergolin und 6-Cyclopropylmethylcabergolin lösten konzentrationsabhängig kontraktile Effekte an der Schweinekoronararterie aus. Die Reihenfolge in der agonistischen Potenz war 5-HT > 6-Propylcabergolin > Cabergolin > 6-Ethylcabergolin > 6-Cyclopropylmethylcabergolin. Verglichen zu dem Vollagonisten Serotonin verhielten sich die Substanzen als Partialagonisten (Abb. 10 und 11).

Für alle getesteten Substanzen wurden die Experimente auch in der Anwesenheit des selektiven 5-HT_{2A/2C}-Rezeptorantagonisten Ketanserin (0.01 μ M) durchgeführt. Die Konzentrations-Wirkungskurven zeigen, dass Ketanserin den kontraktile Effekt der Substanzen hemmt. In Tabelle 2 sind die nach der Methode von Furchgott berechneten scheinbaren pA₂-Werte für Ketanserin zusammengefasst (Furchgott, 1972) (Kap. 2.2.6.1). Die pA₂-Werte für Ketanserin gegen 5-HT und gegen die getesteten

Substanzen lagen in derselben Größenordnung, was die Beteiligung von 5-HT_{2A}-Rezeptoren an den kontraktile Effekten bestätigt. In Abb. 10 und 11 sind die Ergebnisse dargestellt.

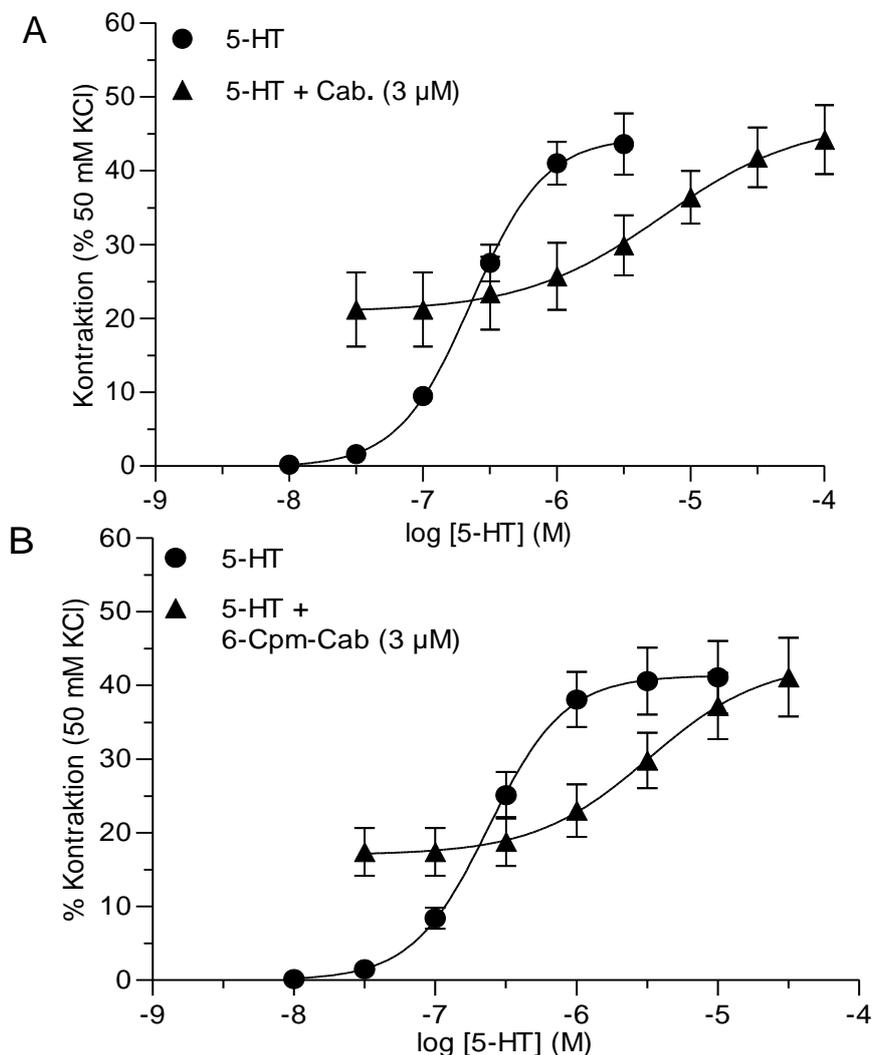


Abb. 12 Antagonistische Effekte von Cabergolin (A) und 6-Cyclopropylmethylcabergolin (B) der 5-HT-induzierten Kontraktion zur Berechnung der pK_p -Werte nach der Methode von Marano und Kaumann (1976). Dargestellt sind Mittelwerte (% einer Vorkontraktion mit KCl) \pm S.E.M.. Anzahl der Tiere s. Tabelle 2.

Ein endogener Ligand wirkt üblicherweise als Vollagonist an seinem entsprechenden Rezeptor und ist in der Lage die volle Wirksamkeit zu entfalten bzw. den maximalen Effekt auszulösen ($E_{max}=100\%$). Partialagonisten können den maximalen Effekt nicht erreichen ($E_{max}<100\%$). Bei Vorinkubation mit dem Partialagonisten wirkt dieser als Antagonist. Basierend auf diesen antagonistischen Eigenschaften wurden Experimente mit dem Vollagonisten Serotonin in der Anwesenheit von Cabergolin und seinen Derivaten, die sich als Partialagonisten erwiesen hatten, durchgeführt. Alle Partialagonisten wurden in einer Konzentration von 3 μ M vor der Aufnahme der

Konzentrations-Wirkungskurven hinzugefügt. Für jeden Partialagonisten wurde der pK_P -Wert als Maß für die Affinität aus den jeweiligen äquieffektiven Konzentrationen mit und ohne Partialagonisten nach der Methode von Kenakin (siehe Kap. 2.2.6.1) (Kenakin, 1993) berechnet (Abb. 12 und 13). Die pEC_{50} -Werte der Partialagonisten stimmten mit den berechneten pK_P -Werten gut überein (Siehe Tabelle 2).

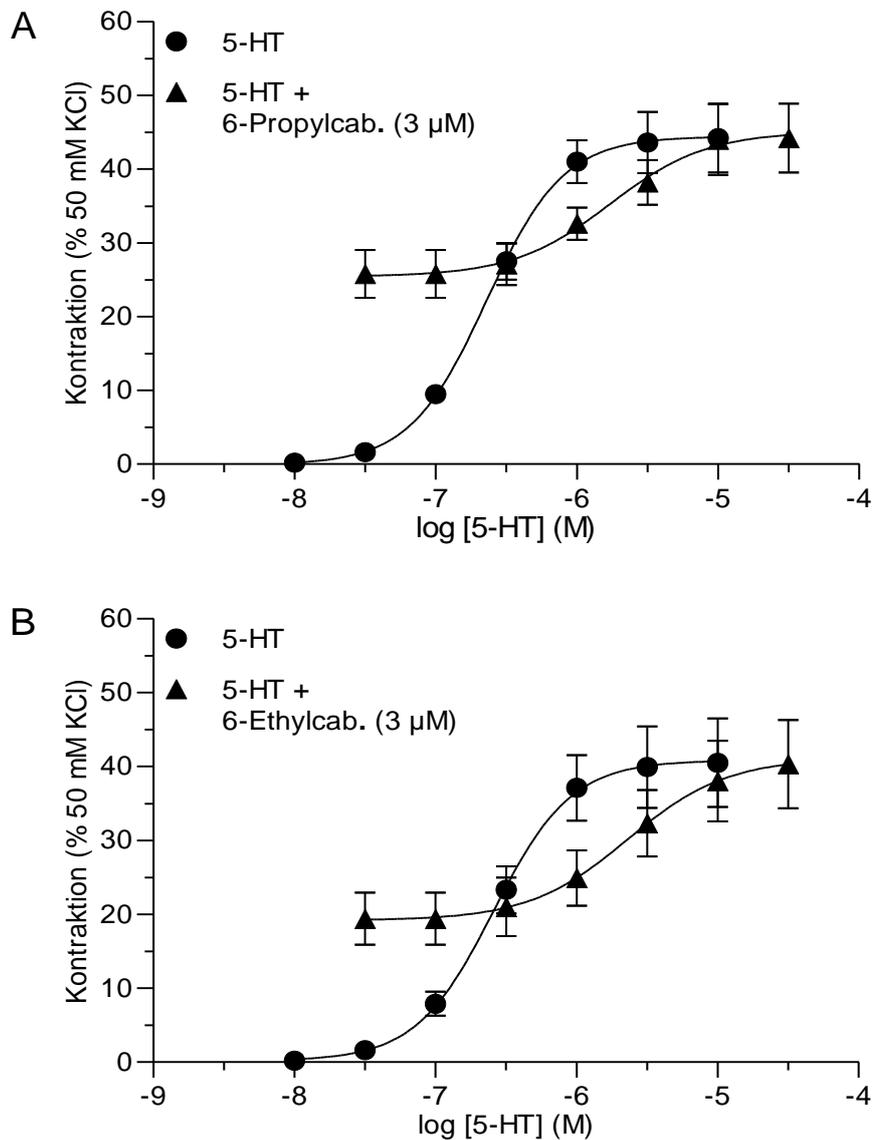


Abb. 13 Antagonistische Effekte von 6-Propylcabergolin (A) und 6-Ethylcabergolin (B) der 5-HT-induzierten Kontraktion zur Berechnung der pK_P -Werte nach der Methode von Marano und Kaumann (1976). Dargestellt sind Mittelwerte (% einer Vorkontraktion mit KCl) \pm S.E.M.. Anzahl der Tiere s. Tabelle 2.

Es konnte gezeigt werden, dass 6-Methylcabergolin im Gegensatz zu den Substanzen mit voluminöseren Substituenten, die sich als Partialagonisten erwiesen, ein Antagonist an den 5-HT_{2A}-Rezeptoren war. Bei einer Konzentration von 0.1 μ M kam es zu einer Rechtsverschiebung der 5-HT-Konzentrations-Wirkungskurve ohne Verminderung des E_{\max} -Wertes (Abb. 14 A). Die Substitution der Seitenkette an N(6) mit einem H-Atom führte gleichfalls zu antagonistischen Eigenschaften. 3 μ M 6-Norcabergolin führten zu einer Rechtsverschiebung der Kurve mit Depression der E_{\max} , was für einen nichtüberwindbaren Antagonismus spricht (Abb. 14 B).

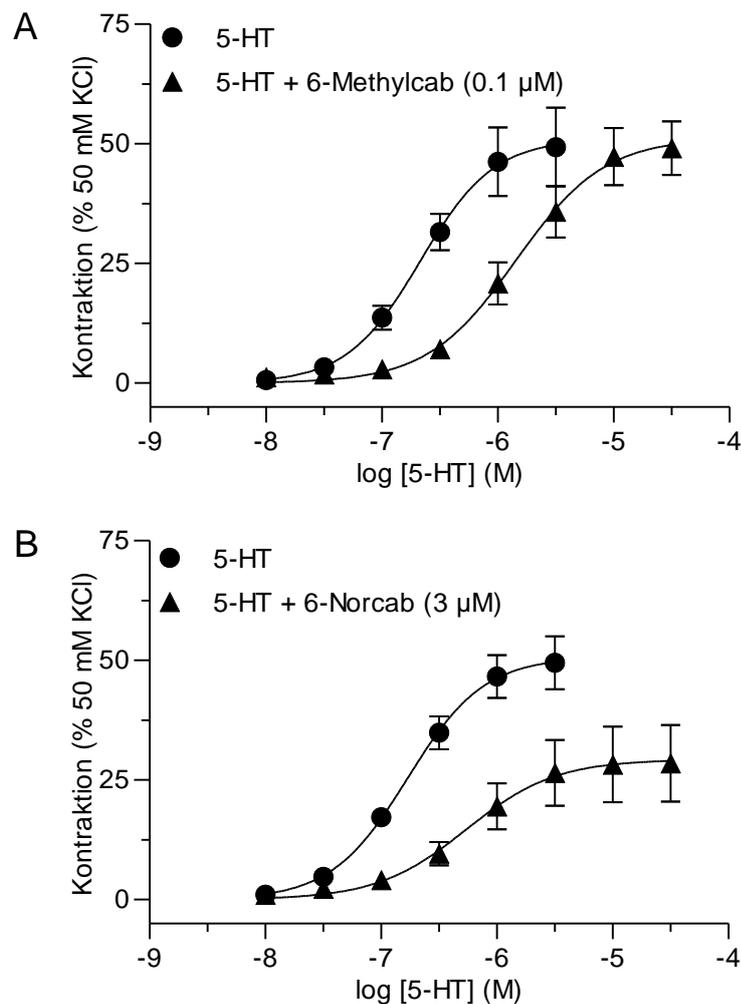


Abb. 14 Kontraktile Effekte von 5-HT an der Schweinekoronararterie in Ab- und Anwesenheit von 6-Methylcabergolin (A) und 6-Norcabergolin (B). Dargestellt sind Mittelwerte (% einer Vorkontraktion mit KCl) \pm S.E.M.. Anzahl der Tiere s. Tabelle 2.

Tabelle 2 Pharmakologisches Profil von Cabergolin und seiner Derivate an 5-HT_{2A}-Rezeptoren der Schweinkoronararterie. Die Daten sind Mittelwerte \pm S.E.M. von 4 - 10 Tieren. Die E_{max} -Werte sind als Prozent der Vorkontraktion mit KCl (50 mM) angegeben.

<i>Agonist</i>	pEC ₅₀	E_{max} %	pK _P ^a	pK _P ^b	pA ₂
5-HT	6.70 \pm 0.04 ^c	54 \pm 6 ^c			8.88 \pm 0.03 ^{d,e}
Cabergolin	6.32 \pm 0.08	34 \pm 5 ^f	6.91 \pm 0.21	6.27 \pm 0.20	8.88 \pm 0.11 ^e
6-Cyclopropyl-methylcabergolin	6.01 \pm 0.15	18 \pm 2 ^f	6.68 \pm 0.10	6.43 \pm 0.22	8.61 \pm 0.14 ^e
6-Propylcabergolin	6.60 \pm 0.11	32 \pm 6 ^f	6.77 \pm 0.08	6.58 \pm 0.09	8.57 \pm 0.12 ^e
6-Ethylcabergolin	6.22 \pm 0.12	30 \pm 3 ^f	6.45 \pm 0.20	6.21 \pm 0.03	8.75 \pm 0.16 ^e
<i>Antagonist</i>					
6-Norcabergolin		0			5.85 \pm 0.07 ^g
6-Methylcabergolin		0			7.85 \pm 0.12 ^h

^apK_P berechnet nach Marano und Kaumann (1976)

^bpK_P berechnet nach (Kenakin, 1993)

^cGepoolte Daten aus allen Experimenten

^dDaten aus (Görnemann et al., 2008a)

^eScheinbarer pA₂ für Ketanserin (0.01 μ M)

^fSignifikanter Unterschied zu der jeweiligen 5-HT Kontrollkurve

^gScheinbarer pA₂ für das Cabergolinderivat bei einer Konzentration von 3 μ M

^hScheinbarer pA₂ für das Cabergolinderivat bei einer Konzentration von 0.1 μ M

3.1.2 Effekte von Cabergolin und seinen Derivaten an 5-HT_{2B}-Rezeptoren in der Pulmonalarterie des Schweins

Die pharmakologischen Effekte von Cabergolin und seinen Derivaten an 5-HT_{2B}-Rezeptoren wurden in funktionellen Experimenten untersucht. Die Untersuchungen wurden am Modell der Schweinepulmonalarterie durchgeführt. Wie zuvor beschrieben, sind Agonisten an 5-HT_{2B}-Rezeptoren in der Lage, die Schweinepulmonalarterie zu relaxieren (Glusa und Pertz, 2000). Die Stimulation der 5-HT_{2B}-Rezeptoren im Endothel der Pulmonalarterie führt zu einer cGMP-abhängigen Aktivierung der NO-Synthase (eNOS). Dies bewirkt die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO), das als potenter Vasodilatator agiert (Hoyer et al., 2002; Manivet et al., 2000).

Die relaxierenden Effekte wurden durch die Abnahme in der Spannung der Arteriensegmente nach der Stimulation der 5-HT_{2B}-Rezeptoren im Endothelium der Pulmonalarterie in Organbadexperimenten mit einer isometrischen Messtechnik

registriert. Parallel zu den getesteten Substanzen wurden Kontrollkurven mit dem Vollagonisten Serotonin aufgenommen.

Cabergolin und seine Derivate mit einer Cyclopropylmethyl-, Propyl- und Ethyl-Kette in Position N(6) zeigten endothelabhängige relaxierende Effekte an vorkontrahierten Schweinepulmonalarterien. Die Effekte sind als Prozent der maximal auslösbarer Relaxation, induziert durch Bradykinin (10 nM), in Abb. 15 und 16 dargestellt. Alle Substanzen verhielten sich als volle Agonisten an diesem Gewebe. Die E_{max} -Werte der Ergoline waren in derselben Größenordnung wie der E_{max} von Serotonin, allerdings waren die Kurven im Vergleich zu Serotonin leicht rechts verschoben. Die gemessenen relaxierenden Effekte an der Schweinepulmonalarterie waren sowohl bei dem Vollagonisten 5-HT als auch bei den getesteten Substanzen konzentrationsabhängig.

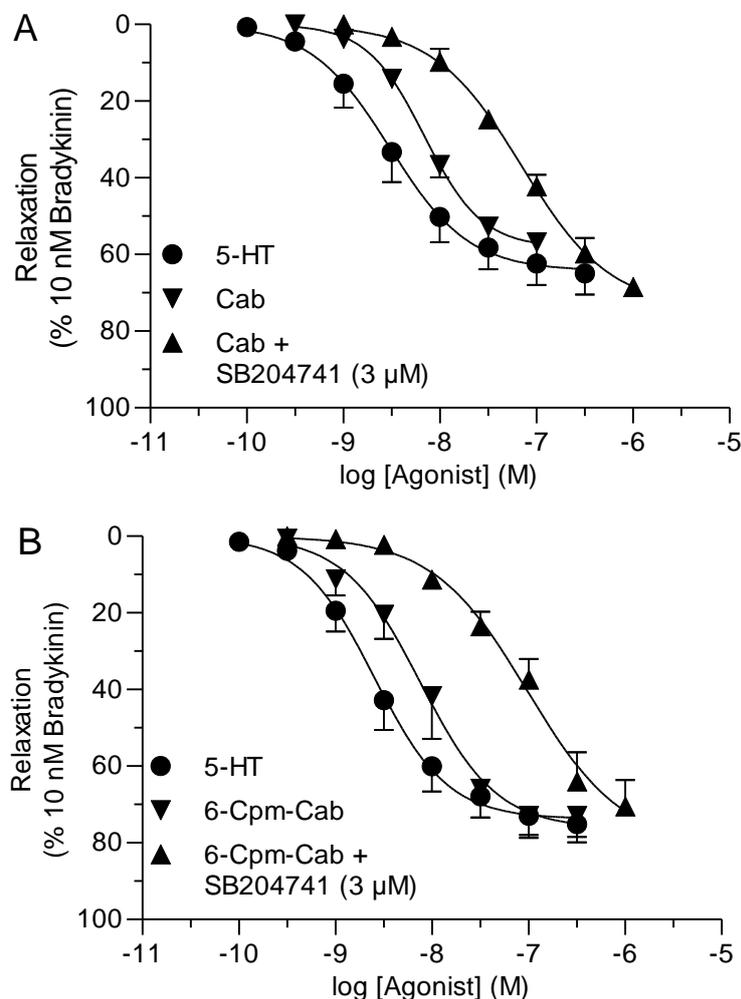


Abb. 15 Endothelabhängige relaxierende Effekte von 5-HT und Cabergolin (A) sowie der Derivate 6-Cyclopropylmethylcabergolin (B) in der Schweinepulmonalarterie. Dargestellt sind Mittelwerte als % bezogen auf die maximale Relaxation durch 10 nM Bradykinin \pm S.E.M.. Anzahl der Tiere s. Tabelle 3.

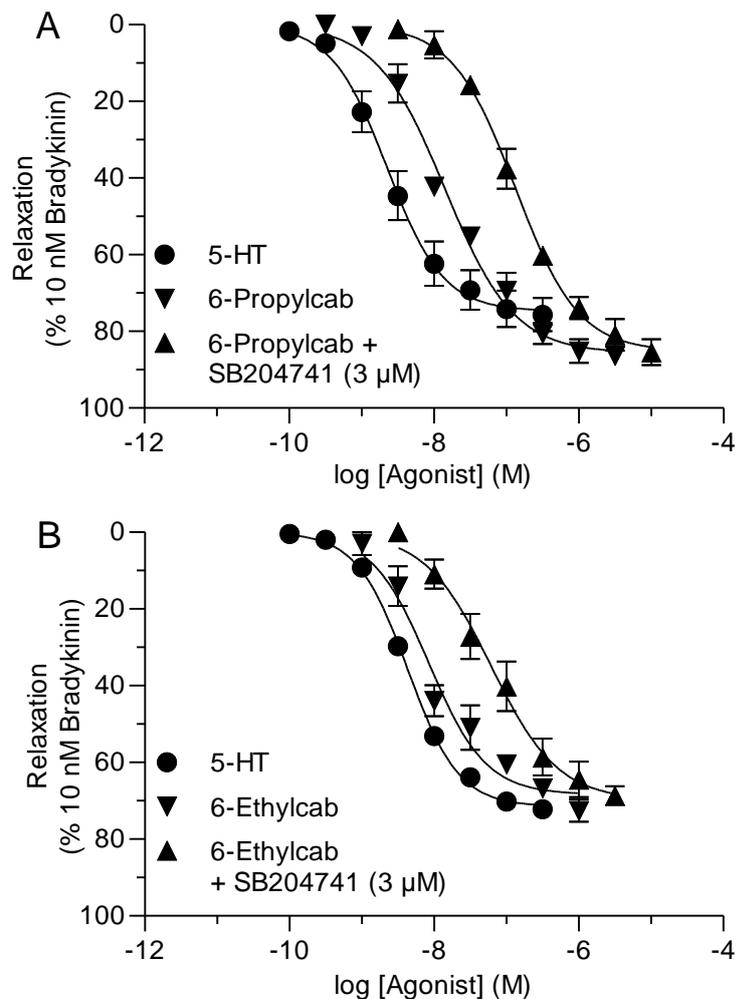


Abb. 16 Endothelabhängige relaxierende Effekte 6-Propylcabergolin (A) und 6-Ethylcabergolin (B) in der Schweinepulmonalarterie. Dargestellt sind Mittelwerte als % bezogen auf die maximale Relaxation durch 10 nM Bradykinin \pm S.E.M.. Anzahl der Tiere s. Tabelle 3.

Für alle Cabergolin-Derivate, die sich als Agonisten der 5-HT_{2B}-Rezeptoren erwiesen, wurden Konzentrations-Wirkungskurven nach Zusatz des selektiven 5-HT_{2B}-Rezeptor-Antagonisten SB204741 gemessen. In Anwesenheit von SB204741 wurden die Kurven parallel nach rechts verschoben. Die Hemmung des relaxierenden Effektes durch SB204741 bestätigte die Beteiligung der 5-HT_{2B}-Rezeptoren an diesem biologischen Effekt (Abb. 15 und 16). Die scheinbaren pA₂-Werte für SB204741 gegen Cabergolin und seine Derivate waren in der gleichen Ordnung wie der pA₂-Wert gegen 5-HT und bestätigen somit die Beteiligung der 5-HT_{2B}-Rezeptoren an der Relaxation der Pulmonalarterien (Tabelle 3). Die Ermittlung der scheinbaren pA₂-Werte erfolgte nach der Methode von Furchgott wie in Kap. 2.2.6.1 beschrieben (Furchgott, 1972).

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Substanzen wies die Substanz mit der kleineren Seitenkette an N(6) 6-Methylcabergolin (1.5 nM) keinen relaxierenden Effekt auf und hemmte die 5-HT-induzierte Relaxation (scheinbarer pA₂-Wert 10.06 ± 0.12 ;

Abb. 17 A). In einer höheren Konzentration (1 μM) zeigte 6-Methylcabergolin einen schwachen relaxierenden Effekt von $7 \pm 3\%$ (nicht gezeigt), der sich allerdings in Anwesenheit von SB204741 nicht verändern ließ ($7 \pm 4\%$, nicht gezeigt). Letzteres deutet auf einen unspezifischen Effekt hin, der aber im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurde.

Die von 6-Norcabergolin induzierte Relaxation von $22 \pm 6\%$ (Abb. 17 B) bei einer Konzentration von 0.2 μM charakterisierte es als Partialagonist. Als solcher konnte 6-Norcabergolin in Antagonistenexperimenten untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass die relaxierende Wirkung von Serotonin in Anwesenheit von 0.2 μM 6-Norcabergolin gehemmt wird. Die 5-HT-induzierte Konzentrations-Wirkungskurve wurde nach rechts verschoben ($\text{pK}_P=7.28 \pm 0.12$, $n=4$) (Abb. 17 B). Der pK_P -Wert für 6-Norcabergolin wurde nach der Methode von Marano und Kaumann berechnet (Marano und Kaumann, 1976, Kap. 2.2.6.1).

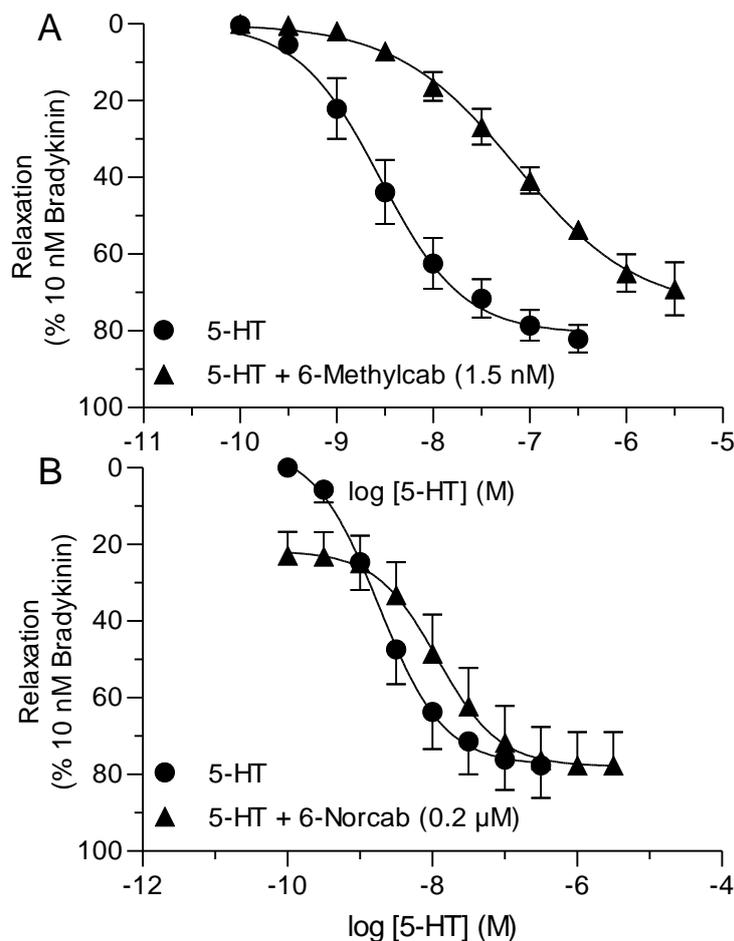


Abb. 17 Relaxierende Effekte von 5-HT an der Schweinepulmonalarterie in Ab- und Anwesenheit von 6-Methylcabergolin (A) und 6-Norcabergolin (B). Dargestellt sind Mittelwerte als % bezogen auf die maximale Relaxation durch 10 nM Bradykinin \pm S.E.M.. Anzahl der Tiere s. Tabelle 3.

Tabelle 3 Pharmakologisches Profil von Cabergolin und seinen Derivaten an 5-HT_{2B}-Rezeptoren von Schweinpulmonalarterien. Die Daten sind Mittelwerte \pm S.E.M. von n Tieren in Klammern. Die E_{max} -Werte sind prozentual auf die maximale Relaxation durch den Agonisten und Bradykinin (0.01 μ M) am Ende des Experiments bezogen.

<i>Agonist</i>	pEC ₅₀	E_{max} (%)	pK _P	pA ₂
5-HT	8.52 \pm 0.05 (26) ^a	73 \pm 2 ^a		6.59 \pm 0.07 ^b
Cabergolin	8.15 \pm 0.07 (5)	58 \pm 6 ^c		6.45 \pm 0.06 (4) ^b
6-Cyclopropyl-methylcabergolin	8.10 \pm 0.14 (6)	75 \pm 6 ^d		6.63 \pm 0.25 (4) ^b
6-Propylcabergolin	7.87 \pm 0.03 (5)	86 \pm 3		6.43 \pm 0.09 (4) ^b
6-Ethylcabergolin	8.08 \pm 0.09 (4)	68 \pm 1 ^e		6.34 \pm 0.20 (4) ^b
6-Norcabergolin		22 \pm 6 ^f	7.28 \pm 0.12 (4) ^g	
<i>Antagonist</i>				
6-Methylcabergolin				10.06 \pm 0.12 (4) ^h

^aGepoolte Daten aus allen Experimenten

^bScheinbarer pA₂ für SB204741 (3 μ M)

^cNicht signifikant verschieden von der jeweiligen 5-HT Kontrollkurve (64 \pm 5)

^dNicht signifikant verschieden von der jeweiligen 5-HT Kontrollkurve (74 \pm 5)

^eNicht signifikant verschieden von der jeweiligen 5-HT Kontrollkurve (72 \pm 2)

^fSignifikant verschieden von der jeweiligen 5-HT Kontrollkurve (76 \pm 8)

^gpK_P berechnet aus dem Antagonismus des 5-HT-Effekts durch den partiellen Agonisten bei einer Konzentration von 0.2 μ M nach der Methode von Marano & Kaumann (1976)

^hScheinbarer pA₂ getestet bei einer Konzentration von 1.5 nM

3.1.3 Effekte von Cabergolin und 6-Methylcabergolin an rekombinanten humanen D_{2Long} - und D_{2Short}-Rezeptoren

Cabergolin findet klinische Anwendung in der Therapie von Morbus Parkinson und einigen endokrinologischen Störungen wie z.B. bei der Hyperprolaktinämie (Colao et al., 2002; Jenner, 2002; Rinne et al., 1998). Der therapeutische Effekt dieser Substanz ist auf die Aktivierung von Dopamin D₂-Rezeptoren zurückzuführen (Gillam et al., 2006; Guttman und Jaskolka, 2001) (s. Kap. 1.1). Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass 6-Methylcabergolin eine antagonistische Wirkung an 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Rezeptoren ausübt. Diesbezüglich unterscheidet sich 6-Methylcabergolin von der Muttersubstanz Cabergolin und könnte daher möglicherweise keine fibrotischen Veränderungen der Herzklappen als Nebenwirkung verursachen. Es ist allerdings unbekannt, ob diese Strukturänderung im Molekül das pharmakologische Profil an den D₂-Rezeptoren bzw. die gewünschten Eigenschaften beeinflusst.

Daher wurden die Effekte von 6-Methylcabergolin und Cabergolin an den D_{2L}- und D_{2S}-Rezeptorsubtypen mittels der [³⁵S]GTPγS-Bindungs-Studie untersucht. Mit dieser Studie wird die Aktivierung der G-Protein-gekoppelten D₂-Rezeptoren, stabil exprimiert in Membranen von CHO-Zellen, nach der Bindung von Agonisten quantifiziert. Nach der GPCR-Aktivierung infolge der Bindung eines Agonisten an den Rezeptor kommt es zum Austausch von GDP durch GTP an der Gα-Untereinheit des G-Protein-Heterotrimer, zur nachfolgenden Dissoziation der freien Gα-GTP Untereinheit und zur Hemmung der Adenylylcyclase (Abb. 5). Das G-Protein-Heterotrimer wird durch die GTPase-Aktivität der Gα-Untereinheit wiederhergestellt (Harrison und Traynor, 2003). Bei der [³⁵S]GTPγS-Bindungs-Studie wird das endogene GTP durch das nicht hydrolysierbare GTP-Analog [³⁵S]-GTPγS verdrängt (Strange, 2010). Da der [³⁵S]GTPγS-Gα-Komplex durch die GTPase-Aktivität nicht enzymatisch abgebaut wird, kann die GPCR-Aktivierung durch Vermessen der strahleninduzierten Fluoreszenz des akkumulierten [³⁵S]-Markers mit einem Scintillationszähler quantifiziert werden (Harrison und Traynor, 2003; Milligan, 2003). Die gemessenen Ergebnisse wurden auf den Effekt des selektiven D₂-Rezeptor Agonisten Quinpirol bezogen.

Cabergolin und 6-Methylcabergolin verhielten sich als Partialagonisten mit hoher intrinsischer Aktivität an den rekombinanten hD_{2Long}- und hD_{2Short}-Rezeptoren, exprimiert in CHO-Zellen (Abb. 18). Beide Substanzen zeigten höhere agonistische Aktivität als der selektive D₂-Rezeptor-Agonist Quinpirol. Die Substitution der Allyl-Seitenkette durch die Methylgruppe im Cabergolin-Molekül zeigte keinen Einfluss auf die agonistische Wirkung am D₂-Rezeptoren (Tabelle 4). Verglichen zu Cabergolin erreichte sein 6-Methyl-Derivat eine geringere maximale Wirkstärke, dennoch erwies sich 6-Methylcabergolin als hocheffizienter partieller Agonist.

Tabelle 4 Funktionelle Eigenschaften von Cabergolin und 6-Methylcabergolin an hD_{2Long} - und hD_{2Short} -Rezeptoren bestimmt mittels [35 S]GTP γ S-Bindungs-Studie. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M., $n = 6-8$, E_{max} in % bezogen auf den maximalen Effekt des vollen Agonisten Quinpirol.

Verbindung	D_{2Long}		D_{2Short}	
	pEC_{50}	E_{max} (%)	pEC_{50}	E_{max} (%)
Cabergolin	8.51 ± 0.11	88 ± 6	8.82 ± 0.06	94 ± 3
6-Methylcabergolin	8.33 ± 0.07	75 ± 4	8.68 ± 0.08	71 ± 4

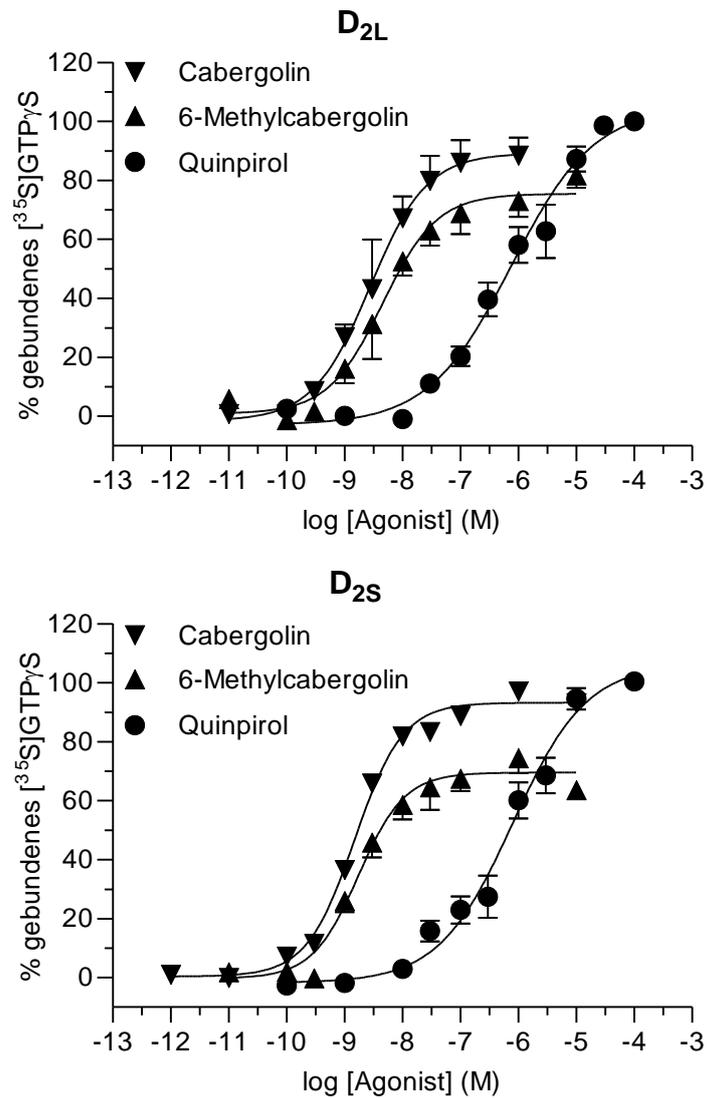


Abb. 18 Effekte von Cabergolin und 6-Methylcabergolin an Dopamin D_{2Long} - und D_{2Short} -Rezeptoren, stabil exprimiert in CHO-Zellen. Die [35 S]GTP γ S-Bindung ist dargestellt als % (Mittelwert \pm S.E.M., $n = 6$) bezogen auf den Effekt des vollen Agonisten Quinpirol.

3.2 Charakterisierung der kontraktilen Effekte von Cabergolin an der Aortenklappe vom Schwein

Es ist bekannt, dass Serotonin und eine Reihe anderer vasoaktiver Substanzen in der Lage sind, Kontraktionen am Herzklappengewebe auszulösen (Chester et al., 2000). Die Beteiligung der 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Rezeptoren am kontraktilen Effekt von Serotonin sollte untersucht werden. Weiterhin sollte auch die Beteiligung der 5-HT_{1B}-Rezeptoren untersucht werden, da dieser Rezeptortyp kontraktile Eigenschaften in Blutgefäßen aufweist und in humanem Herzklappengewebe detektiert worden ist (Roy et al., 2000b; Watts et al., 2012). Darüber hinaus sollte überprüft werden, ob Cabergolin das Herzklappengewebe auch mechanisch beeinflusst. Für diese Untersuchungen wurden funktionelle Experimente mithilfe der Organbadtechnik durchgeführt.

In Streifen von isolierten Aortenklappen induzierte 5-HT eine konzentrationsabhängige Kontraktion in Längsrichtung des Gewebes. Der pEC₅₀-Wert betrug 7.24 ± 0.07 , ($n = 9$). Die Beteiligung verschiedener 5-HT-Rezeptorsubtypen wurde durch selektive Rezeptorblockaden untersucht. Die Konzentrations-Wirkungskurve von 5-HT wurde in Anwesenheit von 10 nM Ketanserin parallel nach rechts verschoben. Der berechnete scheinbare pA₂-Wert für Ketanserin betrug 8.66 ± 0.11 , $n = 4$ (Abb. 19 A). Im Gegensatz dazu blieben die Kurven in Anwesenheit des selektiven 5-HT_{2B}-Rezeptor-Antagonisten SB204741 (3 µM) und des 5-HT_{1B/D}-Rezeptor-Antagonisten GR127935 (10nM) nahezu unverändert (Abb. 19 B und C). Nach der Vorbehandlung mit der zehnfachen Menge GR127935 (100 nM) kam es hingegen zu einer Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve. Der scheinbare pA₂-Wert für 5-HT gegen GR127935 (100 nM) war 7.56 ± 0.13 ($n = 4$) (Abb. 19 C).

Cabergolin war ebenfalls in der Lage, kontraktile Effekte im Gewebe der Aortenklappe in Längsrichtung auszulösen. Im getesteten Konzentrationsbereich (10 nM – 10 µM) waren die Effekte auch konzentrationsabhängig. Im Vergleich zu 5-HT zeigte Cabergolin eine geringere agonistische Potenz ($E_{\max}(\text{Cab}) = 124 \pm 9$, $E_{\max}(5\text{-HT}) = 144 \pm 1$).

Bezüglich der Beteiligung von 5-HT_{2A}-Rezeptoren in der kontraktilen Antwort zeigte Cabergolin eine ähnliche Wirkweise wie 5-HT. In Anwesenheit von 10 nM Ketanserin kam es zu einer Rechtsverschiebung der Cabergolin-induzierten Konzentrations-Wirkungskurve ohne Verringerung des maximalen Effekts (pA₂= 8.78 ± 0.13 , Abb. 20).

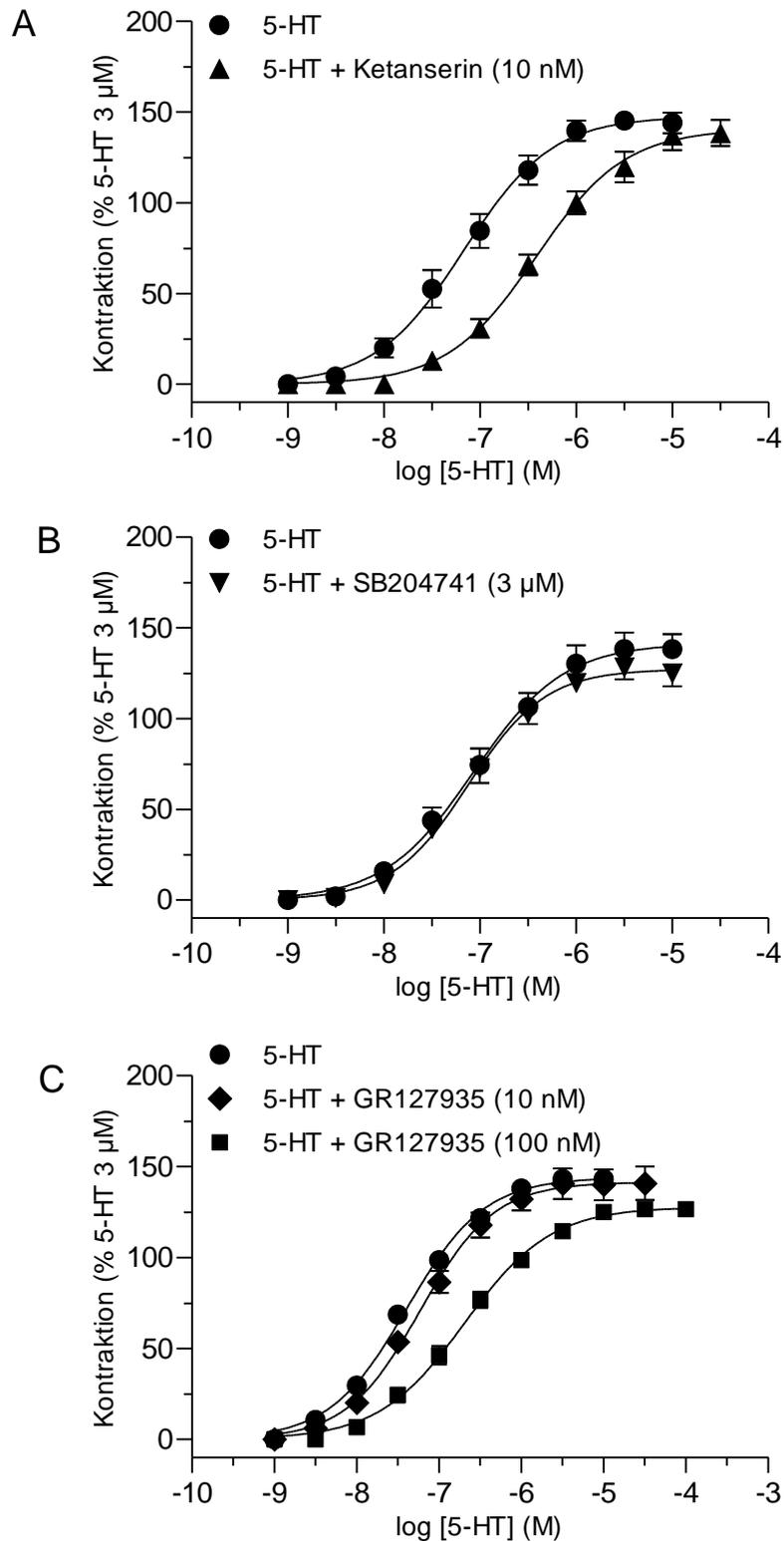


Abb. 19 Kontraktile Effekte von 5-HT in Aortenklappenstreifen des Schweins in Ab- und Anwesenheit von Ketanserin (A), SB204741 (B) und GR127935 (C). Dargestellt sind Mittelwerte als % der Vorkontraktion mit 3 µM 5-HT ± S.E.M.. Anzahl der Tiere 4 bis 9.

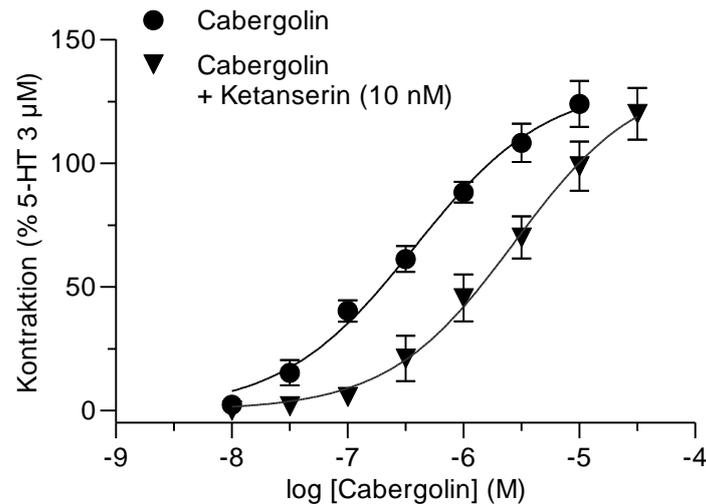


Abb. 20 Kontraktile Effekte von Cabergolin in Aortenklappenstreifen des Schweins in Ab- und Anwesenheit von Ketanserin. Dargestellt sind Mittelwerte als % der Vorkontraktion mit 3 µM 5-HT ± S.E.M.. Anzahl der Tiere 4.

3.3 Charakterisierung der Herzklappeninterstitialzellen vom Schwein

Nach der Isolierung der Primärkultur der Herzklappeninterstitialzellen (VICs) wurden Zellen der ersten Passage unter dem Lichtmikroskop aufgenommen und mit der in der Literatur beschriebenen Morphologie verglichen (Abb. 21 A). Es ist bekannt, dass VICs den Myofibroblasten- und Glattmuskelzell-Marker α -glattmuskulärer Aktin (α -smooth muscle actin; α -SMA) exprimieren (Blevins et al., 2008; Taylor et al., 2000; Taylor et al., 2002). Unter Kulturbedingungen kommt es zu einer erhöhten Expression mit 50 bis nahezu 100 % α -SMA positiven Zellen, die über die weiteren Passagen erhalten bleibt (Taylor et al., 2000; Yperman et al., 2004). Aus diesem Grund wurde das Zytoskelettprotein α -SMA als Marker für die isolierte VICs-Primärkultur verwendet. (Abb. 21 B).

Endothelzellen VECs bekleiden die Oberfläche der Herzklappen und können während der Isolierung der Interstitialzellen aus dem Herzklappengewebe in die Primärkultur gelangen. Ob Endothelzellen in der Primärkultur anwesend sind, sollte durch die Expression des Endothelzellenmarkers von Willebrand Faktor (vWF) untersucht werden (Gould und Butcher, 2010). Humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (human umbilical vein endothelial cells; HUVEC) wurden als Positivkontrolle für den vWF-Antikörper verwendet. Humane Hautfibroblasten (hFb) dienten als Negativkontrolle. Die HUVEC und die hFb wurden vom Arbeitskreis Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting zur Verfügung gestellt. (Abb. 21 C).

Die Zellen wurden auf Objektträgern über eine Dauer von 48 h gezüchtet, fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden mithilfe der indirekten Immunfluoreszenz die Marker sichtbar gemacht.

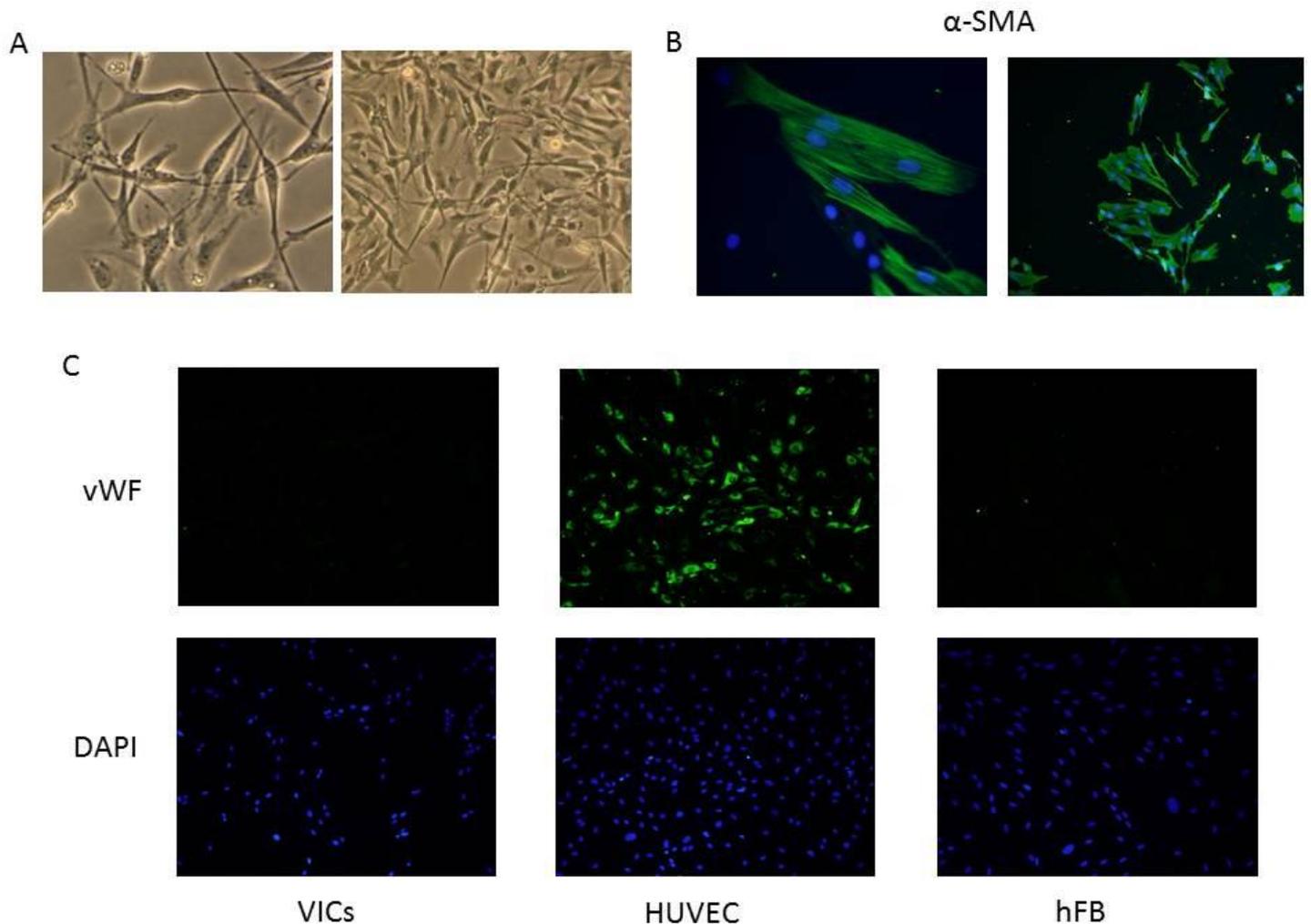


Abb. 21 (A) Konfokale Mikroskopie der VICs, 100fache Vergrößerung links, 10fache Vergrößerung rechts; indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie für α -SMA in VICs (B) und vWF in VICs, HUVEC und hFb (C).

Die aus der Aorten- und Mitralklappen des Schweins isolierten VICs zeigten eine typische verlängerte nadel- bis sternförmige Morphologie (Liu et al., 2007). Die Immunfluoreszenzuntersuchung zeigte eine stark ausgeprägte α -SMA-Expression und eine negative Färbung für den Endothelmarker vWF bzw. eine Abwesenheit von Endothelzellen in der VICs-Primärkultur.

3.4 Einfluss von 5-HT, Cabergolin und 6-Methylcabergolin auf die Phosphorylierung von Extracellular-Signal Regulated Kinasen ERK 1/2 in Interstitialzellen der Herzklappen

Die Extracellular-Signal Regulated Kinasen ERK 1 und 2 vermitteln Signale für Zellproliferation und Zelldifferenzierung (Yoon und Seger, 2006). Außerdem sind ERK 1/2 mit der Fibroseinduktion assoziiert (Xu et al., 2002). Es ist bekannt, dass die ERK-Kinasen über diverse Serotonin Rezeptoren aktiviert werden können (Knauer et al., 2009; Maddahi und Edvinsson, 2008). Daher sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob Cabergolin auf die ERK-Signalwege aktivierend wirkt.

Die Expression der phosphorylierten und aktiven Form von ERK 1/2 in Interstitialzellen der Herzklappen wurde nach Stimulation mit Cabergolin mittels Western Blot untersucht. Der verwendete spezifische Antikörper detektierte beide Enzyme, so dass nach der Größentrennung die Proteinfraction zwei dicht aneinanderliegender Banden gezeigt werden konnte, 44 kDa für ERK 1 und 42 kDa für ERK 2. Bei allen Experimenten wurden parallel Zellen als Kontrolle mit den entsprechenden Lösungsmittelvolumina eingesetzt.

Die Western Blot-Analyse ergab, dass Serotonin nach einer Behandlungszeit von 5 min zu einer Steigerung der ERK 1/2 Phosphorylierung in Interstitialzellen aus Herzklappen führte (Abb. 22 A). Dieser Effekt war konzentrationsabhängig ab 1 nM. Cabergolin zeigte ebenfalls eine gesteigerte ERK 1/2 Phosphorylierung. Der Effekt zeigte sich um eine Konzentrations-Log-Stufe schwächer (ab 10 nM) als bei Serotonin (Abb. 22 B).

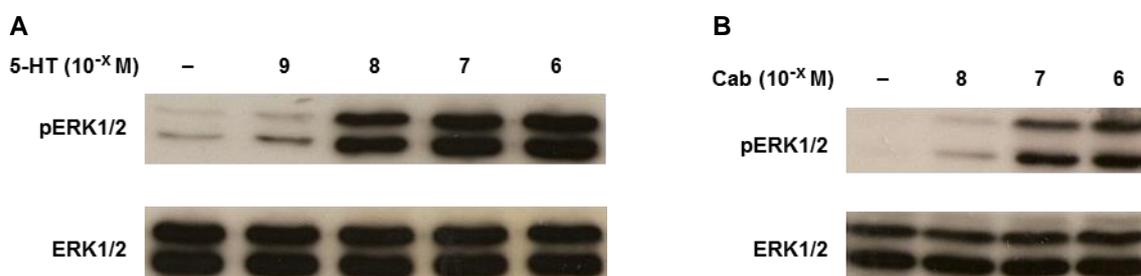


Abb. 22 Western Blots von Herzklappeninterstitialzellen des Schweins, die den Einfluss von Serotonin (A) und Cabergolin (B) auf die ERK 1/2 Phosphorylierung zeigen. Die Blots sind repräsentativ für 4 unabhängige Experimente mit vergleichbaren Resultaten.

Der stimulierende Effekt von 5-HT wurde durch GR127935 (1 μ M, selektiver 5-HT_{1B/D}-Rezeptor Antagonist) gehemmt. Im Gegensatz dazu zeigte die Blockade mit dem 5-HT_{2B}-Rezeptor-Antagonisten SB204741 (1 μ M) keinen hemmenden Effekt. Die Vorbehandlung mit MDL100907 (1 μ M, selektiver 5-HT_{2A}-Rezeptor Antagonist) zeigte einen weniger intensiven hemmenden Effekt (Abb. 23 A). Die Behandlung der VICs mit Cabergolin (1 μ M) nach der selektiven Rezeptorblockade ergab ähnliche Ergebnisse wie die Behandlung mit dem endogenen Liganden Serotonin. Der 5-HT_{1B/D}-Rezeptor-Antagonist GR127935 hemmte die ERK 1/2 Phosphorylierung, wohingegen die Blockade der 5-HT_{2B}-Rezeptoren (Vorbehandlung mit SB204741, 1 μ M) keinen Einfluss darauf zeigte. Die Blockade der 5-HT_{2A}-Rezeptoren (Vorbehandlung mit 1 μ M MDL100907) verminderte das Ausmaß der Cabergolin-induzierten Aktivierung der ERK 1/2-Kinasen. Die Verminderung der Intensität der Cabergolin-induzierten Aktivierung der ERK 1/2-Kinasen durch Blockade der 5-HT_{2A}-Rezeptoren war stärker ausgeprägt als bei dem jeweiligen Versuch mit 5-HT (Abb. 23 B). Weiterhin sollte untersucht werden, ob die selektiven Rezeptor-Antagonisten per se die ERK-Aktivierung beeinflussen. Es konnte kein Effekt auf die ERK 1/2 Phosphorylierung festgestellt werden. Die Proteinexpression nach Vorbehandlung mit allen Rezeptorantagonisten blieb im Vergleich zu Kontrollzellen, die mit Lösungsmittelvolumina behandelt wurden, unverändert (Abb. 23 C).

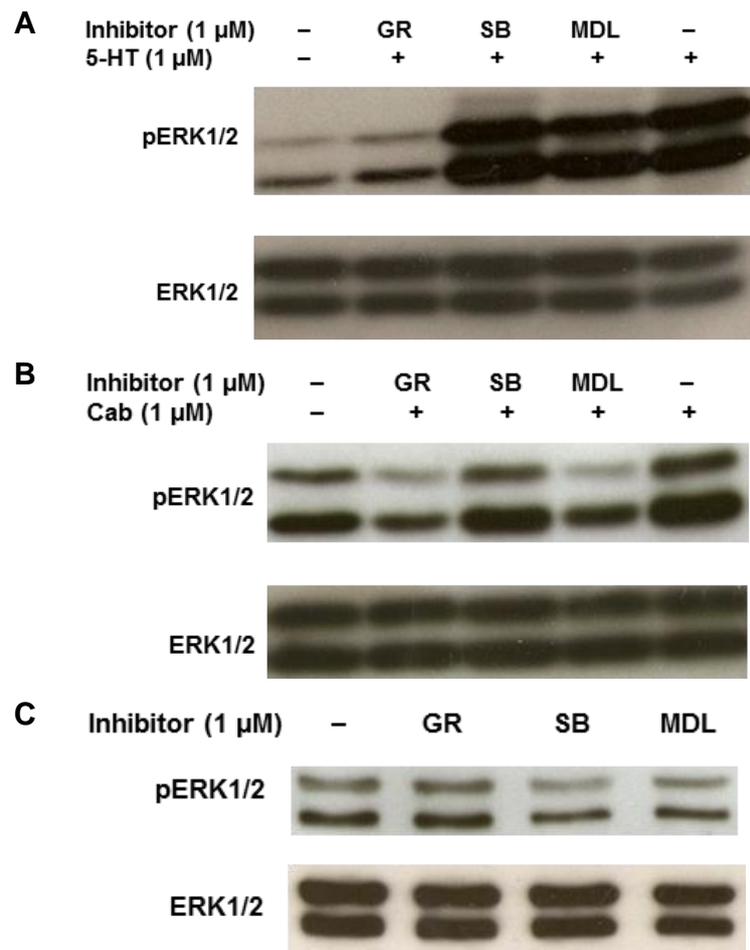


Abb. 23 Western Blots von Herzkappeninterstitialzellen des Schweins, die den Einfluss von 5-HT (A) und Cabergolin (B) auf die ERK 1/2 Phosphorylierung in Abwesenheit und Anwesenheit des 5-HT_{1B/1D}-Rezeptorantagonisten GR127935, des 5-HT_{2B}-Rezeptorantagonisten SB204741 und des 5-HT_{2A}-Rezeptorantagonisten MDL100907 zeigen. Die Antagonisten selbst hatten keinen Einfluss auf pERK 1/2 (C). Die Blots sind repräsentativ für 4 unabhängige Experimente mit vergleichbaren Resultaten.

Wie bereits in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, wirkt 6-Methylcabergolin im Gegensatz zu Cabergolin als Antagonist an den 5-HT_{2A} und 5-HT_{2B}-Rezeptoren, daher war es von Interesse, ob 6-Methylcabergolin hinsichtlich der Aktivierung der ERK-Signalkaskaden auch unterschiedliche Eigenschaften aufweist (Vgl. Kap. 3.1.1 und 0). Die Proteinexpression der phosphorylierten Form der ERK 1/2 in VICs wurde nach 5-minütiger Behandlung mit 6-Methylcabergolin untersucht und mit der Proteinexpression von Cabergolin, Serotonin und Kontrollzellen verglichen. Das Ausmaß der Phosphorylierung von ERK1/2 durch 6-Methylcabergolin war geringer als durch Serotonin und Cabergolin (Abb. 24).

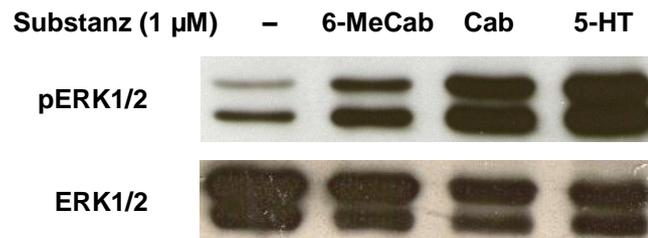


Abb. 24 Western Blots von Herzklappeninterstitialzellen des Schweins, die den Einfluss von 5-HT, Cabergolin und 6-Methylcabergolin auf die ERK1/2 Phosphorylierung zeigen. Die Blots sind repräsentativ für 4 unabhängige Experimente mit vergleichbaren Resultaten.

3.5 Einfluss von 5-HT, Cabergolin und 6-Methylcabergolin auf die Biosynthese der extrazellulären Matrix (ECM)

3.5.1 Einfluss auf die Neusynthese von Kollagen (Einbau von [^3H]-Prolin)

Ein charakteristisches Merkmal des fibrotischen Prozesses ist die Anhäufung von übermäßiger extrazellulärer Matrix (ECM) in dem betroffenen Gewebe (s. Kap. 1.3.2). Aus diesem Grund sollte als nächstes der Einfluss von Cabergolin und 6-Methylcabergolin auf die Biosynthese der ECM untersucht werden. Dazu wurden Interstitialzellen unter Zusatz von radioaktiv markiertem L-Prolin ([^3H]-Prolin) mit den Testsubstanzen für 48 h stimuliert. Die Aminosäuren Prolin und Hydroxyprolin sind in der primären Kollagenhelix häufig vertreten. Daher diente der Einbau von [^3H]-Prolin in die Interstitialzellen der Herzklappen (VICs) als ein geeigneter Indikator für die Neusynthese von Kollagen, einer der Hauptbestandteile der ECM.

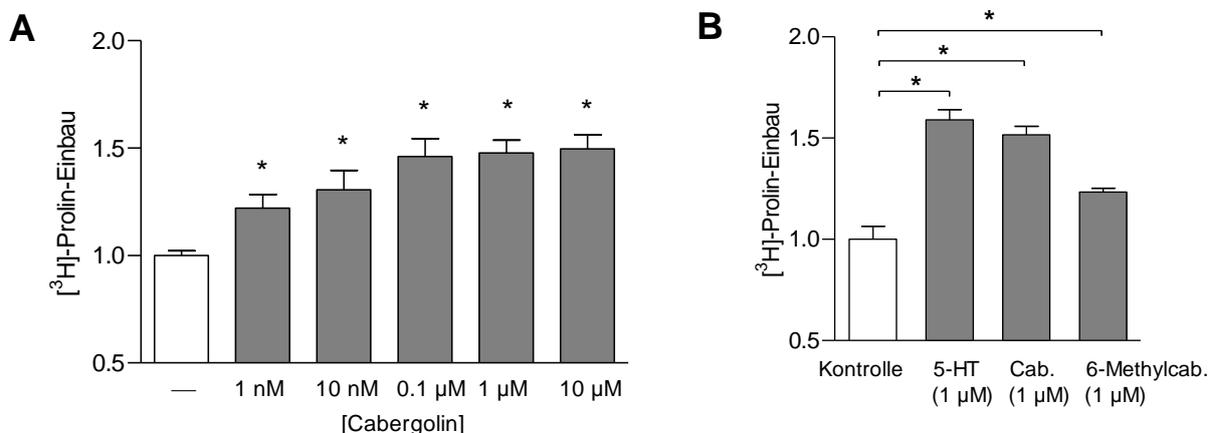


Abb. 25 Zunahme der Kollagenbiosynthese anhand der Erhöhung des [^3H]-Prolineinbaus durch 5-HT, Cabergolin und 6-Methylcabergolin in Herzklappeninterstitialzellen des Schweins. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. von 3 bis 6 unabhängigen Experimenten. * $P < 0.05$.

Cabergolin führte zu einem erhöhten Einbau von [^3H]-Prolin nach 48 h und deutete somit auf eine Erhöhung der Kollagenbiosynthese hin. Der Effekt war konzentrationsabhängig und statistisch signifikant ab 1 nM (Abb. 25 A).

Basierend auf den bisherigen Untersuchungen über die Wirkung von 6-Methylcabergolin auf die 5-HT_{2A} und 5-HT_{2B}-Rezeptoren und auf die ERK-Signalwege ist zu erkennen, dass diese Substanz unterschiedliche pharmakologische Eigenschaften als Cabergolin aufweist (Kap. 3.1.1 und 0). Es ist daher zu erwarten, dass die Wirkung von 6-Methylcabergolin auf die ECM-Biosynthese schwächer ausfällt als die von Serotonin und Cabergolin. In VICs führte 5-HT zu einer 1,6-fach höheren Einbaurate von [^3H]-Prolin (1.59 ± 0.05 , $n = 3$) als die Kontrollgruppe. Der Effekt von 6-Methylcabergolin (1.23-fache ± 0.02) auf die Kollagensynthese war weniger ausgeprägt im Vergleich zu Cabergolin und 5-HT (Abb. 25. B).

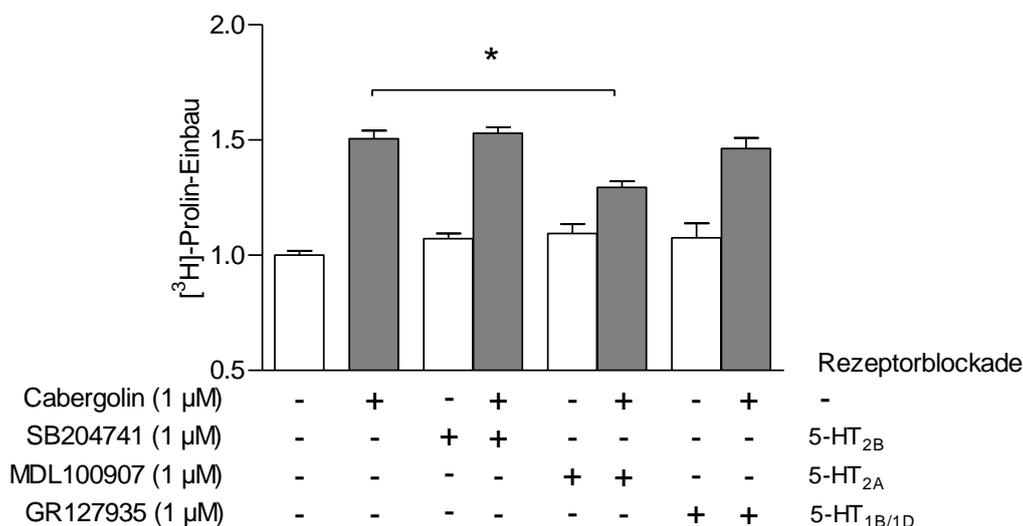


Abb. 26 Einbau von [^3H]-Prolin durch Cabergolin in Anwesenheit und Abwesenheit des 5-HT_{2A}-Rezeptorantagonisten MDL100907, des 5-HT_{2B}-Rezeptorantagonisten SB204741 und des 5-HT_{1B/1D}-Rezeptorantagonisten GR127935 in Herzklappeninterstitialzellen des Schweins. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. von 3 bis 6 unabhängigen Experimenten. * $P < 0.05$.

Um zu beurteilen, welche Rezeptorsubtypen an der Cabergolin-induzierten Erhöhung der Kollagensynthese beteiligt sind, wurden Stimulationsversuche mit Cabergolin (1 μM) in Anwesenheit von selektiven Rezeptorantagonisten durchgeführt. Die Blockade der 5-HT_{2A}-Rezeptoren (Vorbehandlung mit dem selektiven 5-HT_{2A}-Rezeptorantagonisten MDL100907, 1 μM) führte zu einer Abnahme der Einbaurate von [^3H]-Prolin. Hingegen zeigten 5-HT_{2B}- und 5-HT_{1B/1D}-Rezeptoren (Vorbehandlung mit den selektiven Antagonisten SB204741 bzw. GR127935, jeweils 1 μM) keinen Einfluss auf

die Kollagenbiosynthese (Abb. 26). Um eine Auswirkung der verwendeten Rezeptorantagonisten auf die ECM-Synthese auszuschließen, wurden in parallelen Versuchen Interstitialzellen nur mit den entsprechenden Mengen der Rezeptorantagonisten ohne Cabergolin-Stimulation mit behandelt. Keiner der verwendeten Antagonisten zeigte einen Effekt auf den [^3H]-Prolin-Einbau (Abb. 26).

Um die Beteiligung der Serotoninrezeptorsubtypen an der Cabergolin-induzierten Erhöhung der Kollagensynthese zu untersuchen, wurde noch ein weiterer Ansatz verwendet und zwar wurden Herzklappeninterstitialzellen mit selektiven Serotoninrezeptoragonisten stimuliert. Der selektive 5-HT_{2A}-Rezeptoragonist TCB-2 (1 μM) war in der Lage, den [^3H]-Prolin-Einbau zu erhöhen (1.42-fach, $n=4$). Die Stimulation der Zellen mit 5-Carboxamidotryptamin (5-CT) (1 μM), ein nicht selektiver 5-HT_{1A/1B/1D}-Rezeptoragonist, führte auch zur Erhöhung des [^3H]-Prolin-Einbaus um das 1.5-fache, $n=3$. Die Stimulation der 5-HT_{2B}-Rezeptoren mit dem selektiven Agonisten BW736C84 (1 μM) hatte keinen Einfluss auf den [^3H]-Prolin-Einbau bzw. auf die Kollagensynthese ($n=4$). Die Ergebnisse sind in Abb. 27 präsentiert.

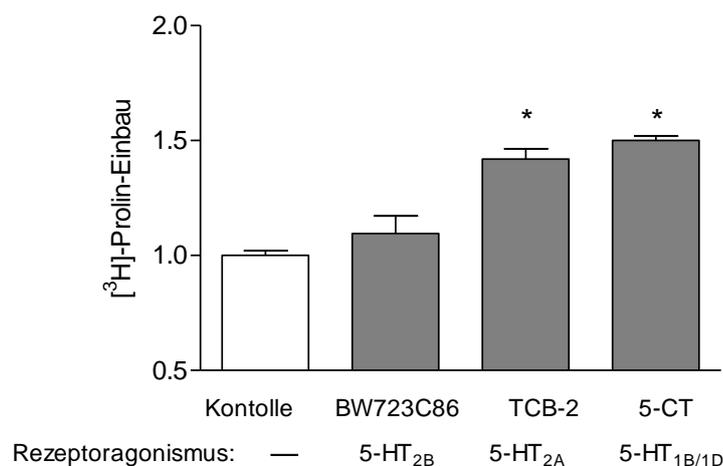


Abb. 27 Einfluss auf die Kollagenbiosynthese anhand des [^3H]-Prolineinbaus durch die Serotoninrezeptoragonisten BW723C86 (5-HT_{2B}-Rezeptoragonist), TCB-2 (5-HT_{2A}-Rezeptoragonist) und 5-CT (5-HT₁-Rezeptoragonist) in Herzklappeninterstitialzellen des Schweins. Alle Substanzen wurden bei 1 μM eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. von 3 bis 4 unabhängigen Experimenten. * $P < 0.05$.

3.5.2 Einfluss auf die Neusynthese von Glykosaminoglykan (GAG) (Einbau von [³H]-Glucosamin)

Eine weitere Methode die Erhöhung der ECM-Biosynthese in Interstitialzellen der Herzklappen zu untersuchen, stellt die Messung des Einbaus von radioaktiv markiertem Glucosamin ([³H]-Glucosamin) dar. Glucosamin ist ein Grundbaustein von Glykosaminoglykanen (GAG), die neben Kollagenfasern auch einen weiteren wichtigen Bestandteil der ECM darstellen.

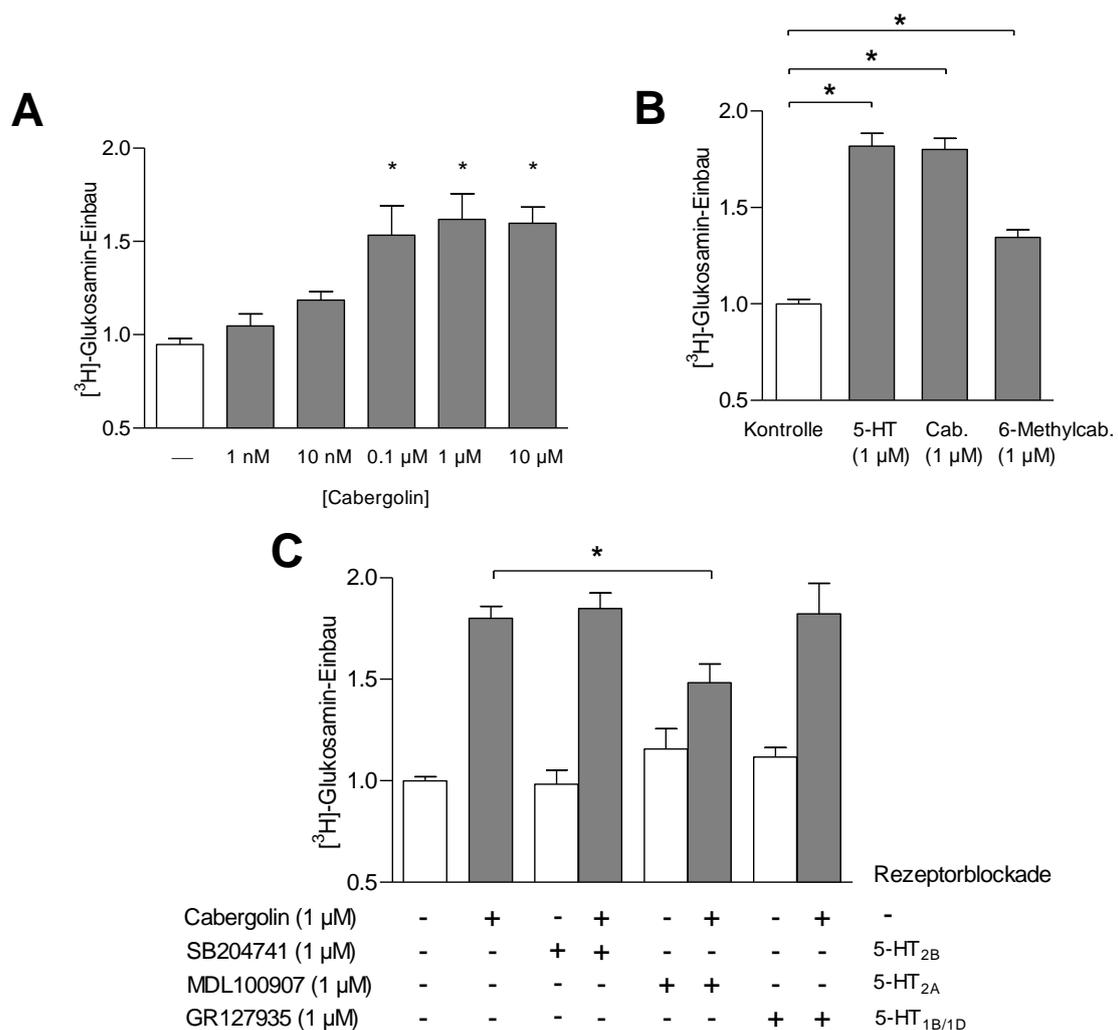


Abb. 28 Zunahme des [³H]-Glucosamineinbaus (A) durch Cabergolin im Vergleich zu 5-HT und 6-Methylcabergolin (B) und in An- und Abwesenheit des 5-HT_{2A}-Rezeptorantagonisten MDL100907, des 5-HT_{2B}-Rezeptorantagonisten SB204741 und des 5-HT_{1B/D}-Rezeptorantagonisten GR127935 (C) in Herzklappeninterstitialzellen des Schweins. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M. von 3 bis 6 unabhängigen Experimenten. **P* < 0.05

Cabergolin führte zu einem erhöhten Einbau von [^3H]-Glucosamin nach einer Behandlungszeit von 48 h. Übereinstimmend mit der Untersuchung der Kollagenbiosynthese war der stimulierende Effekt auf die VICs konzentrationsabhängig. (Abb. 28. A).

Aufbauend auf den bisherigen Ergebnissen hinsichtlich der Stimulation der Kollagensynthese und des damit verbundenen Fibrospotentials, wurde die Auswirkung von 6-Methylcabergolin auf die GAG-Biosynthese ebenfalls untersucht. 6-Methylcabergolin wirkte stimulierend auf die GAG-Biosynthese, dennoch war dieser Effekt weniger ausgeprägt als im Vergleich zu den Effekten von Cabergolin und Serotonin (Abb. 28 B).

Wie aus den Ergebnissen in Kap 3.5.1 ersichtlich ist, wurde der stimulierende Effekt von Cabergolin auf die Kollagenbiosynthese über 5-HT_{2A}-Rezeptoren vermittelt. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde die Biosynthese von GAG nach einer selektiven Rezeptorblockade und Stimulation mit Cabergolin untersucht. Nach der Behandlung mit Cabergolin (1 μM) über 48 h wurde der GAG-Einbau in Zellen nach 5-HT_{2A}-Rezeptorblockade deutlich vermindert (Abb. 28 C). Im Gegensatz dazu wurde in Zellen nach Blockade von 5-HT_{2B} und 5-HT_{1B/D}-Rezeptoren keine Verminderung festgestellt. Aus Abb. 28 C ist ersichtlich, dass die verwendeten Rezeptorantagonisten an sich keine Auswirkungen auf die GAG-Synthese hatten.

3.6 Beteiligung von Signalkaskaden an den kontraktile Effekten der Schweineaortenklappe

Um die molekularen Mechanismen der kontraktile Effekte von Cabergolin auf das Herzklappengewebe aufzuklären, wurden Inhibitoren der Src- und MEK1/2-Kinasen eingesetzt. Der Effekt der Hemmstoffe wurde wie in Kap. 2.2.1.4 mittels Organbadstudien in Streifen von isolierten Aortenklappen in der Längsrichtung untersucht.

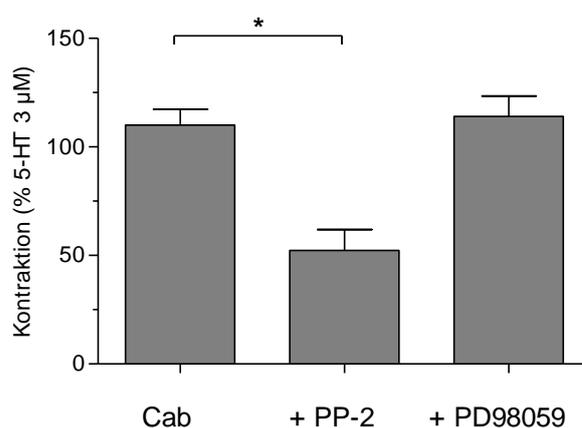


Abb. 29 Kontraktile Effekte von Cabergolin (3 μM) in Aortenklappenstreifen des Schweins in Ab- und Anwesenheit von PP-2 (10 μM) und PD98059 (10 μM). Dargestellt sind Mittelwerte als % der Vorkontraktion mit 3 μM 5-HT \pm S.E.M. ($n = 4$, $*P < 0.05$).

Der Zusatz von 3 μM Cabergolin führte zu einer ausgeprägten Kontraktion des Aortenklappengewebes. Dieser Effekt blieb nahezu unverändert in Anwesenheit von 10 μM PD98059 (selektiver MEK1-Inhibitor). In Anwesenheit von 10 μM PP-2 (selektiver Src-Kinase-Inhibitor) war der Effekt um die Hälfte abgeschwächt (von $110 \pm 7\%$ auf $52 \pm 10\%$, $n = 4$, $P < 0.05$) (Abb. 29).

Um die Rolle der MAPK/MEK/ERK-Signalweges genauer zu untersuchen, wurde die Cabergolin-induzierte Konzentrations-Wirkungskurve sowohl in An- als auch in Abwesenheit des selektiven MEK1/2 Inhibitors U0126 aufgenommen. U0126 (10 μM) verursachte eine Depression des maximalen Effektes von $124 \pm 7\%$ auf $85 \pm 2\%$, ($n = 4$, $P < 0.05$) (Abb. 30).

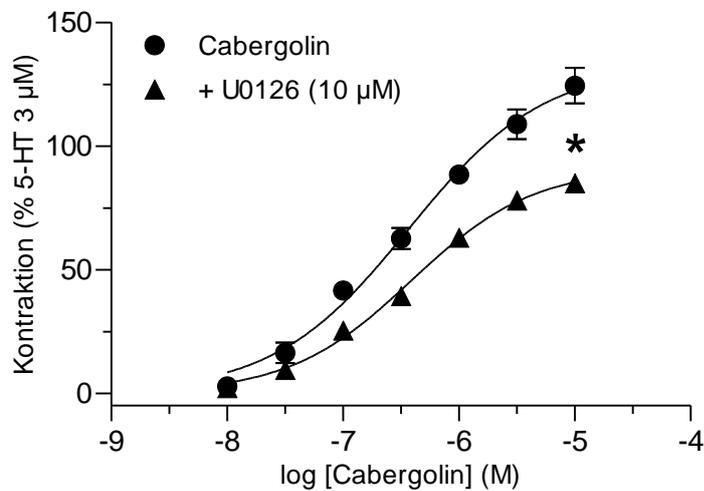


Abb. 30 Kontraktile Effekte von Cabergolin (10 nM bis 10 μM) in Aortenklappen des Schweins in An- und Abwesenheit des MEK-Hemmstoffs U0126 (10 μM). Dargestellt sind Mittelwerte als % der Vorkontraktion mit 3 μM 5-HT \pm S.E.M. ($n = 4$, * $P < 0.05$).

3.7 Beteiligung von Signalkaskaden an der Biosynthese von Kollagen

Die Beteiligung der ERK 1/2 Signalkaskade und der Src-Kinase an der Cabergolin-induzierten Kollagen-Synthese in VICs wurde, wie bereits in Kapitel 2.2.5.1 beschrieben, durch den Zusatz von radioaktiv-markiertem [^3H]-Prolin untersucht.

In Anwesenheit des selektiven Hemmstoffes der MEK 1/2 PD 98059 (10 μM) kam es zu einem geringeren Einbau von [^3H]-Prolin bzw. zu einer Hemmung der Cabergolin induzierten Kollagen-Biosynthese. Dieses Ergebnis war jedoch nicht signifikant ($P > 0.05$). Nach dem Zusatz des selektiven Src-Kinase Hemmstoffes PP-2 (10 μM) wurde eine signifikante Abnahme der Kollagen-Biosynthese in VICs gemessen (Abb. 31).

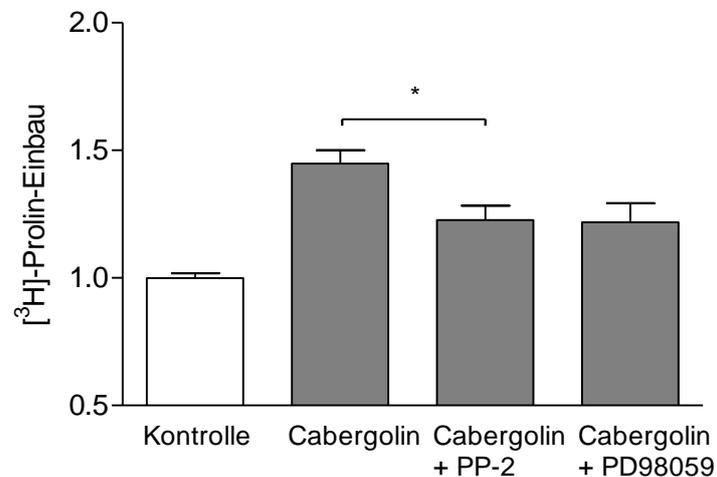


Abb. 31 Einfluss auf die Kollagenbiosynthese anhand der Erhöhung des [^3H]-Prolineinbaus durch die Hemmstoffe der MEK1/2- (PD98059, 10 μM) und der Src-Kinasen (PP-2, 10 μM) in Herzklappeninterstitialzellen des Schweins nach einer Inkubationszeit von 48 h. Die Cabergolin-Konzentration betrug 1 μM . Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. von 3 unabhängigen Experimenten. * $P < 0.05$.

3.8 Einfluss von Cabergolin und Serotonin auf die Zellproliferation und Beteiligung der ERK 1/2-Kinasen

Für die Untersuchung der Zellproliferation wurden Interstitialzellen der Herzklappen mit Tritium-haltigem Methylthymidin ($[^3\text{H}]$ -Methylthymidin) markiert. Der Einbau von $[^3\text{H}]$ -Methylthymidin in die neusynthetisierten DNA-Stränge ist proportional zur Zellteilungsrate und diente als Messgröße.

Cabergolin und 5-HT ($1\ \mu\text{M}$) zeigten einen stimulierenden Effekt auf die Zellteilung nach 24 und 48 h. Der Effekt war nach 48 h Behandlungszeit deutlich ausgeprägter (Abb. 32).

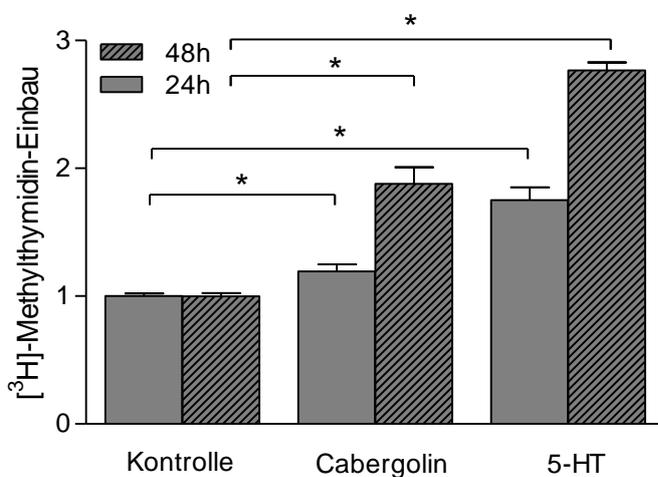


Abb. 32 Effekte von Cabergolin und 5-HT auf die Zellproliferation (Einbau von $[^3\text{H}]$ -Methylthymidin als Messgröße) nach 24 h (offene Säulen) und 48 h (schattierte Säulen). Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. ($n = 4-7$, $*P < 0.05$)

Um die Beteiligung der Extracellular-signal Regulated Kinasen ERK 1/2 an dem Proliferationsprozess zu untersuchen, wurde der Einbau von $[^3\text{H}]$ -Methylthymidin in VICs nach Behandlung mit Serotonin in Anwesenheit von $1\ \mu\text{M}$ U0126 (selektiver ERK 1/2 Inhibitor) gemessen. Der stimulierende Effekt von 5-HT ($1\ \mu\text{M}$) wurde stark gehemmt ($P < 0.05$). Der Hemmstoff an sich zeigte keinen hemmenden Effekt (Abb. 33).

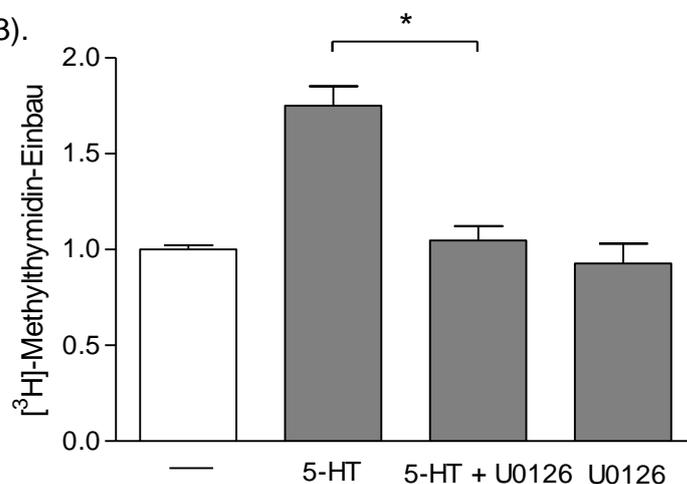


Abb. 33 Beteiligung der ERK 1/2-Kinase an der 5-HT-induzierten Zellproliferation (Einbau von $[^3\text{H}]$ -Methylthymidin als Messgröße) nach 24 h in PVIC. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. ($n = 4-7$, $*P < 0.05$)

3.9 Effekte von Tergurid auf die ECM-Biosynthese und ERK 1/2-Aktivierung

Der Dopaminagonist Tergurid ist ein weiteres Ergolin-Derivat, welches dem Cabergolin strukturell verwandt ist. Im Gegensatz zu Cabergolin sind für Tergurid keine fibrotischen Veränderungen als Nebenwirkung bekannt. Als nächstes sollten die Effekte von Tergurid auf die ECM-Biosynthese und ERK 1/2-Aktivierung untersucht werden.

Im Gegensatz zu Serotonin und Cabergolin zeigte Tergurid (1 μM) keinen stimulierenden Effekt auf die Kollagenbiosynthese in Interstitialzellen der Herzklappen. Als Messgröße diente erneut der Einbau von [^3H]-Prolin. Darüber hinaus war Tergurid in der Lage, den stimulierenden Effekt von Serotonin zu hemmen ($P < 0.05$), (Abb. 34).

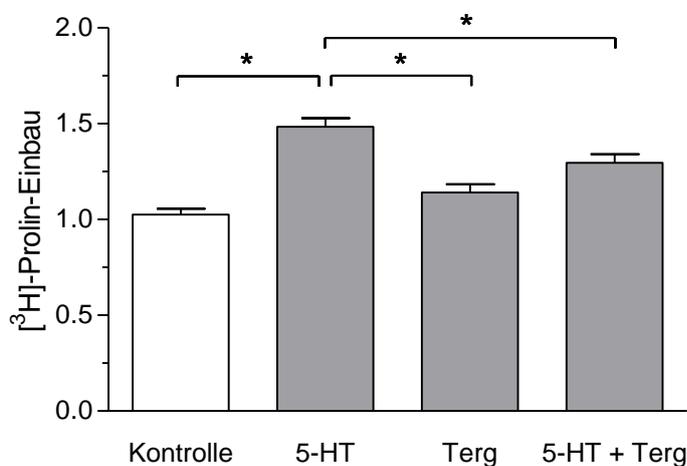


Abb. 34 Effekte von Tergurid (1 μM) allein und in Anwesenheit von 5-HT (1 μM) auf die Neubildung von Kollagen (als Messgröße diente der Einbau von [^3H]-Prolin) in VIC. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus 4 unabhängigen Experimenten, $*P < 0.05$.

In Western Blot Experimenten zeigte Tergurid (1 und 10 μM) keine Erhöhung der ERK1/2 Phosphorylierung in VICs. In Anwesenheit von Tergurid wurde der stimulierende Effekt von 5-HT auf die Expression der phosphorylierten ERK 1/2-Form deutlich vermindert. Die Intensität dieser Verminderung fiel bei der Vorbehandlung mit 1 μM Tergurid schwächer aus als mit 10 μM (Abb. 34).

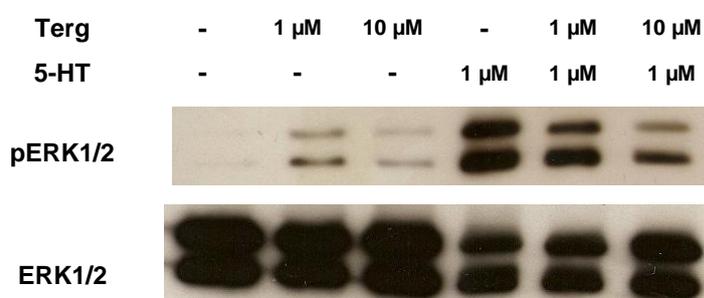


Abb. 35 Western Blot-Analyse, die den Einfluss von Tergurid (1 μM und 10 μM) allein und in Anwesenheit von 5-HT (1 μM) auf die ERK1/2 Phosphorylierung in VICs zeigt. Die Blots sind repräsentativ für 4 unabhängige Experimente mit vergleichbaren Resultaten.

4 Diskussion

4.1 Einfluss der Seitenkette in Position 6 im Cabergolinmolekül auf die pharmakologischen Eigenschaften

4.1.1 Einfluss der Seitenkette in Position 6 im Cabergolinmolekül auf die Eigenschaften an 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Rezeptoren

Cabergolin, ein Dopaminagonist vom Ergotalkaloidtyp, wird bei der Therapie von Morbus Parkinson und bei einigen endokrinologischen Dysfunktionen wie der Hyperprolaktinämie verwendet (Colao et al., 2002; Di Marco et al., 2002; Fariello, 1998; Rains et al., 1995). Cabergolin sowie der verwandte Arzneistoff Pergolid wurden in den letzten Jahren mit schwerwiegenden fibrotischen Nebenwirkungen an den Herzklappen in Verbindung gebracht. Der Zusammenhang wurde in zahlreichen klinischen Studien und Anwendungsbeobachtungen belegt, was zur Begrenzung der therapeutischen Anwendung dieser Substanzen führte (Agarwal et al., 2004; Antonini and Poewe, 2007; Guptha and Promnitz, 2005; Schade et al., 2007; Tintner R, 2005; Townsend and MacIver, 2004). Die Entstehung der fibrotischen Veränderungen an den Herzklappen wurde mit der Aktivierung des 5-HT_{2B}-Rezeptors in diesem Gewebe assoziiert (Fitzgerald et al., 2000; Roth, 2007; Rothman et al., 2000). Darüber hinaus wurde auch eine Beteiligung des 5-HT_{2A}-Rezeptors mit dem pathologischen Prozess in Verbindung gebracht (Jian et al., 2002; Xu et al., 2002). Hinsichtlich der chemischen Struktur unterscheiden sich Cabergolin und Pergolid von anderen Ergolinderivaten an den Substituenten in Position 6 des Grundgerüsts (Abb. 1). Anstelle des üblichen Methylrests besitzt Cabergolin einen Allyl- und Pergolid einen Propylrest als Substituent an dieser Position. Die Grundhypothese der beschriebenen Arbeiten war, dass die voluminöseren Seitenketten beider Substanzen über die pharmakologischen Eigenschaften an den 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Rezeptoren bestimmen und somit auch über das Auftreten der Herzklappenfibrose. Demnach war es von Interesse zu untersuchen, ob sich die pharmakologischen Wirkungen an den 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}- Rezeptoren nach Modifikationen der N(6)-Position im Cabergolinmolekül verändern.

Die Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehung aus der vorliegenden Arbeit ergab, dass Cabergolin ein Vollagonist an 5-HT_{2B}-Rezeptoren ist. Ein ähnliches pharmakologisches Profil wurde auch bei den Cabergolin-Derivaten mit größeren Substituenten beobachtet: 6-Cyclopropylmethylcabergolin, 6-Propylcabergolin und 6-

Ethylcabergolin verhielten sich als Vollagonisten an den 5-HT_{2B}-Rezeptoren. Im Gegensatz dazu wirkte 6-Methylcabergolin als stiller Antagonist. 6-Norcabergolin verhielt sich als Partialagonist mit einer geringen Wirkung. Diese Verbindung ist zwar ein Metabolit von Cabergolin, scheint aber schnell weiter metabolisiert zu werden, da sie bis jetzt nur in geringen Mengen in Rattenurin festgestellt wurde. Daher hat sie wahrscheinlich keinerlei klinische Relevanz (Battaglia et al., 1993). An 5-HT_{2A}-Rezeptoren verhielten sich Cabergolin, 6-Cyclopropylmethylcabergolin, 6-Propylcabergolin und 6-Ethylcabergolin als Partialagonisten. 6-Methylcabergolin war ein stiller Antagonist auch an diesem Rezeptortyp und 6-Norcabergolin zeigte antagonistische Wirkung.

Die Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehung von Cabergolin und seinen Derivaten ergab, dass sie sehr ähnliche pharmakologische Eigenschaften haben wie die entsprechenden Pergolid-Derivate, die in früheren Studien in der Arbeitsgruppe Prof. Pertz getestet wurden (Görnemann et al., 2008a). Analog zu den untersuchten Cabergolinderivaten erwiesen sich Pergolid, 6-Cyclopropylmethylpergolid und 6-Ethylpergolid als Partialagonisten an den 5-HT_{2A}- und als Vollagonisten an den 5-HT_{2B}-Rezeptoren, wohingegen 6-Methylpergolid als Antagonist an diesen Rezeptoren wirkte (Görnemann et al., 2008a). Der Austausch der Propyl- oder Allyl-Seitenkette durch eine kleinere Methylgruppe in dem Ergolin-Skelett bewirkte die Umwandlung des Agonismus in einen stillen Antagonismus.

In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass Cabergolin als Vollagonist an rekombinanten humanen 5-HT_{2B}-Rezeptoren, exprimiert in CHO-Zellen, wirkt (Newman-Tancredi et al., 2002b). Die agonistische Potenz konnte mit den Werten aus der vorliegenden funktionellen Studie an der Schweinepulmonalarterie bestätigt werden. In der vorliegenden funktionellen Untersuchung an der Schweinekoronararterie verhielt sich Cabergolin als Partialagonist an den 5-HT_{2A}-Rezeptoren. In Studien an rekombinanten 5-HT_{2A}-Rezeptoren in transfizierten Zellen erwies sich Cabergolin jedoch als Vollagonist mit ca. 60-fach höherer Potenz.

Es ist nicht ungewöhnlich, dass Ergebnisse aus der Bestimmung der agonistischen Wirkung unterschiedlich ausfallen, wenn die Untersuchungen an nativen Rezeptoren und an rekombinanten Rezeptoren, exprimiert in transfizierten Zellen, durchgeführt werden. Die agonistische Potenz ist abhängig von der Anzahl und der Dichte der Rezeptoren sowie der Effizienz der Rezeptor-Effektor-Kopplung. Ein Ligand, der am gleichen Rezeptortyp anbindet, kann Abweichungen in seiner Wirkung bei unterschiedlichen experimentellen Modellen und Bedingungen aufweisen (Hoyer und

Boddeke, 1993). Eine Überexpression der Rezeptoren in dem experimentellen Modell kann zu einer konstitutiven Rezeptoraktivität führen und die Ligandencharakterisierung anhand zellulärer Signale verändern. Auch eine Kopplung der Rezeptoren mit alternativen Membrankomponenten in transfizierten Zellen kann zu Unterschieden zu nativen Systemen führen (Kenakin, 1997).

Zusätzlich ist zu erwähnen, dass Ergoline fast identische Affinitäten für die Serotonin-Rezeptoren sowohl beim Menschen als auch beim Schwein aufweisen (Nelson et al., 1993). Darüber hinaus beträgt die Sequenzhomologie zwischen Human- und Schweine-5-HT_{2A}-Rezeptoren 97 % (Ullmer et al., 1995). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die unterschiedliche Wirkung von Cabergolin an humanen rekombinanten und nativen Schweinerezeptoren nicht auf biologische Speziesunterschiede zurückzuführen ist, sondern auf Unterschiede im experimentellen Modell.

Das Ergolin-Derivat Ergotamin, welches früher zur Migränetherapie eingesetzt wurde, sowie sein aktiver Metabolit Methylergonovin besitzen eine Methylgruppe an der N(6)-Position des Grundgerüsts. Diese Substanzen wurden nur selten mit fibrotischen Veränderungen an den Herzklappen in Verbindung gebracht, dennoch existieren in der Literatur einige Berichte über das Auftreten von Herzklappenschäden bei der Anwendung von Ergotamin (Hauck et al., 1990; Hendrikx et al., 1996; Wilke et al., 1997). Demnach ist ein Beitrag anderer Strukturelemente des Ergolingerüsts für die Nebenwirkung nicht auszuschließen. Es bedarf weiterer Studien, um diese Fragestellung endgültig zu klären.

4.1.2 Einfluss der Seitenkette in Position 6 im Cabergolinmolekül auf die pharmakologischen Eigenschaften an D₂-Rezeptoren

6-Methylcabergolin unterscheidet sich von der Muttersubstanz Cabergolin bezüglich der pharmakologischen Eigenschaften an 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Rezeptoren und könnte daher keine fibrotische Nebenwirkungen verursachen. Welche Auswirkungen diese Strukturmodifikation auf die gewünschten pharmakologischen Eigenschaften hat, war unbekannt und wurde in dieser Arbeit untersucht. Dem therapeutischen Effekt von Cabergolin sowohl als Antiparkinsonmittel als auch zur Senkung des Prolaktinspiegels liegt der Agonismus an zentralen D₂-Rezeptoren zugrunde (Gillam et al., 2006; Guttman und Jaskolka, 2001). Aus diesem Grund wurde die Aktivierung der G-Proteingekoppelten D₂-Rezeptoren mittels der [³⁵S]GTPγS-Bindungs-Studie untersucht. Da die therapeutisch verwendeten Dopaminagonisten wie Cabergolin eine Affinität

sowohl an D_{2S}- als auch an D_{2L}-Rezeptorisoformen aufweisen, wurden beide Rezeptorsubtypen untersucht (Millan et al., 2002).

Die [³⁵S]GTPγS-Bindungs-Studie ergab eine höhere Affinität an D_{2S}- und D_{2L}-Rezeptoren von Cabergolin und 6-Methylcabergolin im Vergleich zum D₂-Agonisten Quinpirol, der als Referenzagonist diente. Diese Ergebnisse stimmen mit jenen vorheriger Studien an rekombinanten D_{2S}- und D_{2L}- Rezeptoren überein (Millan et al., 2002). Die agonistische Potenz an beiden D₂-Rezeptoren ist nach Austausch der Allyl- durch die Methylgruppe in Position 6 erhalten geblieben. 6-Methylcabergolin zeigte eine geringere Wirksamkeit, bzw. einen geringeren maximalen Effekt (E_{max}) im Vergleich zu Cabergolin, verhielt sich jedoch als ein hochwirksamer partieller Agonist an D₂-Rezeptoren.

4.1.3 Schlussfolgerungen

Aus den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit wird ersichtlich, dass die Allylseitenkette in der Position N(6) im Cabergolinmolekül für die agonistischen Eigenschaften dieser Substanz an den 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Rezeptoren wesentlich ist. Diese Ergebnisse stimmen mit der Bedeutung der N(6)-Propyl Gruppe des Pergolidmoleküls überein, die den Agonismus an beiden Rezeptoren beeinflusst. Da die Aktivierung der 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Rezeptoren zur Entwicklung fibrotischer Veränderungen beiträgt (Rothman et al., 2000; Xu et al., 2002), wird hier ein plausibler molekularer Mechanismus aufgezeigt, wie die voluminösere Seitenkette an der N(6)-Position in dem Ergolin-Grundgerüst die schwerwiegende Nebenwirkung an den Herzklappen verursachen kann. Der Austausch der größeren Seitenkette mit einer kleineren Methylgruppe führte zum Verlust der agonistischen Eigenschaften an 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Rezeptoren. 6-Methylcabergolin erwies sich als ein Antagonist an diesen Rezeptoren und ist dadurch möglicherweise kein Induktor von fibrotischen Veränderungen im Unterschied zur Muttersubstanz Cabergolin. Gleichzeitig wurden die gewünschten pharmakologischen Eigenschaften von 6-Methylcabergolin durch die vorgenommene Strukturänderung nicht nachteilig beeinflusst. Die agonistische Funktion an der eigentlichen Zielstruktur, die D_{2S}- und D_{2L}-Rezeptoren, ist bei 6-Methylcabergolin erhalten geblieben. Somit wäre 6-Methylcabergolin ein neues potentiell Therapeutikum mit einem günstigeren Nebenwirkungsprofil.

4.2 Bedeutung der 5-HT-Rezeptoren für die Kontraktionsfähigkeit und das mechanische Verhalten der Herzklappen

Untersuchungen der Funktion und des mikroanatomischen Aufbaus der Herzklappen zeigen, dass sie sich durch die vorhandenen Nervenendigungen und kontraktile Elemente an die hämodynamischen und humoralen Bedingungen anpassen können (Borin et al., 2006; El-Hamamsy et al., 2009; Marron et al., 1996). Somit erfolgt das Öffnen und Schließen der Herzklappen nicht als ein ausschließlich passiver Vorgang infolge der Druckänderung während des Herzzyklus. In allen vier Herzklappen des Menschen wurde die Geneexpression für diverse Muskel-relevante Strukturproteine wie die Filamentkomponenten des Sarkomers Troponin T,I und C, sowie α - und β -Myosin nachgewiesen (Brand et al., 2006; Roy et al., 2000a). Eine Reihe von vasoaktiven Substanzen wie Endothelin-1, 5-HT, Histamin und Noradrenalin, sind in der Lage, Kontraktionen an isolierten Klappensegeln auszulösen (Brand et al., 2006; Chester et al., 2000). Die Kontraktionsfähigkeit des Herzklappengewebes kann auf die Interstitialzellen und insbesondere auf deren aktivierte Form – die Myofibroblasten - zurückgeführt werden. Charakteristisch für die myofibroblastische Zellpopulation ist die Ähnlichkeit mit Glattmuskelzellen und das Vorhandensein von glattmuskulärem alpha-Aktin (α -smooth-muscle-actin α -SMA) (Mulholland und Gotlieb, 1996; Taylor et al., 2000). Die kontraktile Eigenschaften der Interstitialzellen der Herzklappen werden durch die Beobachtung verdeutlicht, dass sie in der Lage sind, gelartige Kollagen-Matrices zu falten und mechanische Kräfte zu generieren (Butcher et al., 2004; Messier et al., 1994).

Die Kontraktionsfähigkeit und Dehnbarkeit der Herzklappen sind in der Längsrichtung stärker ausgeprägt als in die Querrichtung (Kershaw et al., 2004). Immunohistochemische Untersuchungen des Aortenklappengewebes vom Menschen und Schwein zeigen eine Ausrichtung der α -SMA-positiven Myofibroblasten in die Längsrichtung (Cimini et al., 2003). Ein ähnliches Muster wird auch bei der Verteilung der Kollagenfasern in der Fibrosa-Schicht der Klappensegel beobachtet (Butcher et al., 2011; Xu und Grande-Allen, 2010). Dies unterstreicht die Rolle der Interstitialzellen für die mechanischen Eigenschaften des Gewebes.

In der vorliegenden Arbeit war 5-HT in der Lage, konzentrationsabhängig in einem breiten Intervall (1 nM bis 10 μ M) Kontraktionen in streifenförmigen Ausschnitten von Aortenklappen in Längsrichtung auszulösen. Ketanserin (selektiver 5-HT_{2A}-Rezeptor Antagonist, 10 nM) konnte die 5-HT-induzierte Konzentrations-Wirkungskurve parallel

nach rechts verschoben, ohne den maximalen Effekt zu verringern (Abb. 19). Der scheinbare pA_2 -Wert für Ketanserin von 8.66 spricht für eine Beteiligung des 5-HT_{2A}-Rezeptors an dem kontraktilen Mechanismus und stimmt mit den pK_i -Werten für diese Substanz an humanen, rekombinanten (pK_i von 8.7) und nativen (pK_i von 8.58) 5-HT_{2A}-Rezeptoren überein (Bryant et al., 1996; Richelson und Souder, 2000). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie über die Beteiligung von 5-HT_{2A}-Rezeptoren an der Kontraktion stimmen mit den Ergebnissen von Chester et al. (2000), die ebenfalls einen hemmenden Effekt von Ketanserin auf die Kontraktion von Schweineaortenklappen demonstrieren, überein. Allerdings löste Ketanserin in der Untersuchung von Chester et al. (2000) eine stark ausgeprägte Depression des Maximaleffekts aus, was an der 1000-fach höheren verwendeten Konzentration (10 μ M) liegen könnte.

Der selektive 5-HT_{2B}-Rezeptor Antagonist SB204741, in einer Konzentration von 3 μ M, zeigte keinen Einfluss auf die kontraktile Antwort. Dies spricht somit gegen eine Beteiligung der 5-HT_{2B}-Rezeptoren an diesem biologischen Effekt. GR127935 (Antagonist des 5-HT_{1B/D}-Rezeptors) hemmte die Serotonin-abhängige Kontraktion ab einer Konzentration von 100 nM, zeigte aber keine Hemmwirkung bei einer geringeren Konzentration (10 nM). Dies ist von besonderer Bedeutung, da es bekannt ist, dass 5-HT_{1B/D}-Rezeptor vermittelte Effekte im subnanomolaren Bereich durch GR127935 gehemmt werden können (PDSP K_i Datenbank <http://pdsp.med.unc.edu/indexR.html>). Für den Antagonisten GR127935 konnte ein scheinbarer pA_2 -Wert von 7.6 ermittelt werden. Konsistent mit diesem Befund wurde in Zellen, transfiziert mit rekombinanten humanen 5-HT_{2A}-Rezeptoren, ein pK_i -Wert für GR127935 von 7.4 für diesen Antagonisten bestimmt (Huang et al., 2005), was für die Beteiligung des 5-HT_{2A}-Rezeptors und gegen die Beteiligung des 5-HT_{1B/D}-Rezeptors an der Kontraktion der Aortenklappe spricht.

Cabergolin löste ebenfalls konzentrationsabhängige kontraktile Effekte im Herzklappengewebe in der Längsrichtung aus, die durch den 5-HT_{2A}-Rezeptortyp vermittelt wurden (Abb. 20). Auch wenn Cabergolin sich als Partialagonist an den 5-HT_{2A}-Rezeptoren im Modell der Schweinekoronararterie erwies (Kap. 3.1.1), zeigte diese Substanz eine potente agonistische Wirkung an 5-HT_{2A}-Rezeptoren im Herzklappengewebe.

Es wird vermutet, dass Serotonin und serotonerge Substanzen die Funktion der Herzklappen durch Effekte auf deren kontraktile Strukturen beeinflussen können (Chester et al., 2000). Kontraktionseffekte könnten das korrekte Öffnen und Schließen der Klappensegel beeinträchtigen, zu einer Änderung in deren Geometrie, zu einem

Rückfluss von Blut während der Diastole und somit zur Klappeninsuffizienz führen. In einem in vitro Modell an isolierten Schweineaortenklappen wurde bestätigt, dass Serotonin die Funktion der Aortenklappen durch direkte kontraktile Effekte beeinträchtigt. Nach Zugabe von Serotonin wurde einen erhöhten Flüssigkeitsauslauf aus der Aortenklappe registriert, der durch 5-HT_{2A}-Rezeptoren weitergeleitet wurde (Chester et al., 2001). Es wurde jedoch nicht eindeutig geklärt, ob die direkte kontraktile Wirkung von Serotonin und serotonerger Substanzen auf das Klappengewebe auch ursächlich für die Entstehung der Herzklappenerkrankungen ist.

Die vorliegende Studie demonstriert die Fähigkeit von Serotonin, Kontraktionen an isoliertem Aortenklappengewebe in vitro auszulösen. Cabergolin konnte die Wirkung von Serotonin nachahmen. Diese Effekte wurden durch Aktivierung von 5-HT_{2A}-Rezeptoren vermittelt. Das Vorhandensein von 5-HT_{2A}-Rezeptoren im Herzklappengewebe wurde bereits im Menschen, Schwein und Schaf auf der mRNA-Ebene nachgewiesen (Fitzgerald et al., 2000; Xu et al., 2002) und konnte durch die vorliegende Untersuchung auf funktioneller Ebene bestätigt werden.

4.3 Zellspezifische Untersuchungen zum frühen Mechanismus der Cabergolin-induzierten Fibrose

4.3.1 Charakterisierung der VICs-Primärkultur

Interstitialzellen sind ein häufig verwendetes Modell für die in vitro Untersuchung von Herzklappenerkrankungen, da diese für die Erhaltung der korrekten Struktur und Funktion der Herzklappen verantwortlich sind (s. Kap. 1.3.1). In der vorliegenden Arbeit wurden Interstitialzellen sowohl aus der Aorten- als auch aus der Mitralklappe verwendet, da pathologische Befunde bei Ergotalkaloid-induzierten Herzklappenerkrankungen auf beiden Herzklappen in der Literatur beschrieben wurden (Hendriks et al., 1996; Redfield et al., 1992; Zanettini et al., 2007). Als Bezugsquelle für die Interstitialzellen diente das Schwein, das aufgrund der anatomischen und physiologischen Gemeinsamkeiten zwischen humanen Herzen und Schweineherzen ein breit verwendetes Modell in der kardiovaskulären Forschung ist (Hughes, 1986; Sachs, 1994; Sim et al., 2003; Weaver et al., 1986). Auch wegen der hohen Sequenzhomologie des Genoms vom Menschen und Schwein und wegen der Ähnlichkeiten zwischen den humanen- und Schweine-5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Rezeptoren sind die VICs aus dem Schwein für die vorliegende Fragestellung besonders gut

geeignet (Butcher et al., 2011; Fabre et al., 2008; Frönicke et al., 1996; Johansson et al., 1995; Ullmer et al., 1995).

Die isolierten VICs wurden anhand der für diesen Zelltyp typischen Morphologie und der hohen Expression des Markers α -SMA identifiziert. Die höhere α -SMA-Expression in VICs unter Zellkulturbedingungen im Vergleich zu in vivo Bedingungen ist auf die starre Plastikoberfläche der Zellkulturgefäße zurückzuführen, die eine mechanische Spannung ausübt und eine phänotypische Änderung bewirkt (Cushing et al., 2005; Discher et al., 2005; Pho et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass auf kollagenbeschichteten Oberflächen gezüchteten VICs eine geringere α -SMA Expression aufweisen (Blevins et al., 2008; Butcher et al., 2011).

Eine Verunreinigung der VICs-Kultur mit Herzklappenendothelzellen VECs während der Isolierung aus dem Gewebe ist theoretisch nicht auszuschließen, jedoch benötigen die VECs andere Kulturbedingungen als Interstitialzellen, daher ist eine Mischkultur aus VECs und VICs eigentlich nicht zu erwarten (Merryman et al., 2006; Roy et al., 2000a). Die Immunofluoreszenzuntersuchung der Expression des Endothelzell-Markers von Willebrand Faktor zeigte keine Anwesenheit von VECs in der VICs-Kultur.

4.3.2 Cabergolin-induzierte Aktivierung der ERK 1/2 Signalkaskade

Die „extracellular signal-regulated“ Proteinkinasen ERK 1 und 2 sind zelluläre Signalwege, die an der Regulation der Proliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt und der Aktivierung der 5-HT_{2A}-, 5-HT_{2B}- und 5-HT_{1B}-Rezeptoren nachgeschaltet sind (Knauer et al., 2009; Maddahi und Edvinsson, 2008). Die Aktivierung der ERK 1/2 Signalwege bzw. die Steigerung der phosphorylierten Form gilt als ein frühes Zeichen für proliferative Prozesse bei der Fibrose der Herzklappen (Connolly et al., 2009; Setola et al., 2003; Xu et al., 2002). Serotonin sowie andere Induktoren von Valvulopathien wie Fenfluramin, Norfenfluramin und der MDMA-Metabolit MDA lösen die Aktivierung der ERK-Signalwege aus (Setola et al., 2003), daher wurde am Modell der Herzklappeninterstitialzellen vom Schwein die Wirkung von Cabergolin auf den ERK 1/2 Signalweg untersucht und mit der Wirkung von Serotonin verglichen. Durch die Verwendung selektiver Serotoninrezeptorantagonisten wurde auch die Bedeutung der verschiedenen Rezeptortypen für diese Signalübertragung überprüft.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit an Interstitialzellen des Schweins, die eine Mischung aus Aorten- und Mitralklappen darstellen, zeigten einen dosisabhängigen stimulierenden Effekt von Serotonin auf der ERK 1 und 2 Aktivierung in diesem Modell.

Cabergolin zeigte einen ähnlichen stimulierenden Effekt auf den ERK-Signalweg, der ebenfalls mit steigender Konzentration zu einer stärkeren Phosphorylierung der ERK 1/2 Kinasen führte (Abb. 22).

Die Serotonin-induzierte Aktivierung der ERKs konnte schwach durch eine Vorbehandlung mit dem selektiven 5-HT_{2A}-Rezeptor Antagonisten MDL100907 und stärker durch eine Vorbehandlung mit 5-HT_{1B/1D}-Rezeptor Antagonisten GR129371 gehemmt werden. Hingegen übte die Vorbehandlung mit dem selektiven 5-HT_{2B}-Rezeptorantagonisten SB204741 keinen Einfluss auf den ERK-Signalweg aus.

Die Untersuchungen mit den selektiven Rezeptorantagonisten ergaben, dass die Wirkung von Cabergolin ebenfalls von der Aktivierung der 5-HT_{1B/1D}- und 5-HT_{2A}-Rezeptoren abhängig war. Allerdings war der hemmende Effekt des selektiven 5-HT_{2A}-Rezeptor-Antagonisten MDL100907 auf die Cabergolin-induzierte Phosphorylierung bzw. Aktivierung der ERK 1/2 stärker ausgeprägt als der hemmende Effekt desselben Antagonisten auf die Serotonin-induzierte ERK-Phosphorylierung (Abb. 23). Dies lässt sich dadurch erklären, dass Cabergolin als Partialagonist an 5-HT_{2A}-Rezeptoren wirkt, wohingegen Serotonin ein Vollagonist ist, und somit einen stärkeren Effekt an diesen Rezeptoren hervorruft (Vgl. Kap. 3.1.1). Die Blockade der 5-HT_{2B}-Rezeptoren zeigte keinen Effekt auf die Wirkung von Cabergolin auf die ERK-Signalwege.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit über die Wirkung von Serotonin an den Interstitialzellen des Schweins stimmen mit denjenigen Studien an Interstitialzellen vom Hund, Schaf und Menschen überein, welche ebenfalls einen konzentrationsabhängigen stimulierenden Effekt von Serotonin auf die ERK 1/2 Aktivierung zeigen (Connolly et al., 2009; Xu et al., 2002). Die Beobachtung, dass Cabergolin ähnlich wie Serotonin einen stimulierenden Effekt auf die ERK-Signalwege ausübt, bestätigt die Hypothese, dass die primäre Ursache für die fibrotischen Nebenwirkungen der Ergolin-Derivate an der Aktivierung serotonerger Rezeptoren liegt. Weiterhin zeigen diese Ergebnisse, dass eine erhöhte Aktivierung der ERK 1/2 Signalkaskaden auch bei der Cabergolin-induzierten Herzklappenfibrosen von Bedeutung ist.

Die Serotonin-induzierte ERK 1/2-Aktivierung in Interstitialzellen vom Hund und Menschen wurde durch den 5-HT_{2A}-Rezeptor-Antagonisten Ketanserin gehemmt (Connolly et al., 2009). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, dass die aktivierende Wirkung von Cabergolin und Serotonin auf ERK 1/2 über 5-HT_{2A}-Rezeptoren vermittelt wird. In Untersuchungen an Interstitialzellen vom Schaf konnte die Serotonin-induzierte Phosphorylierung von ERK 1/2 nach der selektiven Blockade mit dem 5-HT_{2A}-Rezeptor Antagonisten MDL100907 nur schwach und in

einem höheren Ausmaß für ERK 1 als für ERK 2 gehemmt werden (Xu et al., 2002). Trotzdem zeigt diese Untersuchung, dass 5-HT_{2A}-Rezeptoren zumindest zum Teil an der ERK-Aktivierung im Herzklappengewebe beteiligt sind. Dies steht im Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen.

Hingegen konnte in dieser Arbeit sowie in der Studie an Interstitialzellen von Hund und Mensch keine Beteiligung der 5-HT_{2B}-Rezeptoren an der frühen proliferativen Signalübertragung durch ERK 1/2 nachgewiesen werden. Die Blockade der 5-HT_{2B/2C}-Rezeptoren mit den Antagonisten SB204741 und SB206553 zeigte keinen Effekt auf die ERK-Phosphorylierung (Connolly et al., 2009). In Widerspruch zu diesen Befunden wurde in der Studie von Setola et al. (2003) die Beteiligung der 5-HT_{2B}-Rezeptoren an der Aktivierung der Proliferation von humanen Interstitialzellen durch die Verwendung des 5-HT_{2B/2C}-Rezeptor-Antagonisten SB206553 demonstriert. Allerdings haben die Autoren die Effekte des 5-HT_{2B/2C}-Rezeptor-Antagonisten SB206553 auf die ERK-Phosphorylierung in Anwesenheit von Serotonin, Fenfluramin oder MDMA nicht untersucht. Der Effekt weiterer Rezeptorsubtyp-Antagonisten wurde in dieser Studie ebenfalls nicht untersucht. Interessanterweise ergab die Untersuchung der Zellproliferation in Anwesenheit von SB206553 keine vollständige Hemmwirkung, so dass die Autoren über eine Mitbeteiligung der 5-HT_{2A}-Rezeptoren diskutieren (Setola et al., 2003).

Ob die Ursache für die Serotonin- und Arzneimittel-induzierte Schädigung der Herzklappen primär auf die Aktivierung der 5-HT_{2B}-Rezeptoren oder der 5-HT_{2A}-Rezeptoren zurückzuführen ist, wird derzeit kontrovers diskutiert. Rothman et al. (2000) und Setola et al. (2003) finden die Ursache in der Aktivierung des 5-HT_{2B}-Rezeptors, wohingegen die Studien von Xu et al. (2002) und Connolly et al. (2009) die Ergebnisse der hier beschriebenen Untersuchung unterstützen, da sie auch eine Beteiligung der 5-HT_{2A}-Rezeptoren in der Aktivierung der ERK 1/2 nachweisen konnten. Untersuchungen der mRNA Expression der Mitglieder der 5-HT₂-Rezeptor-Subfamilie an humanen Herzklappen und Herzklappen vom Schwein ergaben, dass diese Rezeptorsubtypen in den beiden Spezies auf ähnlichem Niveau exprimiert werden (Fitzgerald et al., 2000). Daher ist eine variierende Rezeptorartenverteilung im Herzklappengewebe vom Menschen und Schwein als möglicher Grund für die kontroverse Ergebnisse in den Studien von Setola et al. (2003) und Rothman et al. (2000) sowie dieser Arbeit zu widerlegen. Um die Rolle der einzelnen Serotoninrezeptorarten in der Signalübertragung mittels MAPK zu bestimmen, sind weitere Untersuchungen nötig.

In der Studie von Connolly et al. (2009) zeigte die Blockade des 5-HT_{1B}-Rezeptors mit dem Antagonisten GR55562 ebenfalls einen hemmenden Effekt auf die ERK-Kinasen, allerdings nur in dem Modell der Interstitialzellkultur vom Hund. Am Modell der Interstitialzellkultur aus humanen Herzklappen wurde der Serotonineffekt nicht über 5-HT_{1B}-Rezeptoren, sondern nur über 5-HT_{2A}-Rezeptoren vermittelt. In dieser Arbeit konnte eine Beteiligung der 5-HT_{1B}-Rezeptoren an der Cabergolin- und Serotonin-induzierten ERK 1/2 Phosphorylierung in Interstitialzellen vom Schwein gezeigt werden. Die 5-HT_{1B}- und 5-HT_{1D}-Rezeptoren spielen eine zentrale Rolle bei der Behandlung der Migränesymptomatik, da die Aktivierung dieser Rezeptoren die Konstriktion der schmerzhaft dilatierten kranialen Blutgefäße und die Hemmung der Freisetzung entzündlicher Neuropeptide bewirkt (Tepper et al., 2002). Die Substanzklasse der Triptane sind Antimigränemittel mit agonistischen Eigenschaften an 5-HT_{1B}-Rezeptoren (Jähnichen et al., 2004; van den Broek et al., 2002). Die vasokonstriktorische Wirkung der Triptane ist nicht nur auf die kranialen Gefäße begrenzt und führt auch zu kardiovaskulären Nebenwirkungen, und zwar besonders bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit, jedoch sind für diese Migränetherapeutika keine fibrotische Nebenwirkungen auf die Herzklappen bekannt (Dodick et al., 2004; MaassenVanDenBrink et al., 1998; Tepper und Millson, 2003). Daher ist eine Beteiligung der 5-HT_{1B}-Rezeptoren an der Cabergolin-induzierten Herzklappenfibrose auszuschließen.

Wie bereits durch funktionelle Studien in dieser Arbeit gezeigt wurde, verfügt 6-Methylcabergolin über antagonistische Eigenschaften bezüglich der 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Rezeptoren (Kap. 3.1). Trotzdem konnte diese Substanz eine Aktivierung der ERK 1/2 in Interstitialzellen der Herzklappen auslösen, jedoch in geringerem Ausmaß verglichen mit den Effekten von Serotonin und Cabergolin bei derselben Konzentration. Der stimulierende Effekt von 6-Methylcabergolin auf die ERK 1/2 Aktivität liegt möglicherweise an der Beteiligung anderer Rezeptortypen in diesen Signalwegen als die 5-HT_{2A}-Rezeptoren. Die intensiven Untersuchungen an den MAPK-Signalwegen in den letzten Jahren ergaben, dass viele verschiedene extrazelluläre Signale zur Aktivierung dieser Signalkaskaden führen können. So kann die Aktivierung aller GPCR-Subfamilien und der Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität die Phosphorylierung der ERK 1/2 beeinflussen (McKay und Morrison, 2007; Sugden und Clerk, 1997). Daher wäre die Beteiligung von zusätzlichen Mechanismen neben der Aktivierung von Serotoninrezeptoren bei der Induktion der ERK 1/2 durch Cabergolin durchaus in Erwägung zu ziehen.

4.3.3 Mitogene Effekte von Cabergolin

Neben der Anhäufung überschüssiger Komponenten der extrazellulären Matrix gehören auch die erhöhte Proliferationsrate und Ansammlung von Fibroblasten zu den charakteristischen Merkmalen fibrotischer Prozesse (Krenning et al., 2010). Untersuchungen an fibrotischem Herzklappengewebe von Patienten mit Karzinoidsyndrom zeigen eine mehrfach gesteigerte Anzahl proliferierender Zellen im Vergleich zu gesundem Gewebe (Rajamannan et al., 2001). Typische histopathologische Befunde mit Herden von proliferierenden Interstitialzellen sind in erkrankten Herzklappen infolge einer Behandlung mit Fenfluramin und Ergot-Derivaten beschrieben worden (Bhattacharyya et al., 2009; Connolly et al., 1997; Redfield et al., 1992; Steffee et al., 1999).

Serotonin hat eine mitogene Wirkung auf diverse Zellarten, unter anderem auf Interstitialzellen der Herzklappen, Fibroblasten und Glattmuskelzellen (Fanburg und Lee, 1997; Nemecek et al., 1986; Seuwen et al., 1988; Welsh et al., 2004). In der Literatur ist die Frage, welche Serotonin-Rezeptorsubtypen für die Stimulation der Proliferation der Herzklappeninterstitialzellen verantwortlich sind, nicht einheitlich beantwortet. Cabergolin kann fibrotische Veränderungen an den Herzklappen auslösen und wirkt als Agonist an diversen Serotoninrezeptoren (Newman-Tancredi et al., 2002b; Rasmussen et al., 2008). Es ist daher vorstellbar, dass Cabergolin ebenfalls über mögliche mitogene Eigenschaften einen Effekt auf die Herzklappeninterstitialzellen ausübt. Die vorliegende Untersuchung ergab eine Erhöhung der DNA-Neusynthese nach Behandlung der Interstitialzellen mit Cabergolin bereits nach 24 h. Nach einer Behandlungszeit von 48 h war die DNA-Neusynthese deutlich höher als nach 24 h, was auf eine Verstärkung des Effekts mit der Zeit hindeutet (Abb. 32). Serotonin zeigte bezüglich der Zellproliferation eine stärkere Wirkung im Vergleich zu Cabergolin, was durch die höhere Rezeptoraffinität des endogenen Liganden im Vergleich zu Cabergolin zu erklären ist (Newman-Tancredi et al., 2002b).

Wie bereits in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, werden die ERK 1/2-MAP-Kinasen durch Serotonin und Cabergolin aktiviert (s. Kap. 3.3). Die Gruppe der ERK 1/2 MAPK spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellproliferation (s. Kap. 4.3.2); (Lee et al., 2001). Um die Beteiligung der ERK 1/2 Signalwege an der Serotonin-induzierten Proliferation zu untersuchen, wurde die DNA-Neusynthese nach der selektiven Blockade der ERK 1/2 Aktivierung durch die vorgeschalteten MEK 1/2 Kinasen gemessen. In der Anwesenheit des selektiven MEK-Inhibitors U0126 wurde die

Serotonin-induzierte Proliferation der Interstitialzellen vollständig gehemmt und zeigte somit, dass die mitogene Wirkung von Serotonin über den MAPK-Signalweg übertragen wird. Dieses Ergebnis ist konsistent mit der Studie von Connolly und Kollegen (2009), die eine Verminderung der Serotonin-induzierten Proliferation durch den MEK-Hemmstoff PD98059 in Interstitialzellen vom Hund zeigt.

Die erhöhte Proliferation und nachfolgende Akkumulation von Interstitialzellen gehören zu den Mechanismen der Cabergolin-induzierten Fibrose der Herzklappen. Bei diesem Prozess werden nach der Aktivierung von Serotoninrezeptoren die ERK 1/2 MAP-Kinasen an der Signaltransduktion beteiligt.

4.3.4 Effekte von Cabergolin auf die Synthese der extrazellulären Matrix (ECM)

Die Anhäufung einer überschüssigen extrazellulären Matrix (ECM) spielt bei der Pathologie der Herzklappenfibrose eine entscheidende Rolle (s. Kap. 1.3.2, (Elangbam, 2010)); daher wurde der Einfluss von Serotonin und Cabergolin auf die Synthese der ECM in Interstitialzellen der Herzklappen untersucht. Die Neusynthese der ECM-Komponenten Kollagen und Glykosaminoglykan (GAG) wurde durch den Einbau der jeweiligen radioaktiv markierten Bausteine [³H]-Prolin bzw. [³H]-Glucosamin gemessen. Die Biosynthese von Kollagen und Glykosaminoglykan wurde sowohl durch Serotonin als auch durch Cabergolin erhöht. Für Cabergolin konnte eine Steigerung des stimulierenden Effektes in Abhängigkeit von der Konzentration für beide ECM-Bestandteile nachgewiesen werden (Abb. 25 und Abb. 28). Dieses Ergebnis bestätigt, dass die Cabergolin-induzierte Herzklappenfibrose über einen serotonergen Mechanismus auch bezüglich der Anhäufung überschüssiger ECM-Bestandteile abläuft. Die vorliegende Untersuchung der Serotonin-Wirkung stimmt mit Studien an Interstitialzellen vom Menschen, Schaf und Hund, die einen direkten stimulierenden Effekt von Serotonin auf die Kollagen-Synthese demonstrieren überein (Connolly et al., 2009; Hafizi et al., 2000; Jian et al., 2002). Bei der Untersuchung der Beteiligung der einzelnen 5-HT-Rezeptorsubtypen auf die Cabergolin-Stimulation der Kollagensynthese erwiesen sich die 5-HT_{2A}-Rezeptoren als Signalüberträger. Für die 5-HT_{2B}- und 5-HT_{1B}-Rezeptoren wurde hingegen keine Beteiligung bei den Experimenten mit selektiver Rezeptorblockade ersichtlich (Abb. 26). Um die Rezeptortypenbeteiligung an der Kollagensynthese genauer zu überprüfen, wurde der Einfluss selektiver Rezeptoragonisten auf den [³H]-Prolin-Einbau untersucht. Die Ergebnisse bestätigen die Befunde der Untersuchung der Beteiligung der einzelnen Serotoninrezeptortypen durch die selektive Rezeptorblockade. Die Untersuchung ergab eine Beteiligung der 5-

HT_{2A}-Rezeptoren und keine Beteiligung der 5-HT_{1B}- und 5-HT_{2B}-Rezeptortypen (Abb. 27). Die gleiche Rezeptortypbeteiligung ergab sich bei der Untersuchung der Stimulation der Glykosaminoglykan-Synthese (Abb. 28). Die hier vorliegenden Ergebnisse befinden sich zum Teil in Übereinstimmung mit der Studie von Balachandran et al. (2011), in der gezeigt werden konnte, dass die Kollagensynthese ex vivo in Herzklappensegel des Schweins sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen im Modell der Dehnungsüberlastung des Gewebes von 5-HT_{2A}-Rezeptoren abhängig ist. Weiterhin zeigte diese Studie eine Beteiligung der 5-HT_{2A}-Rezeptoren an der Zellproliferation. Die 5-HT_{2B}-Rezeptoren waren unter physiologischen Bedingungen an diesen biologischen Prozessen beteiligt, aber nicht unter pathologischen Bedingungen bei einer erhöhten Dehnungsbelastung des Gewebes (Balachandran et al., 2011). Die vorliegende Untersuchung zeigte dagegen keine Beteiligung der 5-HT_{2B}-Rezeptoren an der ECM-Produktion und unterschied sich diesbezüglich von den Befunden in der Studie von Balachandran et al. (2011). Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede bietet das Untersuchungsmodell von Balachandran und Kollegen von isoliertem Herzklappengewebe, wohingegen das hier verwendete Modell nur isolierte Interstitialzellen enthält und die Wechselwirkungen zwischen ECM und Zellen sowie zwischen den verschiedenen Zellarten nicht berücksichtigt. Eine weitere Organkulturstudie an isolierten Herzklappensegeln deutete darauf hin, dass neben den 5-HT_{2B}-Rezeptoren auch zusätzliche Mechanismen wie die Aktivierung anderer Rezeptorsubtypen an der Überproduktion der ECM-Bestandteile beteiligt sein können und somit zur Entstehung von fibrotischen Veränderungen beitragen (Barzilla et al., 2010).

In einer Studie an humanen Mitral- und Aortenherzklappeninterstitialzellen wurden 5-HT_{2A}-, 5-HT_{2B}-, und 5-HT_{1B}-Rezeptoren selektiv blockiert und die Kollagensynthese in dieser Zellkultur untersucht (Mekontso-Dessap et al., 2006). Im Gegensatz zu der vorliegenden Untersuchung übte nur die Blockade der 5-HT_{1B}-Rezeptoren einen hemmenden Effekt auf die Serotonin-induzierte Kollagensynthese aus, während die Blockade der 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Rezeptoren keine Rolle spielte. In der Studie von Mekontso-Dessap et al. (2006) wurden die humanen Interstitialzellen aus insuffizienten Herzklappen entnommen, wohingegen die hier verwendeten Zellen aus gesunden Tieren stammten. Daher ist nicht auszuschließen, dass je nachdem, ob eine Erkrankung bereits vorliegt, die Wirkung von Serotonin unterschiedlich ausfallen kann (Mekontso-Dessap et al., 2006). Auch wenn die Ergebnisse aus der Studie von Mekontso-Dessap und Kollegen auf eine Beteiligung des 5-HT_{1B}-Rezeptors an der

Serotonin-stimulierten Kollagen-Biosynthese hindeuten, wurde in derselben Studie ein Beteiligung dieses Rezeptortyps an der Herzklappenfibrose widerlegt. In in vivo Experimenten an genetisch veränderte Knockout Mäusen, zeigten die Autoren, dass das Fehlen des 5-HT_{1B}-Rezeptors die Entwicklung von Valvulopathien nicht verhindert, wenn bei den Tieren gleichzeitig der Serotonin-Transporter fehlt, bzw. wenn es durch die verminderte Zellaufnahme von Serotonin zu einer erhöhten Konzentration an zirkulierendem Serotonin kommt.

In der vorliegenden Arbeit wurde auch die Wirkung des Cabergolin-Derivats 6-Methylcabergolin auf die Biosynthese der ECM-Komponente untersucht. 6-Methylcabergolin ist ein Antagonist an den 5-HT_{2A} und 5-HT_{2B}-Rezeptoren. Es ist daher vorstellbar, dass diese Substanz keinen stimulierenden Effekt auf die ECM-Synthese ausüben sollte. Jedoch ergab die Analyse, dass 6-Methylcabergolin eine leichte Erhöhung der ECM-Produktion verursacht, welche allerdings wesentlich schwächer als bei Serotonin und Cabergolin ausfiel. Bei der Betrachtung der Ergebnisse über die Stimulation von 6-Methylcabergolin der ECM-Biosynthese in Zusammenhang mit dem Ergebnis, dass der stimulierende Effekt von Cabergolin durch die selektive Blockade der 5-HT_{2A}-Rezeptoren nicht vollständig gehemmt wurde, ist eine Beteiligung anderer Mechanismen an der Cabergolin-induzierten Herzklappenfibrose nicht auszuschließen. Es bedarf weiterer Studien, um dies zu bestätigen und um den genauen Mechanismus der Nebenwirkungen von Cabergolin und anderer Dopaminagonisten der Ergolin-Klasse auf die Herzklappen aufzuklären. Eine gezielte Ausschaltung von Genen, die für bestimmte Serotonin-Rezeptorsubtypen kodieren, durch den Einsatz der Antisense-Technologie, könnte weitere Erkenntnisse über deren Beteiligung an dem fibrotischen Prozess liefern.

Die vorliegende Untersuchung ist durch einige Einschränkungen begrenzt. Die hier durchgeführte in vitro Untersuchung an Zellkultur kann möglicherweise die in vivo Situation nicht vollständig darstellen (Mekontso-Dessap et al., 2006). Die Entstehung einer arzneimittelinduzierten-Fibrose in vivo ist ein chronischer Prozess, der einer monatelangen Expositionszeit bedarf, wohingegen Versuche auf Zellkulturniveau zeitlich begrenzt sind (Horvath et al., 2004).

4.4 Rolle der ERK 1/2 MAP-Kinase und der Src-Tyrosinkinase für die Cabergolin induzierten fibrotischen Veränderungen

4.4.1 Beteiligung der ERK 1/2 an der Cabergolin-induzierten Biosynthese der ECM

Fibrotische Veränderungen sind durch übermäßige Synthese und Anhäufung von ECM-Komponenten wie Kollagen im betroffenen Gewebe charakterisiert (Krenning et al., 2010; Uitto und Kouba, 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte die Beteiligung der 5-HT_{2A}-Rezeptoren bei der Cabergolin-induzierten Überproduktion von Kollagen in Schweineinterstitialzellen der Herzklappen demonstriert werden. Auch die Aktivierung der ERK 1/2 Signalkaskade als Folge der Stimulation der 5-HT_{2A}-Rezeptoren wurde hier gezeigt. Diese Ergebnisse lassen die Beteiligung des ERK 1/2-Signalweges am stimulierenden Effekt von Cabergolin auf die Synthese der extrazellulären Matrix vermuten. Daraus folgend sollte die Blockade der ERK-Signalwege die übermäßige Kollagensynthese, ausgelöst durch Cabergolin, vermindern. Die Cabergolin-induzierte Stimulation der Kollagensynthese in Anwesenheit des MEK 1/2-Inhibitors PD98059 war leicht gehemmt. Die Abnahme war nicht signifikant, jedoch unterstützt dieses Ergebnis die Beteiligung der ERK 1/2 Signalkaskaden an der ECM-Produktion. Der stimulierende Effekt auf die Kollagenproduktion von Cabergolin wurde in der Anwesenheit von U0126 fast vollständig gehemmt (Daten nicht präsentiert). Beide Substanzen U0126 und PD98059 sind selektive und kompetitive Hemmstoffe der MEK 1/2, die ihrerseits die ERK 1/2 Kinasen phosphorylieren und aktivieren (Alessi et al., 1995; Dudley et al., 1995; Favata et al., 1998). Die Unterschiede im Ausmaß der Hemmeffekte bei der Vorbehandlung mit PD98059 und U0126 lassen sich durch die Affinität beider Hemmstoffe erklären. An der konstitutiv aktiven rekombinanten MEK zeigte U0126 eine 100-fach höhere Affinität als PD98059 (Favata et al., 1998). Außerdem unterscheidet sich die Hemmwirkung von U0126 und PD98059 hinsichtlich des pharmakologischen Mechanismus.

Übereinstimmend mit der vorliegenden Untersuchung wurde eine Beteiligung der ERK 1/2-Subgruppe der MAPK an anderen experimentellen Fibrosemodellen gezeigt, wie die pulmonale Fibrose und die hypertrophe Kardiomyopathie (Galuppo et al., 2011; Muchir et al., 2010; Yue et al., 2000).

Die stimulierende Wirkung der aktivierten ERK 1/2-Kinasen auf die ECM-Biosynthese ist möglicherweise an einer gegenseitigen Aktivierung „cross-talk“ zwischen dem TGF- β 1-Signalweg und ERK 1/2 zurückzuführen (Jiang et al., 2010; Li et al., 2009). Grewal

et al. (1999) zeigten, dass die Stimulation des 5-HT_{2A}-Rezeptors in Mesangiumzellen eine ERK 1/2-abhängige Erhöhung der TGF-β1 mRNA Expression zur Folge hat. Die Aktivierung des TGF-β1-Rezeptors führt zur Phosphorylierung der nachgeschalteten Smad 2 und Smad 3 Proteine, die wiederum an Smad 4 unter der Ausbildung eines Komplexes binden. Der Smad4 Komplex wandert in den Zellkern und reguliert die Gentranskription (Massaous und Hata, 1997). TGF-β1 ist bekannt als Hauptmediator fibrotischer Prozesse und führt zur Proliferation von Fibroblasten und zur Akkumulation von ECM-Komponenten (Ignotz und Massagué, 1986; Lijnen et al., 2000; Verrecchia und Mauviel, 2002; Waltenberger et al., 1993). TGF-β1 bewirkt eine Erhöhung der Kollagen- und Glykosaminoglykan-Biosynthese in Interstitialzellen aus der Aortenklappe vom Schaf (Jian et al., 2002).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Cabergolin induzierte Erhöhung der ECM-Biosynthese über 5-HT_{2A}-Rezeptoren und nachfolgende Aktivierung der ERK 1/2 Signalkaskade vermittelt werden kann. Ob der Effekt der ERK Signalkaskade gänzlich an der darauffolgenden TGF-β1 Induktion zurückzuführen ist oder auch andere Mechanismen die ECM-Produktion regulieren, bedarf weiterer Untersuchungen.

4.4.2 Rolle der Src-Kinasefamilie für die Cabergolin-induzierte Biosynthese der ECM

Bisherige Daten, sowie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass 5-HT_{2A}-Rezeptoren an der Überproduktion von Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) in Interstitialzellen der Herzklappen beteiligt sind (Balachandran et al., 2011), (Kap. 3.5.). Es ist bekannt, dass 5-HT_{2A}-Rezeptoren die Src-Tyrosinkinase-Signalwege aktivieren können (Lu et al., 2008), (Kap. 1.4.3). Dies stellt die Frage, ob eine Signalübertragung durch aktivierte Src-Proteine an der Cabergolin-induzierten Überproduktion von ECM-Komponenten wie Kollagen beteiligt ist.

Ferner ist bekannt, dass Src-Kinasen für die Aktivierung der ERK 1/2 Signalkaskade im Rahmen der 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Rezeptor-vermittelten Signalweiterleitung notwendig sind, da eine Ausschaltung der Src-Signalwege durch selektiven Antagonismus oder Antisense-RNA-Sequenzen zu einer Blockade der Serotonin-induzierten ERK-Phosphorylierung führt (Nebigil et al., 2000; Xu et al., 2002). Wie in der vorliegenden Studie gezeigt werden konnte, ist die ECM-Produktion in den Interstitialzellen der Herzklappen von der Aktivierung der ERK 1/2 Kinasen abhängig (Vgl. Kap. 4.4.1). Daher ist es vorstellbar, dass auch die Src-Tyrosinkinasen als vorgeschalteter Signalweg für die ECM-Biosynthese eine Rolle spielen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergaben, dass die Blockade der katalytischen Funktion der cSrc-Kinasen mit dem Inhibitor PP2 (Zhu et al., 1999) zu einer signifikanten Abnahme der Cabergolin-induzierten Kollagensynthese in Interstitialzellen der Herzklappen des Schweines führte. Somit konnte eine Beteiligung der cSrc-Kinasefamilie an der ECM-Biosynthese und somit an dem fibrotischen Prozess belegt werden.

Ein möglicher zugrundeliegender Mechanismus für die Teilnahme der Src-Kinasen an der erhöhten ECM-Biosynthese wäre die Steigerung der Aktivität von TGF- β 1 (Elangbam, 2010; Roth, 2007). Die Aktivierung des TGF- β 1-Rezeptors sowie die nachfolgende Signalübertragung durch die Smad 2, 3 und 4 Proteine sind bekannte Mediatoren in diversen fibrotischen Erkrankungen (Flanders, 2004, s. Kap.4.4.1).

In der Literatur wurde bereits eine Blockade der TGF- β 1-Rezeptoren durch den Src-Kinasehemmstoff PP2 beschrieben (Ungefroren et al., 2011). Die Blockade findet in einem Src-unabhängigen Mechanismus statt. Dies stellt die Frage, ob der hemmende Effekt von PP2 auf die Cabergolin-induzierte ECM-Biosynthese ausschließlich an der Src-vermittelten Blockade des TGF- β 1-Rezeptors liegt, oder ob alternative Mechanismen beteiligt sind.

4.4.3 Rolle der ERK 1/2 Kinasen und der Src-Tyrosinkinasen für die Kontraktionsmechanismen der Aortenklappe

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Cabergolin über die Stimulation der 5-HT_{2A}-Rezeptoren eine überschüssige Akkumulation der extrazellulären Matrix ECM in den Interstitialzellen der Herzklappen bewirkt. Dabei sind die Familie der Src-Tyrosinkinasen und die ERK 1/2 MAP-Kinasen an der Signalübertragung beteiligt. Weiterhin wurde untersucht, ob diese Signalwege auch andere zelluläre Prozesse beeinflussen, die im Zusammenhang mit dem fibrotischen Geschehen stehen. Wie bereits in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, löst Cabergolin Kontraktionen im Aortenklappengewebe aus. Die kontraktile Effekte wurden ebenfalls durch die Aktivierung des 5-HT_{2A}-Rezeptors vermittelt und können möglicherweise die korrekte Funktionsfähigkeit des Gewebes beeinträchtigen und damit zum pathologischen Prozess der Herzklappenfibrose beitragen (vgl. Kap. 4.2). Daher sollte untersucht werden, ob die Src-Tyrosinkinasen und die ERK-MAP-Kinasen auch an der Signalübertragung bei der Cabergolin induzierten Kontraktion im Aortenklappengewebe beteiligt sind.

Die Blockade der Aktivität der Src-Tyrosinkinasen und der nachgeschalteten Signalwege durch den selektiven Inhibitor PP2 konnte den Kontraktionseffekt von Cabergolin um die Hälfte verringern und zeigte somit die Beteiligung der Src-Tyrosinkinasen an der 5-HT_{2A}-Rezeptor vermittelten Kontraktion der Aortenklappe des Schweins. Im Gegensatz dazu wurden die kontraktile Effekte durch die Blockade der ERK 1/2-Aktivierung mit dem MEK 1/2 Inhibitor PD98059 nicht beeinflusst. Wie bereits in Kap. 4.4.1 diskutiert, verfügt PD98059 über eine geringere Affinität zu MEK bzw. über geringere hemmende Eigenschaften bezüglich der ERK 1/2 Aktivierung, als im Vergleich zu dem MEK-Inhibitor U0126. Weitere Untersuchungen mit der Substanz U0126 zeigten eine signifikante Hemmung der kontraktile Effekte von Cabergolin nach der Blockade der ERK 1/2 Aktivierung (Abb. 30) und ergaben somit, dass die ERK 1/2-Kinase ebenfalls an der, durch den 5-HT_{2A}-Rezeptor vermittelten, Kontraktion der Aortenklappe vom Schwein beteiligt ist.

Übereinstimmend mit der vorliegenden Untersuchung wurde die c-Src Gruppe der Tyrosinkinasen als ein essentieller früher Schritt bei der 5-HT_{2A}-vermittelten Kontraktion der Rattenaorta identifiziert (Lu et al., 2008). Die zytosolischen Tyrosinkinasen c-Src sind ein Mitglied der Src Familie, die überwiegend in vaskulärem Gewebe vorkommen (Oda et al., 1999). Auch eine Beteiligung der MEK/ERK Signalkaskade an den 5-HT_{2A}-Rezeptor vermittelten Kontraktionseffekten wurde bereits an der Rattenaorta und Rattenarterien mittels Organbadstudien demonstriert (Watts, 1996; 1998). Es sollte erwähnt werden, dass diese Signalübertragung teilweise unabhängig von den beiden klassischen Signalwegen der 5-HT_{2A}-Rezeptor vermittelten Kontraktion – die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und die Aktivierung von L-Typ Ca⁺⁺-Kanälen – verläuft (Florian und Watts, 1998).

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen, dass die 5-HT_{2A}-Rezeptor vermittelte Kontraktion im Herzklappengewebe über komplexe Signalübertragungsmechanismen, wie die Src-Tyrosinkinasen und die ERK 1/2 Gruppe der MAPK, verläuft. Gleichzeitig übertragen diese Kinasen Signale, die die ECM-Produktion regulieren.

4.5 Antifibrotische Wirkung von Tergurid

Die Untersuchung der Strukturwirkungsbeziehungen von Cabergolin in der vorliegenden Arbeit sowie von Pergolid aus vorherigen Studien der Arbeitsgruppe Prof. Pertz (Görnemann et al. 2008) demonstrieren, dass der Substituent in Position 6 im Ergolingrundgerüst eine wesentliche Rolle für die pharmakologischen Eigenschaften an den Serotonin-Rezeptoren vom Typ 2A und 2B spielt. Demnach führen kleine

Substituenten wie eine Methylgruppe in Position 6 zu antagonistischen Eigenschaften des Ergolinderivates an diesen Rezeptoren (s. Kap. 4.1). Im Einklang mit diesen Befunden zeigt die Ergolin-Verbindung Tergurid, die eine Methylgruppe als Substituent an dieser Position hat, ein unterschiedliches pharmakologisches Profil an den Serotonin-Rezeptoren, verglichen zu Cabergolin und Pergolid. Wie in funktionellen Studien an Schweinekoronararterien und an Rattenschwanzarterien demonstriert wurde, ist Tergurid ein Antagonist an 5-HT_{2A}-Rezeptoren (Kekewska et al., 2012; Kren et al., 2004). Abweichend von diesen Befunden, wurde Tergurid an rekombinanten humanen 5-HT_{2A}-Rezeptoren als Partialagonist charakterisiert (Newman-Tancredi et al., 2002b). Wie bereits in Kap. 4.1.1 beschrieben, lassen sich solche Abweichungen in den ermittelten pharmakologischen Eigenschaften in Experimenten an nativen Rezeptoren und an rekombinanten transfizierten Rezeptoren durch die Unterschiede in der Rezeptordichte und in der Rezeptor-Effektor-Kopplung in beiden Systemen erklären. In funktionellen Untersuchungen an nativen 5-HT_{2B}-Rezeptoren der Schweinepulmonalarterie (Jähnichen et al., 2005b; Kekewska et al., 2012) und an rekombinanten humanen 5-HT_{2B}-Rezeptoren, transfiziert in CHO-Zellen (Newman-Tancredi et al., 2002b), erwies sich Tergurid ebenfalls als Antagonist. In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese, dass die Größe der Seitenkette in der Position 6 des Ergolingrundgerüsts über die pharmakologischen Eigenschaften sowohl an den 5-HT_{2A}- als auch an den 5-HT_{2B}-Rezeptoren und somit über das Auftreten fibrotischer Nebenwirkungen bestimmt, für Cabergolin bestätigt. Auch für Tergurid wurde die Hypothese am Modell der Herzklappeninterstitialzellen überprüft. Es wurde untersucht, ob Tergurid über ein antifibrotisches Potential auf die Serotonin-induzierten frühen Merkmale der Fibrose in Interstitialzellen der Herzklappen, wie die Aktivierung der ERK-Signalwege und die Akkumulation der extrazellulären Matrix (ECM), verfügt. Die gesteigerte Aktivierung der ERK 1 und 2 Kaskaden ist mit fibrotischen Ereignissen assoziiert (Galuppo et al., 2011; Muchir et al., 2010; Xu et al., 2002) und stimuliert die Proliferation der Interstitialzellen (Kap. 3.8). Im Gegensatz zu Serotonin hatte Tergurid auch bei hohen Konzentrationen (10 µM) keinen Effekt auf die Aktivierung der ERK 1/2-Kinasen. Des Weiteren war Tergurid in der Lage, die Serotonin-induzierte Aktivierung der ERK 1/2 deutlich zu hemmen. Die überschüssige Synthese von Kollagen und anderen ECM-Bestandteilen ist ein weiteres charakteristisches Merkmal bei fibrotischen Ereignissen (Nimni, 1983; Wight und Potter-Perigo, 2011). Bei der Untersuchung der Neusynthese von Kollagen, gemessen durch den Einbau von radioaktiv markiertem L-Prolin, zeigte Tergurid keine stimulierende Wirkung und verminderte die Serotonin-

induzierte überschüssige Kollagensynthese. Diese Ergebnisse zeigen, dass Tergurid im Gegensatz zu seiner verwandten Substanz Cabergolin keine fibrotischen Eigenschaften aufweist und dem profibrotischen Effekten von Serotonin entgegenwirkt. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, wird sowohl die Aktivierung der ERK 1/2-Kinasen als auch die Anhäufung der ECM in den Interstitialzellen der Herzklappen durch Aktivierung der 5-HT_{2A}-Rezeptoren vermittelt. Basierend auf diesen Ergebnissen, ist die Blockade der 5-HT_{2A}-Rezeptoren der mögliche zugrundeliegende Mechanismus für die antifibrotischen Eigenschaften von Tergurid in Herzklappeninterstitialzellen.

Die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchung dieser Arbeit stimmen mit *in vivo* Untersuchungen der antifibrotischen Wirkung von Tergurid an anderen pathologischen Modellen überein. So reduzierte Tergurid den Kollagengehalt im Mausmodell der Hautfibrose und der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose (Dees et al., 2011; Königshoff et al., 2010). Beim Rattenmodell der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie hemmte Tergurid die Proliferation und Migration der Glattmuskelzellen der Pulmonalarterie (Dumitrascu et al., 2011). Im Modell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose führte die Blockade der 5-HT_{2A}- und der 5-HT_{2B}-Rezeptoren zur Verminderung der Kollagenexpression und des Kollagengehalts (Fabre et al., 2008). Beim Modell der Hautfibrose zeigte nur die Blockade der 5-HT_{2B}-Rezeptoren einen Einfluss auf die Kollagenexpression (Dees et al., 2011).

Die Aktivierung der 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Rezeptoren ist an der Pathogenese der Herzklappenfibrose, der Lungen-, Nieren- und Leberfibrose, sowie der pulmonalen Hypertonie beteiligt (Esteve et al., 2007; Fabre et al., 2008; Grewal et al., 1999; Königshoff et al., 2010; Launay et al., 2002; Marcos et al., 2004; Rothman et al., 2000; Ruddell et al., 2006; Welsh et al., 2004; Xu et al., 2002). Daher könnten Substanzen wie Tergurid, die über antagonistische Eigenschaften an 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Rezeptoren verfügen, möglicherweise bei der Prävention und Therapie von Serotonin-vermittelten Fibrose-Erkrankungen eingesetzt werden. So wurde für Tergurid 2007 in Europa und 2008 in den USA der Status als Orphan drug zur Behandlung der pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH) verliehen (European Medicines Agency, 2007; Frumkin, 2012). Die antifibrotischen Eigenschaften von Tergurid, erfasst im Modell der Herzklappeninterstitialzellen, bestätigen die Hypothese, dass die Seitenkette in Position 6 der Ergoline eine entscheidende Rolle für die fibrotischen Nebenwirkungen spielt.

4.6 Ausblick

Der Wachstumsfaktor TGF- β 1 ist ein gut bekannter Induktor der Fibrose verschiedener Organe, einschließlich der Herzklappenfibrose (Flanders, 2004; Khan und Sheppard, 2006; Lijnen et al., 2000). Es ist bekannt, dass Serotonin die Expression und die Freisetzung von TGF- β 1 in Herzklappeninterstitialzellen erhöht (Jian et al., 2002). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass die Serotonin-induzierte Überproduktion der ECM über TGF- β 1 vermittelt wird (Dees et al., 2011; Jian et al., 2002). Entsprechende Untersuchungen für Cabergolin sind bis jetzt nicht durchgeführt worden und würden die Aufklärung der molekularen Mechanismen der Cabergolin-induzierten Herzklappenfibrose sinnvoll ergänzen.

Die Interstitialzellen erhalten Informationen über die Zusammensetzung der ECM und bauen diese um (remodeling). Dabei setzen die VICs ECM-Abbauenzyme, wie die Matrix-Metalloproteasen (MMPs), sowie deren endogenen Inhibitoren TIMPs frei (Dreger et al., 2002). Bei pathologischen Remodeling-Prozessen der ECM, wie bei der Aortenstenose und bei Läsionen der Herzklappen, wurde ein verändertes Profil der MMPs-Enzymexpression und Enzymaktivität festgestellt (Fondard et al., 2005; Kaden et al., 2004; Soini et al., 2001). Auch das Gleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs wurde zur Hemmung der MMPs verschoben und führte zur vermehrten Akkumulation der ECM (Fielitz et al., 2004; Rabkin et al., 2001). Daher wäre es von Interesse zu untersuchen, ob Cabergolin eine Auswirkung auf die Expression und das Gleichgewicht der MMPs und TIMPs hat.

Die Oberfläche der Herzklappen ist bekleidet von Endothelzellen (Valvular endothelial cells VECs), die analog zu den Endothelzellen an den Blutgefäßen die Thrombozytenaggregation verhindern (Butcher et al., 2004). Darüber hinaus befinden sich die VECs in ständiger Interaktion mit den VICs sowie mit der hämodynamischen und mechanischen Umgebung und beeinflussen den Phänotyp und die Proliferation der Interstitialzellen sowie deren synthetischen Eigenschaften (Butcher und Nerem, 2006). Eine Schädigung der Endothelschicht wurde in Herzklappenerkrankungen wie Herzklappenstenose- und -kalzifizierung gefunden (Butcher und Nerem, 2006; Matsumoto et al., 2009; Tao et al., 2012). Um ein vollständiges Bild des zustande kommenden pathologischen Geschehens der Herzklappenfibrose zu erhalten, sollten die Herzklappenendothelzellen in weiteren Untersuchungen der Cabergolin-induzierten Herzklappenfibrose miteinbezogen werden.

Klinische Studien und Berichte zeigten einen Zusammenhang zwischen fibrotischen Nebenwirkungen an den Herzklappen und der Anwendung von Ergotalkaloid- und Amphetaminderivaten. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass weitere Substanzklassen ebenfalls fibrotische Veränderungen an den Herzklappen verursachen könnten, wäre die Untersuchung der pharmakologischen Eigenschaften neuer potentieller Pharmaka an den 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Rezeptoren sehr wünschenswert, um schwerwiegende Nebenwirkungen zu vermeiden.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Mechanismen der Nebenwirkungen von Cabergolin und anderen Vertretern der Ergoline zu untersuchen, die zu fibrotischen Veränderungen der Herzklappen führen. Herzklappenfibrosen treten insbesondere bei der Therapie von M. Parkinson auf und führen zu Regurgitationen am Herzen und im weiteren Verlauf zu einer Herzinsuffizienz. Für die betroffenen Patienten bleibt als einzige Therapiemöglichkeit derzeit der chirurgische Ersatz der geschädigten Herzklappen durch künstliche Herzklappen. Solche pathologische Veränderungen wurden auch im Zusammenhang mit anderen Beeinflussungen des serotonergen Systems beobachtet, wie der Anwendung von Appetitzüglern mit Amphetamin-Struktur wie z.B. Fenfluramin oder beim Karzinoid-Syndrom, einer Tumorerkrankung mit übermäßig erhöhtem Serotonin-Plasmaspiegel.

Nachdem in einer früheren Veröffentlichung der Arbeitsgruppe Prof. Pertz die pharmakophore Struktur des Ergolins Pergolid identifiziert wurde, die für den Agonismus an 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Rezeptoren verantwortlich ist, wurden im ersten Teil der vorliegenden Arbeit die pharmakologischen Eigenschaften am 5-HT_{2A}- sowie am 5-HT_{2B}-Rezeptor von Cabergolin und seiner an der Position 6 modifizierten Derivate mithilfe von funktionellen Organbadstudien erfasst. Es konnte gezeigt werden, dass die Größe der Seitenkette in Position 6 des Cabergolinmoleküls über die pharmakologischen Eigenschaften an diesen Rezeptoren bestimmt. Cabergolin sowie die Derivate mit voluminöseren Substituenten verhielten sich wie Agonisten oder potente Partialagonisten, wohingegen Derivate mit kleinen Substituenten wie 6-Methylcabergolin zu Antagonismus an beiden Rezeptoren führten. Eine [³⁵S]GTPγS-Bindungs-Studie bewies, dass 6-Methylcabergolin die gewünschten pharmakologischen Eigenschaften an den D_{2L}- und D_{2S}-Rezeptoren beibehielt.

In weiteren Organbadstudien konnte gezeigt werden, dass Cabergolin oder 5-HT Kontraktionen an isolierten Aortenklappensegeln des Schweins auslösen. Um die Beteiligung der verschiedenen 5-HT-Rezeptortypen an diesem Effekt von Cabergolin zu untersuchen, wurden Experimente mit selektiver Rezeptorblockade durchgeführt. Dabei konnte eine Beteiligung des 5-HT_{2A}-Rezeptors an den kontraktile Effekten in diesem Gewebe gezeigt werden, nicht jedoch eine Beteiligung von 5-HT_{2B}- und 5-HT_{1B}-Rezeptoren. Die Cabergolin-induzierte Kontraktion der Aortenklappensegel konnte durch Inhibitoren der ERK 1/2 Kinasen und der Src-Tyrosinkinasen gehemmt werden

und zeigte somit eine Beteiligung beider intrazellulärer Signalwege. Da eine Beeinträchtigung der korrekten Form und Funktionsfähigkeit intakter Herzklappen durch die direkten kontraktile Effekte von 5-HT bereits in der Literatur gezeigt wurde, legt die vorliegende Arbeit die Vermutung nahe, dass die mechanischen Effekte von Cabergolin Teil des pathologischen Mechanismus sind.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Interstitialzellen (VICs) der Aorten- und Mitralklappe des Schweins isoliert. Die VICs sind für die Synthese und Umbau der ECM in den Herzklappen verantwortlich. Eine übermäßige Akkumulation von ECM-Komponenten wie Kollagen und Glykosaminoglykan, sowie eine erhöhte Proliferationsrate der VICs sind charakteristische Merkmale fibrotischer Veränderungen. Eine Inkubation der VICs mit Cabergolin oder 5-HT führte, wie erwartet, zu einer erhöhten Biosynthese von Kollagen und Glykosaminoglykan. Dieser stimulierende Effekt von Cabergolin war konzentrationsabhängig.

Während einige Veröffentlichungen zu Serotonin- und Fenfluramin-induzierten fibrotischen Veränderungen eine Beteiligung des 5-HT_{2B}-Rezeptors nahelegen, zeigten die Experimente mit selektiver Rezeptorblockade und Rezeptoraktivierung in dieser Arbeit, dass zumindest die stimulierenden Effekte auf die ECM nicht durch 5-HT_{1B}- oder 5-HT_{2B}-Rezeptoren, sondern durch 5-HT_{2A}-Rezeptoren vermittelt werden.

Ein vollständiges Ausbleiben der erhöhten Biosynthese durch 5-HT_{2A}-Rezeptorblockade konnte nicht erreicht werden. Das deutet auf einen oder mehrere zusätzliche alternative Stimulationsmechanismen hin.

Bei der serotonergen Stimulation der ECM-Synthese wird durch die Aktivierung der Src-Tyrosinkinasen das Signal vom Rezeptor übertragen. Obwohl 6-Methylcabergolin sich als ein 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Antagonist erwiesen hatte, zeigte die Substanz trotzdem einen stimulierenden Effekt auf die ECM-Synthese. Das deckt sich mit der Vermutung, dass zusätzliche Mechanismen an der Entstehung einer Herzklappenfibrose beteiligt sind, da die Wirkung von 6-Methylcabergolin deutlich schwächer als im Vergleich zu Cabergolin ausfiel.

Cabergolin führte zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der Phosphorylierung der ERK 1/2 Kinasen. Die Aktivierung der ERK-Signalwege ist ein früher Schritt bei fibrotischen Prozessen der Herzklappen und wird durch 5-HT_{2A}- und 5-HT_{1B}-Rezeptoren in den VICs vermittelt. Die Proliferationsrate der VICs wurde durch eine Inkubation mit Cabergolin oder 5-HT erhöht. Der Zusatz eines Hemmstoffs der ERK 1/2 Aktivierung verhinderte die Zunahme der Proliferation. Dies zeigt, dass die mitogenen Signale von Serotonin in den VICs durch ERK 1/2 Kinasen übertragen werden.

Tergurid ist ein weiterer Vertreter der Ergoline, der bis jetzt nicht mit Valvulopathien assoziiert wurde. Die Verbindung war von besonderem Interesse, da sie eine Methylgruppe als Substituent in Position 6 besitzt und über antagonistische Eigenschaften an den 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Rezeptoren verfügt. Mit Tergurid wurde in Koinkubationsstudien die profibrotische Wirkung von Serotonin hinsichtlich der Aktivierung der ERK 1/2 Signalwege und der Kollagenbiosynthese reduziert. Auch diese Untersuchung bestätigt die Hypothese, dass die Seitenkette in Position 6 des Ergolin-Grundgerüsts eine zentrale Bedeutung für die pharmakologischen Eigenschaften am 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Rezeptor und damit für die fibrotischen Veränderungen an den Herzklappen hat.

In der Literatur wird zwar die Aktivierung der 5-HT_{2B}-Rezeptoren als die primäre Ursache für die Arzneimittel-induzierten Valvulopathien betrachtet. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass auch der 5-HT_{2A}-Rezeptortyp ein fibrotisches Potential hat. Darüber hinaus zeigte die Untersuchung der Cabergolin-induzierten frühen fibrotischen Veränderungen in VICs, dass es weitere Mechanismen geben muss, über die Ergoline eine Herzklappenfibrose auslösen können.

6 Summary

The aim of this study was to examine the side effect mechanisms of cabergoline and other ergoline compounds that cause fibrotic changes in heart valves. Heart valve fibrosis occurs during treatment of Parkinson's disease and may cause regurgitation and even heart failure. To this date, surgical replacement with artificial valves is the only long term treatment option for patients with diseased heart valves. These pathological changes were observed in association with other influences on the serotonergic system such as the use of appetite suppressants like fenfluramine and with the carcinoid syndrome, a tumour disorder causing high serotonin plasma levels.

The molecular fragment of pergolide responsible for its agonism at the 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptors was identified in a previous study by the group of Prof. Pertz. In the initial part of the present study, the pharmacological properties of cabergoline and its derivatives with modified N(6)-substituents were determined both at 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptors using functional organ bath assays. It has been shown that the size of the side chain at N(6) in the molecule of cabergoline plays a crucial role for its pharmacological properties at these receptors. Cabergoline and its derivatives with bulky moieties behaved as agonists or high potency partial agonists, whereas derivatives with smaller moieties such as 6-methylcabergoline led to antagonism with both receptors. 6-Methylcabergoline retained the desired pharmacological properties at D_{2L} and D_{2S} receptors relative to cabergoline as shown in a [³⁵S]GTPγS-binding assay. Further organ bath assays demonstrated that cabergoline or 5-HT induce contractions in isolated porcine aortic valves. Experiments with selective receptor inhibition were performed in order to determine the 5-HT-receptor type involved in the contractile effect of cabergoline. The 5-HT_{2A} receptor but not the 5-HT_{1B} or 5-HT_{2B} receptors, was shown to participate in this effect. Cabergoline-induced contraction of aortic valve cusps was reduced in the presence of selective inhibitors of Erk 1/2 kinase and Src-tyrosine-kinase, which showed the involvement of both intracellular signalling pathways. It has been demonstrated by others that the contractile effects of 5-HT lead to functional impairment and changes in the correct geometry of the valves. Thus the present study suggests a participation of the mechanical effects of cabergoline in the pathological mechanism.

In the second part of this study, interstitial cells (VICs) were isolated from aortic and mitral porcine valves. VICs are responsible for the production and turnover of the ECM

in heart valves. An excessive accumulation of ECM components such as collagen and glycosaminoglycan and high proliferation of VICs are a hallmark pathological feature of fibrosis. As expected when incubated with cabergoline or 5-HT the biological synthesis of collagen and glycosaminoglycan in VICs was increased. The stimulatory effect of cabergoline was concentration-dependent.

While some publications dealing with the fibrotic changes induced by serotonin and fenfluramine point out the involvement of the 5-HT_{2B} receptor, in this research experiments carried out with selective receptor inhibition and activation, indicate that at least the stimulatory effect on the ECM is mediated neither by 5-HT_{1B} nor by 5-HT_{2B} receptor, but by 5-HT_{2A} receptors. However, the blockade of the 5-HT_{2A} receptor failed to induce a total decrease in elevated ECM biosynthesis. This suggests the presence of one or more additional alternative mechanisms of stimulation.

The transmission of the signal from the receptor was mediated by activation of the Src-tyrosine kinase during the serotonergic stimulation of the ECM synthesis by 5-HT. Although 6-methylcabergoline acted as an antagonist at 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptors it showed a stimulatory effect on ECM synthesis. This is in good agreement with the suggestion of one or more additional mechanisms that must be present for the occurrence of heart valve fibrosis given that the effect of 6-methylcabergoline appeared to be less pronounced compared to cabergoline.

Cabergoline increased the phosphorylation of the Erk 1/2 kinases in a concentration-dependent manner. The Erk 1/2 activation is an early step in fibrosis and was mediated by 5-HT_{2A} and 5-HT_{1B} receptors. The proliferation rate of VICs was increased after incubation with cabergoline or 5-HT. The addition of an inhibitor of the Erk 1/2 activation prevented the increase of the proliferation. This shows that in VICs the mitogenic signaling of serotonin is mediated by Erk 1/2 kinases.

Terguride is another ergoline compound that has so far not been linked to valvulopathy. This compound was of special interest, as it possesses a methyl substituent at N(6) and an antagonistic activity at the 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptors. In co-administration studies, terguride was capable of reducing the fibrotic effects of 5-HT in terms of activation of Erk 1/2 kinases and synthesis of collagen. This effect of terguride in VICs also confirmed the hypothesis of a crucial role of the moiety at position 6 in the ergoline skeleton for the pharmacological properties at 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptors and thus for fibrotic heart valve disease.

In literature, activation of 5-HT_{2B} receptors is considered to be the main cause for drug-induced valvulopathy; nevertheless, the fibrotic potential of 5-HT_{2A} receptor activation

has clearly been demonstrated in the present study. Moreover, this study on cabergoline-induced early fibrotic changes in VICs shows that other mechanisms of development of heart valve fibrosis by ergolines may exist.

Literaturverzeichnis

- Abenheim L, Moride Y, Brenot F, Rich S, Benichou J, et al. (1996) Appetite-suppressant drugs and the risk of primary pulmonary hypertension. International primary pulmonary hypertension study group. *N. Engl. J. Med.* **335**:609-616.
- Adachi M, Fukuda M, Nishida E (1999) Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer. *EMBO J.* **18**:5347-5358.
- Agarwal P, Fahn S, Frucht SJ (2004) Diagnosis and management of pergolide-induced fibrosis. *Mov. Disord.* **19**:699-704.
- Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR (1995) PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **270**:27489-27494.
- Andersohn F, Garbe E (2009) Cardiac and noncardiac fibrotic reactions caused by ergot- and nonergot-derived dopamine agonists. *Mov. Disord.* **24**:129-133.
- Andreotti AC, Pianezzola E, Persiani S, Pacciarini MA, Strolin Benedetti M, et al. (1995) Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerability of cabergoline, a prolactin-lowering drug, after administration of increasing oral doses (0.5, 1.0, and 1.5 milligrams) in healthy male volunteers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**:841-845.
- Antonini A, Poewe W (2007) Fibrotic heart-valve reactions to dopamine-agonist treatment in Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* **6**:826-829.
- Antoniou SA (2011) Terguride for pulmonary arterial hypertension. *Expert Opin. Ther. Targets* **15**:1333-1335.
- Balachandran K, Hussain S, Yap C-H, Padala M, Chester AH, et al. (2011) Elevated cyclic stretch and serotonin result in altered aortic valve remodeling via a mechanosensitive 5-HT_{2A} receptor-dependent pathway. *Cardiovasc. Pathol.* **21**:206-213.
- Barnes NM, Sharp T (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* **38**:1083-1152.
- Barzilla JE, Acevedo FE, Grande-Allen KJ (2010) Organ culture as a tool to identify early mechanisms of serotonergic valve disease. *J. Heart Valve Dis.* **19**:626-635.
- Battaglia R, Strolin Benedetti M, Mantegani S, Castelli MG, Cocchiara G, et al. (1993) Disposition and urinary metabolic pattern of cabergoline, a potent dopaminergic agonist, in rat, monkey and man. *Xenobiotica* **23**:1377-1389.
- Baumann MH, Ayestas MA, Dersch CM, Brockington A, Rice KC, et al. (2000) Effects of phentermine and fenfluramine on extracellular dopamine and serotonin in rat nucleus accumbens: therapeutic implications. *Synapse* **36**:102-113.
- Bax WA, Renzenbrink GJ, Van Heuven-Nolsen D, Thijssen EJ, Bos E, et al. (1993) 5-HT receptors mediating contractions of the isolated human coronary artery. *Eur. J. Pharmacol.* **239**:203-210.
- Beattie DT, Smith JA (2008) Serotonin pharmacology in the gastrointestinal tract: a review. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **377**:181-203.
- Ben-Jonathan N, Hnasko R (2001) Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr. Rev.* **22**:724-763.
- Berg KA, Maayani S, Goldfarb J, Scaramellini C, Leff P, et al. (1998) Effector pathway-dependent relative efficacy at serotonin type 2A and 2C receptors: evidence for agonist-directed trafficking of receptor stimulus. *Mol. Pharmacol.* **54**:94-104.
- Berger M, Gray JA, Roth BL (2009) The expanded biology of serotonin. *Annu. Rev. Med.* **60**:355-366.
- Bernheim AM, Connolly HM, Hobday TJ, Abel MD, Pellikka PA (2007) Carcinoid heart disease. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **49**:439-451.
- Bertrand A, Marec-Berard P, Raverot G, Trouillas J, Marabelle A (2010) Cabergoline therapy of paraneoplastic cushing syndrome in children. *Pediatr. Blood Cancer* **55**:590-591.

- Bhattacharyya S, Davar J, Dreyfus G, Caplin ME (2007) Carcinoid heart disease. *Circulation* **116**:2860-2865.
- Bhattacharyya S, Schapira AH, Mikhailidis DP, Davar J (2009) Drug-induced fibrotic valvular heart disease. *Lancet* **374**:577-585.
- Bhattacharyya S, Toumpanakis C, Chilkunda D, Caplin ME, Davar J (2011) Risk factors for the development and progression of carcinoid heart disease. *Am. J. Cardiol.* **107**:1221-1226.
- Bischoff J, Aikawa E (2011) Progenitor cells confer plasticity to cardiac valve endothelium. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* **4**:710-719.
- Blevins TL, Peterson SB, Lee EL, Bailey AM, Frederick JD, et al. (2008) Mitral valvular interstitial cells demonstrate regional, adhesional, and synthetic heterogeneity. *Cells Tissues Organs* **187**:113-122.
- Boguszewski CL, dos Santos CM, Sakamoto KS, Marini LC, de Souza AM, et al. (2012) A comparison of cabergoline and bromocriptine on the risk of valvular heart disease in patients with prolactinomas. *Pituitary* **15**:44-49.
- Borin C, Vanhercke D, Weyns A (2006) Innervation of the atrioventricular and semi-lunar heart valves: a review. *Acta Cardiol.* **61**:463-469.
- Boudes A, Lavoute C, Avierinos J-F, Le Dolley Y, Villacampa C, et al. (2011) Valvular heart disease associated with benfluorex therapy: high prevalence in patients with unexplained restrictive valvular heart disease. *Eur. J. Echocardiogr.* **12**:688-695.
- Boutet K, Frachon I, Jobic Y, Gut-Gobert C, Leroyer C, et al. (2009) Fenfluramine-like cardiovascular side-effects of benfluorex. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **33**:684-688.
- Bowler JV, Ormerod IE, Legg NJ (1986) Retroperitoneal fibrosis and bromocriptine. *Lancet* **2**:466.
- Bracco F, Battaglia A, Chouza C, Dupont E, Gershanik O, et al. (2004) The long-acting dopamine receptor agonist cabergoline in early Parkinson's disease: final results of a 5-year, double-blind, levodopa-controlled study. *CNS Drugs* **18**:733-746.
- Brand NJ, Roy A, Hoare G, Chester A, Yacoub MH (2006) Cultured interstitial cells from human heart valves express both specific skeletal muscle and non-muscle markers. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**:30-42.
- Bryant HU, Nelson DL, Button D, Cole HW, Baez MB, et al. (1996) A novel class of 5-HT_{2A} receptor antagonists: aryl aminoguanidines. *Life Sci.* **59**:1259-1268.
- Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (2008) Rote-Hand-Brief zu Cabergolin und Pergolid
- Butcher JT, Penrod AM, García AJ, Nerem RM (2004) Unique morphology and focal adhesion development of valvular endothelial cells in static and fluid flow environments. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**:1429-1434.
- Butcher JT, Nerem RM (2006) Valvular endothelial cells regulate the phenotype of interstitial cells in co-culture: effects of steady shear stress. *Tissue Eng.* **12**:905-915.
- Butcher JT, Mahler GJ, Hockaday LA (2011) Aortic valve disease and treatment: the need for naturally engineered solutions. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**:242-268.
- Carabello BA, Crawford FA (1997) Valvular heart disease. *N. Engl. J. Med.* **337**:32-41.
- Chang F, Steelman LS, Shelton JG, Lee JT, Navolanic PM, et al. (2003) Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review). *Int. J. Oncol.* **22**:469-480.
- Chang L, Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**:37-40.
- Chester AH, Misfeld M, Yacoub MH (2000) Receptor-mediated contraction of aortic valve leaflets. *J. Heart Valve Dis.* **9**:250-254; discussion 254-255.
- Chester AH, Misfeld M, Sievers HH, Yacoub MH (2001) Influence of 5-hydroxytryptamine on aortic valve competence in vitro. *J. Heart Valve Dis.* **10**:822-825; discussion 825-826.
- Ciccarelli E, Camanni F (1996) Diagnosis and drug therapy of prolactinoma. *Drugs* **51**:954-965.
- Cimini M, Rogers K, Boughner D (2003) Smoothelin-positive cells in human and porcine semilunar valves. *Histochem. Cell Biol.* **120**:307-317.

- Cocchiara G, Benedetti MS (1992) Excretion balance and urinary metabolic pattern of [3H]cabergoline in man. *Drug Metabol. Drug Interact.* **10**:199-211.
- Colao A, Di Sarno A, Landi ML, Cirillo S, Sarnacchiaro F, et al. (1997) Long-term and low-dose treatment with cabergoline induces macroprolactinoma shrinkage. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**:3574-3579.
- Colao A, Lombardi G (1998) Growth-hormone and prolactin excess. *Lancet* **352**:1455-1461.
- Colao A, Somma Cd, Lombardi G, Pivonello R, Sarno Ad (2002) Dopamine receptor agonists for treating prolactinomas. *Expert Opin. Investig. Drugs* **11**:787-800.
- Colao A, Galderisi M, Di Sarno A, Pardo M, Gaccione M, et al. (2008) Increased prevalence of tricuspid regurgitation in patients with prolactinomas chronically treated with cabergoline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**:3777-3784.
- Cole WG, Chan D, Hickey AJ, Wilcken DE (1984) Collagen composition of normal and myxomatous human mitral heart valves. *Biochem. J.* **219**:451-460.
- Conn PJ, Sanders-Bush E, Hoffman BJ, Hartig PR (1986) A unique serotonin receptor in choroid plexus is linked to phosphatidylinositol turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**:4086-4088.
- Connolly HM, Crary JL, McGoon MD, Hensrud DD, Edwards BS, et al. (1997) Valvular heart disease associated with fenfluramine-phentermine. *N. Engl. J. Med.* **337**:581-588.
- Connolly HM, McGoon MD (1999) Obesity drugs and the heart. *Curr. Probl. Cardiol.* **24**:745-792.
- Connolly JM, Bakay MA, Fulmer JT, Gorman RC, Gorman Iii JH, et al. (2009) Fenfluramine disrupts the mitral valve interstitial cell response to serotonin. *Am. J. Pathol.* **175**:988-997.
- Cushing DJ, Cohen ML (1992) Comparison of the serotonin receptors that mediate smooth muscle contraction in canine and porcine coronary artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **261**:856-862.
- Cushing DJ, Cohen ML (1993) Serotonin-induced contraction in porcine coronary artery: use of ergolines to support vascular 5-hydroxytryptamine₂-receptor heterogeneity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **264**:193-200.
- Cushing MC, Liao J-T, Anseth KS (2005) Activation of valvular interstitial cells is mediated by transforming growth factor- β 1 interactions with matrix molecules. *Matrix Biol.* **24**:428-437.
- Dallabonzana D, Liuzzi A, Oppizzi G, Cozzi R, Verde G, et al. (1986) Chronic treatment of pathological hyperprolactinemia and acromegaly with the new ergot derivative terguride. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **63**:1002-1007.
- Daub H, Ulrich Weiss F, Wallasch C, Ullrich A (1996) Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* **379**:557-560.
- De Clerck F, Xhonneux B, Leysen J, Janssen PAJ (1984) Evidence for functional 5-HT₂ receptor sites on human blood platelets. *Biochem. Pharmacol.* **33**:2807-2811.
- De Mei C, Ramos M, Iitaka C, Borrelli E (2009) Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D₂ receptors. *Curr. Opin. Pharmacol.* **9**:53-58.
- de Rijk MC, Launer LJ, Berger K, Breteler MM, Dartigues JF, et al. (2000) Prevalence of Parkinson's disease in Europe: a collaborative study of population-based cohorts. Neurologic diseases in the elderly research group. *Neurology* **54**:S21-23.
- Dees C, Akhmetshina A, Zerr P, Reich N, Palumbo K, et al. (2011) Platelet-derived serotonin links vascular disease and tissue fibrosis. *J. Exp. Med.* **208**:961-972.
- Demonet JF, Rostin M, Dueymes JM, Ioualalen A, Montastruc JL, et al. (1986) Retroperitoneal fibrosis and treatment of Parkinson's disease with high doses of bromocriptine. *Clin. Neuropharmacol.* **9**:200-201.
- Detaint D, Messika-Zeitoun D, Maalouf J, Tribouilloy C, Mahoney DW, et al. (2008) Quantitative echocardiographic determinants of clinical outcome in asymptomatic patients with aortic regurgitation: a prospective study. *JACC: Cardiovasc. Imaging* **1**:1-11.
- Di Luzio S, Rigolin VH (2000) Carcinoid heart disease. *Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med.* **2**:399-406.

- Di Marco A, Appiah-Kubi LS, Chaudhuri KR (2002) Use of the dopamine agonist cabergoline in the treatment of movement disorders. *Expert Opin. Pharmacother.* **3**:1481-1487.
- Discher DE, Janmey P, Wang YL (2005) Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* **310**:1139-1143.
- Dodick DW, Martin VT, Smith T, Silberstein S (2004) Cardiovascular tolerability and safety of triptans: a review of clinical data. *Headache* **44**:S20-S30.
- Donnelly KB (2008) Cardiac valvular pathology: comparative pathology and animal models of acquired cardiac valvular diseases. *Toxicol. Pathol.* **36**:204-217.
- Dourish CT (1995) Multiple serotonin receptors: opportunities for new treatments for obesity? *Obes. Res.* **3 Suppl 4**:449S-462S.
- Dreger SA, Taylor PM, Allen SP, Yacoub MH (2002) Profile and localization of matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in human heart valves. *J. Heart Valve Dis.* **11**:875-880; discussion 880.
- Droogmans S, Cosyns B, D'haenen H, Creten E, Weytjens C, et al. (2007a) Possible association between 3,4-methylenedioxymethamphetamine abuse and valvular heart disease. *Am. J. Cardiol.* **100**:1442-1445.
- Droogmans S, Franken PR, Garbar C, Weytjens C, Cosyns B, et al. (2007b) In vivo model of drug-induced valvular heart disease in rats: pergolide-induced valvular heart disease demonstrated with echocardiography and correlation with pathology. *Eur. Heart J.* **28**:2156-2162.
- Droogmans S, Cosyns B, Van Camp G (2011) Benfluorex: the last chapter of drug-induced valvular heart disease? *Eur. J. Echocardiogr.* **12**:263-264.
- Du WM, Miao CY, Liu JG, Shen FM, Yang XQ, et al. (2003) Effects of long-term treatment with ketanserin on blood pressure variability and end-organ damage in spontaneously hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **41**:233-239.
- Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR (1995) A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**:7686-7689.
- Dumitrascu R, Kulcke C, Königshoff M, Kouri F, Yang X, et al. (2011) Terguride ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Eur. Respir. J.* **37**:1104-1118.
- Duxon MS, Flanigan TP, Reavley AC, Baxter GS, Blackburn TP, et al. (1997) Evidence for expression of the 5-hydroxytryptamine-2B receptor protein in the rat central nervous system. *Neuroscience* **76**:323-329.
- El-Hamamsy I, Yacoub MH, Chester AH (2009) Neuronal regulation of aortic valve cusps. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **7**:40-46.
- Elangbam CS (2010) Drug-induced valvulopathy: an update. *Toxicol. Pathol.* **38**:837-848.
- Ellis ES, Byrne C, Murphy OE, Tilford NS, Baxter GS (1995) Mediation by 5-hydroxytryptamine_{2B} receptors of endothelium-dependent relaxation in rat jugular vein. *Br. J. Pharmacol.* **114**:400-404.
- Emilien G, Maloteaux J-M, Geurts M, Hoogenberg K, Cragg S (1999) Dopamine receptors—physiological understanding to therapeutic intervention potential. *Pharmacol. Ther.* **84**:133-156.
- Enriquez-Sarano M, Avierinos J-F, Messika-Zeitoun D, Detaint D, Capps M, et al. (2005) Quantitative determinants of the outcome of asymptomatic mitral regurgitation. *N. Engl. J. Med.* **352**:875-883.
- Esteve JM, Launay JM, Kellermann O, Maroteaux L (2007) Functions of serotonin in hypoxic pulmonary vascular remodeling. *Cell Biochem. Biophys.* **47**:33-43.
- European Medicines Agency (2007) Public summary of positive opinion for orphan designation of terguride for the treatment of pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension.
- European Medicines Agency (2008) Questions and answers on the review of the ergot-derived dopamine agonists.

- Fabre A, Marchal-Sommé J, Marchand-Adam S, Quesnel C, Borie R, et al. (2008) Modulation of bleomycin-induced lung fibrosis by serotonin receptor antagonists in mice. *Eur. Respir. J.* **32**:426-436.
- Fanburg BL, Lee SL (1997) A new role for an old molecule: serotonin as a mitogen. *Am. J. Physiol.* **272**:L795-L806.
- Fariello R (1998) Pharmacodynamic and pharmacokinetic features of cabergoline: rationale for use in parkinson's disease. *Drugs* **55**:10-16.
- Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, et al. (1998) Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J. Biol. Chem.* **273**:18623-18632.
- Felder CC, Kanterman RY, Ma AL, Axelrod J (1990) Serotonin stimulates phospholipase A2 and the release of arachidonic acid in hippocampal neurons by a type 2 serotonin receptor that is independent of inositolphospholipid hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**:2187-2191.
- Fielitz J, Leuschner M, Zurbrugg HR, Hannack B, Pregla R, et al. (2004) Regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors in the left ventricular myocardium of patients with aortic stenosis. *J. Mo.l Med. (Berl)*. **82**:809-820.
- Filip DA, Radu A, Simionescu M (1986) Interstitial cells of the heart valves possess characteristics similar to smooth muscle cells. *Circ. Res.* **59**:310-320.
- Fishman AP (1999) Aminorex to Fen/Phen. *Circulation* **99**:156-161.
- Fitzgerald LW, Burn TC, Brown BS, Patterson JP, Corjay MH, et al. (2000) Possible role of valvular serotonin 5-HT2B receptors in the cardiopathy associated with fenfluramine. *Mol. Pharmacol.* **57**:75-81.
- Flanders KC (2004) Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *Int. J. Exp. Pathol.* **85**:47-64.
- Florian JA, Watts SW (1998) Integration of mitogen-activated protein kinase activation in vascular 5-hydroxytryptamine2A receptor signal transduction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **284**:346-355.
- Fondard O, Detaint D, lung B, Choqueux C, Adle-Biassette H, et al. (2005) Extracellular matrix remodelling in human aortic valve disease: the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors. *Eur. Heart J.* **26**:1333-1341.
- Frachon I, Etienne Y, Jobic Y, Le Gal G, Humbert M, et al. (2010) Benfluorex and unexplained valvular heart disease: a case-control study. *PLoS One* **5**:e10128.
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G (2000) Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol. Rev.* **80**:1523-1631.
- Frishman W, Huberfeld S, Okin S, Wang Y, Kumar A, et al. (1995) Serotonin and serotonin antagonism in cardiovascular and non-cardiovascular disease. *J. Clin. Pharmacol.* **35**:541-572.
- Fröncke L, Chowdhary BP, Scherthan H, Gustavsson I (1996) A comparative map of the porcine and human genomes demonstrates ZOO-FISH and gene mapping-based chromosomal homologies. *Mamm. Genome* **7**:285-290.
- Frumkin LR (2012) The pharmacological treatment of pulmonary arterial hypertension. *Pharmacol. Rev.* **64**:583-620.
- Furchgott RF (1972) The classification of adrenoceptors: An evaluation from the standpoint of receptor theory, in *Handbook of experimental pharmacology* (H. Blaschko and Muscholl. E eds) pp 283-335, Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Galuppo M, Esposito E, Mazzon E, Di Paola R, Paterniti I, et al. (2011) MEK inhibition suppresses the development of lung fibrosis in the bleomycin model. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **384**:21-37.
- Gillam MP, Molitch ME, Lombardi G, Colao A (2006) Advances in the treatment of prolactinomas. *Endocr. Rev.* **27**:485-534.
- Glusa E, Pertz HH (2000) Further evidence that 5-HT-induced relaxation of pig pulmonary artery is mediated by endothelial 5-HT(2B) receptors. *Br. J. Pharmacol.* **130**:692-698.

- Goncharova EA, Lim P, Goncharov DA, Eszterhas A, Panettieri RA, et al. (2007) Assays for in vitro monitoring of proliferation of human airway smooth muscle (ASM) and human pulmonary arterial vascular smooth muscle (VSM) cells. *Nature Protocols* **1**:2905-2908.
- Görnemann T, Hübner H, Gmeiner P, Horowski R, Latte KP, et al. (2008a) Characterization of the molecular fragment that is responsible for agonism of pergolide at serotonin 5-hydroxytryptamine_{2B} and 5-hydroxytryptamine_{2A} receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **324**:1136-1145.
- Görnemann T, Jähnichen S, Schurad B, Latte KP, Horowski R, et al. (2008b) Pharmacological properties of a wide array of ergolines at functional alpha(1)-adrenoceptor subtypes. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **376**:321-330.
- Gould RA, Butcher JT (2010) Isolation of valvular endothelial cells. *J. Vis. Exp.*
- Graham JR (1967) Cardiac and pulmonary fibrosis during methysergide therapy for headache. *Am. J. Med. Sci.* **254**:1-12.
- Grande-Allen KJ, Griffin BP, Ratliff NB, Cosgrove lii DM, Vesely I (2003) Glycosaminoglycan profiles of myxomatous mitral leaflets and chordae parallel the severity of mechanical alterations. *J. Am. Coll. Cardiol.* **42**:271-277.
- Grewal JS, Mukhin YV, Garnovskaya MN, Raymond JR, Greene EL (1999) Serotonin 5-HT_{2A} receptor induces TGF- β 1 expression in mesangial cells via ERK: proliferative and fibrotic signals. *Am. J. Physiol.* **276**:F922-F930.
- Gu X, Masters KS (2009) Role of the MAPK/ERK pathway in valvular interstitial cell calcification. *Am. J. Physiol.* **296**:H1748-H1757.
- Gupta V, Barzilla JE, Mendez JS, Stephens EH, Lee EL, et al. (2009) Abundance and location of proteoglycans and hyaluronan within normal and myxomatous mitral valves. *Cardiovasc. Pathol.* **18**:191-197.
- Guptha SH, Promnitz AD (2005) Pleural effusion and thickening due to cabergoline use in a patient with Parkinson's disease. *Eur. J. Intern. Med.* **16**:129-131.
- Gustafsson BI, Tømmerås K, Nordrum I, Loennechen JP, Brunsvik A, et al. (2005) Long-term serotonin administration induces heart valve disease in rats. *Circulation* **111**:1517-1522.
- Gustafsson BI, Hauso O, Drozdov I, Kidd M, Modlin IM (2008) Carcinoid heart disease. *Int. J. Cardiol.* **129**:318-324.
- Guttman M, Jaskolka J (2001) The use of pramipexole in Parkinson's disease: are its actions D3 mediated? *Parkinsonism. Relat. Disord.* **7**:231-234.
- Hafizi S, Taylor PM, Chester AH, Allen SP, Yacoub MH (2000) Mitogenic and secretory responses of human valve interstitial cells to vasoactive agents. *J. Heart Valve Dis.* **9**:454-458.
- Hamm HE (1998) The many faces of G protein signaling. *J. Biol. Chem.* **273**:669-672.
- Hannon J, Hoyer D (2008) Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav. Brain Res.* **195**:198-213.
- Harrison C, Traynor JR (2003) The [³⁵S]GTP γ S binding assay: approaches and applications in pharmacology. *Life Sci.* **74**:489-508.
- Hauck AJ, Edwards WD, Danielson GK, Mullany CJ, Bresnahan DR (1990) Mitral and aortic valve disease associated with ergotamine therapy for migraine. Report of two cases and review of literature. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **114**:62-64.
- Hauso Ø, Gustafsson BI, Loennechen JP, Stunes AK, Nordrum I, et al. (2007) Long-term serotonin effects in the rat are prevented by terguride. *Regul. Pept.* **143**:39-46.
- Hayes G, Biden TJ, Selbie LA, Shine J (1992) Structural subtypes of the dopamine D₂ receptor are functionally distinct: expression of the cloned D_{2A} and D_{2B} subtypes in a heterologous cell line. *Mol. Endocrinol.* **6**:920-926.
- Hendrikx M, Van Dorpe J, Flameng W, Daenen W (1996) Aortic and mitral valve disease induced by ergotamine therapy for migraine: a case report and review of the literature. *J. Heart Valve Dis.* **5**:235-237.
- Henney AM, Parker DJ, Davies MJ (1982) Collagen biosynthesis in normal and abnormal human heart valves. *Cardiovasc. Res.* **16**:624-630.

- Herrero MT, Pagonabarraga J, Linazasoro G (2011) Neuroprotective role of dopamine agonists: evidence from animal models and clinical studies. *The neurologist* **17**:S54-66.
- Herring N, Szmigielski C, Becher H, Karavitaki N, Wass JA (2009) Valvular heart disease and the use of cabergoline for the treatment of prolactinoma. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **70**:104-108.
- Hinton RB, Lincoln J, Deutsch GH, Osinska H, Manning PB, et al. (2006) Extracellular matrix remodeling and organization in developing and diseased aortic valves. *Circ. Res.* **98**:1431-1438.
- Hinton RB, Yutzey KE (2011) Heart valve structure and function in development and disease. *Annu. Rev. Physiol.* **73**:29-46.
- Hofmann C, Penner U, Dorow R, Pertz HH, Jähnichen S, et al. (2006) Lisuride, a dopamine receptor agonist with 5-HT_{2B} receptor antagonist properties: absence of cardiac valvulopathy adverse drug reaction reports supports the concept of a crucial role for 5-HT_{2B} receptor agonism in cardiac valvular fibrosis. *Clin. Neuropharmacol.* **29**:80-86.
- Horvath J, Fross RD, Kleiner-Fisman G, Lerch R, Stalder H, et al. (2004) Severe multivalvular heart disease: a new complication of the ergot derivative dopamine agonists. *Mov. Disord.* **19**:656-662.
- Hoyer D, Boddeke HW (1993) Partial agonists, full agonists, antagonists: dilemmas of definition. *Trends Pharmacol. Sci.* **14**:270-275.
- Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, et al. (1994) International union of pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol. Rev.* **46**:157-203.
- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **71**:533-554.
- Huang Y, Bae S-A, Roth BL, Laruelle M (2005) Synthesis of potent and selective serotonin 5-HT_{1B} receptor ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**:4786-4789.
- Hübner H, Haubmann C, Utz W, Gmeiner P (2000) Conjugated enynes as nonaromatic catechol bioisosteres: synthesis, binding experiments, and computational studies of novel dopamine receptor agonists recognizing preferentially the D(3) subtype. *J. Med. Chem.* **43**:756-762.
- Hughes HC (1986) Swine in cardiovascular research. *Lab. Anim. Sci.* **36**:348-350.
- Hulvova H, Galuszka P, Frebortova J, Frebort I (2013) Parasitic fungus *Claviceps* as a source for biotechnological production of ergot alkaloids. *Biotechnol Adv* **31**:79-89.
- Hutcheson JD, Setola V, Roth BL, Merryman WD (2011) Serotonin receptors and heart valve disease—It was meant 2B. *Pharmacol. Ther.* **132**:146-157.
- Ignatz RA, Massagué J (1986) Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* **261**:4337-4345.
- Inzelberg R, Schechtman E, Nisipeanu P (2003) Cabergoline, pramipexole and ropinirole used as monotherapy in early parkinson's disease: an evidence-based comparison. *Drugs Aging* **20**:847-855.
- Jähnichen S, Radtke OA, Pertz HH (2004) Involvement of 5-HT_{1B} receptors in triptan-induced contractile responses in guinea-pig isolated iliac artery. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **370**:54-63.
- Jähnichen S, Glusa E, Pertz HH (2005a) Evidence for 5-HT_{2B} and 5-HT₇ receptor-mediated relaxation in pulmonary arteries of weaned pigs. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **371**:89-98.
- Jähnichen S, Horowski R, Pertz HH (2005b) Agonism at 5-HT_{2B} receptors is not a class effect of the ergolines. *Eur. J. Pharmacol.* **513**:225-228.
- Jankovic J (2002) Levodopa strengths and weaknesses. *Neurology* **58**:S19-32.
- Järveläinen H, Sainio A, Koulu M, Wight TN, Penttinen R (2009) Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.* **61**:198-223.
- Jenkinson DH, Barnard EA, Hoyer D, Humphrey PP, Leff P, et al. (1995) International union of pharmacology committee on receptor nomenclature and drug classification. IX.

- recommendations on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **47**:255-266.
- Jenner P (2002) Pharmacology of dopamine agonists in the treatment of Parkinson's disease. *Neurology* **58**:S1-S8.
- Jian B, Xu J, Connolly J, Savani RC, Narula N, et al. (2002) Serotonin mechanisms in heart valve disease I: serotonin-induced up-regulation of transforming growth factor- β 1 via G-protein signal transduction in aortic valve interstitial cells. *Am. J. Pathol.* **161**:2111-2121.
- Jiang W, Zhang Y, Wu H, Zhang X, Gan H, et al. (2010) Role of cross-talk between the Smad2 and MAPK pathways in TGF-beta1-induced collagen IV expression in mesangial cells. *Int. J. Mol. Med.* **26**:571-576.
- Johansson M, Ellegren H, Andersson L (1995) Comparative mapping reveals extensive linkage conservation—but with gene order rearrangements—between the pig and the human genomes. *Genomics* **25**:682-690.
- Johnson GL, Lapadat R (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **298**:1911-1912.
- Johnston CA, Siderovski DP (2007) Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins: current structural insights. *Mol. Pharmacol.* **72**:219-230.
- Jollis JG, Landolfo CK, Kisslo J, Constantine GD, Davis KD, et al. (2000) Fenfluramine and phentermine and cardiovascular findings: effect of treatment duration on prevalence of valve abnormalities. *Circulation* **101**:2071-2077.
- Kaden JJ, Vocke DC, Fischer CS, Grobholz R, Brueckmann M, et al. (2004) Expression and activity of matrix metalloproteinase-2 in calcific aortic stenosis. *Z. Kardiol.* **93**:124-130.
- Kars M, Delgado V, Holman ER, Feelders RA, Smit JW, et al. (2008) Aortic valve calcification and mild tricuspid regurgitation but no clinical heart disease after 8 years of dopamine agonist therapy for prolactinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**:3348-3356.
- Kekewska A, Görnemann T, Jantschak F, Glusa E, Pertz HH (2012) Antiserotonergic properties of terguride in blood vessels, platelets, and valvular interstitial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **340**:369-376.
- Kenakin T (1993) *Pharmacological analysis of drug-receptor interaction*, Raven Press, New York.
- Kenakin T (1997) Differences between natural and recombinant G protein-coupled receptor systems with varying receptor/G protein stoichiometry. *Trends Pharmacol. Sci.* **18**:456-464.
- Kershaw JD, Misfeld M, Sievers HH, Yacoub MH, Chester AH (2004) Specific regional and directional contractile responses of aortic cusp tissue. *J. Heart Valve Dis.* **13**:798-803.
- Khan MA, Herzog CA, St. Peter JV, Hartley GG, Madlon-Kay R, et al. (1998) The prevalence of cardiac valvular insufficiency assessed by transthoracic echocardiography in obese patients treated with appetite-suppressant drugs. *N. Engl. J. Med.* **339**:713-718.
- Khan R, Sheppard R (2006) Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor- β 1 in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. *Immunology* **118**:10-24.
- Kim J-Y, Chung EJ, Park SW, Lee WY (2006) Valvular heart disease in Parkinson's disease treated with ergot derivative dopamine agonists. *Mov. Disord.* **21**:1261-1264.
- Kitamura Y, Taniguchi T, Shimohama S, Akaike A, Nomura Y (2003) Neuroprotective mechanisms of antiparkinsonian dopamine D2-receptor subfamily agonists. *Neurochem. Res.* **28**:1035-1040.
- Knauer CS, Campbell JE, Chio CL, Fitzgerald LW (2009) Pharmacological characterization of mitogen-activated protein kinase activation by recombinant human 5-HT2C, 5-HT2A, and 5-HT2B receptors. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **379**:461-471.
- Königshoff M, Dumitrascu R, Udalov S, Amarie OV, Reiter R, et al. (2010) Increased expression of 5-hydroxytryptamine2A/B receptors in idiopathic pulmonary fibrosis: a rationale for therapeutic intervention. *Thorax* **65**:949-955.
- Kren V, Eich E, Pertz HH (2004) Pergolide, terguride and N,N'-spacer-linked oligomers of both interact with 5-HT2A receptors of rat tail artery. *Physiol. Res.* **53**:35-43.

- Krenning G, Zeisberg EM, Kalluri R (2010) The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *J. Cell. Physiol.* **225**:631-637.
- Kulke MH, Mayer RJ (1999) Carcinoid tumors. *N. Engl. J. Med.* **340**:858-868.
- Kurrasch-Orbaugh DM, Parrish JC, Watts VJ, Nichols DE (2003) A complex signaling cascade links the serotonin_{2A} receptor to phospholipase A₂ activation: the involvement of MAP kinases. *J. Neurochem.* **86**:980-991.
- Kursar JD, Nelson DL, Wainscott DB, Baez M (1994) Molecular cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of the human 5-hydroxytryptamine_{2B} receptor. *Mol. Pharmacol.* **46**:227-234.
- Kvermo T, Hartter S, Burger E (2006) A review of the receptor-binding and pharmacokinetic properties of dopamine agonists. *Clin. Ther.* **28**:1065-1078.
- Lafeber M, Stades AME, Valk GD, Cramer MJ, Teding van Berkhout F, et al. (2010) Absence of major fibrotic adverse events in hyperprolactinemic patients treated with cabergoline. *Eur. J. Endocrinol.* **162**:667-675.
- Lancellotti P, Livadariu E, Markov M, Daly AF, Burlacu MC, et al. (2008) Cabergoline and the risk of valvular lesions in endocrine disease. *Eur. J. Endocrinol.* **159**:1-5.
- Launay J-M, Birraux G, Bondoux D, Callebert J, Choi D-S, et al. (1996) Ras involvement in signal transduction by the serotonin 5-HT_{2B} receptor. *J. Biol. Chem.* **271**:3141-3147.
- Launay JM, Herve P, Peoc'h K, Tournois C, Callebert J, et al. (2002) Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. *Nat. Med.* **8**:1129-1135.
- Le Ven F, Tribouilloy C, Habib G, Gueffet J-P, Maréchaux S, et al. (2011) Valvular heart disease associated with benfluorex therapy: results from the French multicentre registry. *Eur. J. Echocardiogr.* **12**:265-271.
- Lee SL, Simon AR, Wang WW, Fanburg BL (2001) H₂O₂ signals 5-HT-induced ERK MAP kinase activation and mitogenesis of smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **281**:L646-L652.
- Lester WM, Damji AA, Gedeon I, Tanaka M (1993) Interstitial cells from the atrial and ventricular sides of the bovine mitral valve respond differently to denuding endocardial injury. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **29A**:41-50.
- Levant B, Grigoriadis DE, DeSouza EB (1992) Characterization of [³H]quinpirole binding to D₂-like dopamine receptors in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **262**:929-935.
- Leysen JE, de Chaffoy de Courcelles D, De Clerck F, Niemegeers CJ, Van Nueten JM (1984) Serotonin-₂ receptor binding sites and functional correlates. *Neuropharmacology* **23**:1493-1501.
- Leysen JE (2004) 5-HT₂ receptors. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* **3**:11-26.
- Li F, Zeng B, Chai Y, Cai P, Fan C, et al. (2009) The linker region of Smad2 mediates TGF- β -dependent ERK2-induced collagen synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **386**:289-293.
- Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH (2000) Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor- β ₁. *Mol. Genet. Metab.* **71**:418-435.
- Liu AC, Joag VR, Gotlieb AI (2007) The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. *Am. Journal Pathol.* **171**:1407-1418.
- Liu GS, Huang DX, Yang XS, Wang SR, Tang XL, et al. (1991) Ketanserin in the treatment of hypertension: a multicentre dose-finding study in China. *Clin. Exp. Hypertens. A.* **13**:541-555.
- Lopez-Illasaca M (1998) Signaling from G-protein-coupled receptors to mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascades. *Biochem. Pharmacol.* **56**:269-277.
- Lu R, Alioua A, Kumar Y, Kundu P, Eghbali M, et al. (2008) c-Src tyrosine kinase, a critical component for 5-HT_{2A} receptor-mediated contraction in rat aorta. *J Physiol* **586**:3855-3869.
- Lundin L, Norheim I, Landelius J, Oberg K, Theodorsson-Norheim E (1988) Carcinoid heart disease: relationship of circulating vasoactive substances to ultrasound-detectable cardiac abnormalities. *Circulation* **77**:264-269.

- Luttrell DK, Luttrell LM (2004) Not so strange bedfellows: G-protein-coupled receptors and Src family kinases. *Oncogene* **23**:7969-7978.
- Luttrell LM, Hawes BE, van Biesen T, Luttrell DK, Lansing TJ, et al. (1996) Role of c-Src tyrosine kinase in G protein-coupled receptor and G $\beta\gamma$ subunit-mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **271**:19443-19450.
- Luttrell LM, Rocca GJD, van Biesen T, Luttrell DK, Lefkowitz RJ (1997a) G $\beta\gamma$ subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* **272**:4637-4644.
- Luttrell LM, van Biesen T, Hawes BE, Koch WJ, Krueger KM, et al. (1997b) G-protein-coupled receptors and their regulation: activation of the MAP kinase signaling pathway by G-protein-coupled receptors. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* **31**:263-277.
- MaassenVanDenBrink A, Reekers M, Bax WA, Ferrari MD, Saxena PR (1998) Coronary side-effect potential of current and prospective antimigraine drugs. *Circulation* **98**:25-30.
- Maddahi A, Edvinsson L (2008) Enhanced expressions of microvascular smooth muscle receptors after focal cerebral ischemia occur via the MAPK MEK/ERK pathway. *BMC Neuroscience* **9**:85.
- Manivet P, Mouillet-Richard S, Callebert J, Nebigil CG, Maroteaux L, et al. (2000) PDZ-dependent activation of nitric-oxide synthases by the serotonin 2B receptor. *J. Biol. Chem.* **275**:9324-9331.
- Mantegani S, Brambilla E, Varasi M (1999) Ergoline derivatives: receptor affinity and selectivity. *Il Farmaco* **54**:288-296.
- Marano M, Kaumann AJ (1976) On the statistics of drug-receptor constants for partial agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **198**:518-525.
- Marcos E, Fadel E, Sanchez O, Humbert M, Dartevelle P, et al. (2004) Serotonin-induced smooth muscle hyperplasia in various forms of human pulmonary hypertension. *Circ. Res.* **94**:1263-1270.
- Maricq AV, Peterson AS, Brake AJ, Myers RM, Julius D (1991) Primary structure and functional expression of the 5HT₃ receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science* **254**:432-437.
- Marron K, Yacoub MH, Polak JM, Sheppard MN, Fagan D, et al. (1996) Innervation of human atrioventricular and arterial valves. *Circulation* **94**:368-375.
- Massaous J, Hata A (1997) TGF- β signalling through the Smad pathway. *Trends Cell Biol.* **7**:187-192.
- Matsubayashi Y, Fukuda M, Nishida E (2001) Evidence for existence of a nuclear pore complex-mediated, cytosol-independent pathway of nuclear translocation of ERK MAP kinase in permeabilized cells. *J. Biol. Chem.* **276**:41755-41760.
- Matsumoto Y, Adams V, Walther C, Kleinecke C, Brugger P, et al. (2009) Reduced number and function of endothelial progenitor cells in patients with aortic valve stenosis: a novel concept for valvular endothelial cell repair. *Eur. Heart J.* **30**:346-355.
- Mattar P, Alves Martins MR, Abucham J (2010) Short- and long-term efficacy of combined cabergoline and octreotide treatment in controlling IGF-I levels in acromegaly. *Neuroendocrinology* **92**:120-127.
- McDonald PC, Wilson JE, Gao M, McNeill S, Spinelli JJ, et al. (2002) Quantitative analysis of human heart valves: Does anorexigen exposure produce a distinctive morphological lesion? *Cardiovasc. Pathol.* **11**:251-262.
- McElvaney NG, Wilcox PG, Churg A, Fleetham JA (1988) Pleuropulmonary disease during bromocriptine treatment of Parkinson's disease. *Arch. Intern. Med.* **148**:2231-2236.
- McGarrigle D, Huang X-Y (2007) GPCRs signaling directly through Src-family kinases. *Sci. STKE* **2007**:pe35-.
- McKay MM, Morrison DK (2007) Integrating signals from RTKs to ERK//MAPK. *Oncogene* **26**:3113-3121.
- McLennan PL, Taylor DA (1984) Antagonism by ketanserin of 5-HT-induced vasoconstriction unmasks a 5-HT-induced vasodilation. *Eur. J. Pharmacol.* **104**:313-318.

- Mekontso-Dessap A, Brouri F, Pascal O, Lechat P, Hanoun N, et al. (2006) Deficiency of the 5-hydroxytryptamine transporter gene leads to cardiac fibrosis and valvulopathy in mice. *Circulation* **113**:81-89.
- Meltzer HY, Matsubara S, Lee JC (1989) Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D-1, D-2 and serotonin₂ pKi values. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **251**:238-246.
- Mendez J, Kadia TM, Somayazula RK, El-Badawi KI, Cowen DS (1999) Differential Coupling of Serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} Receptors to Activation of ERK2 and Inhibition of Adenylyl Cyclase in Transfected CHO Cells. *J. Neurochem.* **73**:162-168.
- Merryman WD, Youn I, Lukoff HD, Krueger PM, Guilak F, et al. (2006) Correlation between heart valve interstitial cell stiffness and transvalvular pressure: implications for collagen biosynthesis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **290**:H224-231.
- Messier RH, Bass BL, Aly HM, Jones JL, Domkowski PW, et al. (1994) Dual structural and functional phenotypes of the porcine aortic valve interstitial population: characteristics of the leaflet myofibroblast. *J. Surg. Res.* **57**:1-21.
- Millan MJ, Maioufiss L, Cussac D, Audinot V, Boutin J-A, et al. (2002) Differential actions of antiparkinson agents at multiple classes of monoaminergic receptor. I. A multivariate analysis of the binding profiles of 14 drugs at 21 native and cloned human receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **303**:791-804.
- Milligan G (2003) Principles: Extending the utility of [³⁵S]GTPγS binding assays. *Trends Pharmacol. Sci.* **24**:87-90.
- Modlin IM, Oberg K, Chung DC, Jensen RT, de Herder WW, et al. (2008) Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Lancet Oncol* **9**:61-72.
- Møller JE, Connolly HM, Rubin J, Seward JB, Modesto K, et al. (2003) Factors associated with progression of carcinoid heart disease. *N. Engl. J. Med.* **348**:1005-1015.
- Møller JE, Pellikka PA, Bernheim AM, Schaff HV, Rubin J, et al. (2005) Prognosis of carcinoid heart disease. *Circulation* **112**:3320-3327.
- Monoranu C-M, Kircher S, Schmitt A, Riederer P, Gerlach M (2012) Uniform pattern of immunohistochemical localization of serotonin 5-HT₂ receptors in human aortic, mitral, pulmonary and tricuspid heart valves: implication for the pathomechanism of valvular heart disease following treatment with dopamine agonists. *Basal Ganglia* **2**:87-90.
- Moore KE (1987) Interactions between prolactin and dopaminergic neurons. *Biol. Reprod.* **36**:47-58.
- Muchir A, Wu W, Worman HJ (2010) Mitogen-activated protein kinase inhibitor regulation of heart function and fibrosis in cardiomyopathy caused by lamin A/C gene mutation. *Trends Cardiovasc. Med.* **20**:217-221.
- Mulholland DL, Gotlieb AI (1996) Cell biology of valvular interstitial cells. *Can. J. Cardiol.* **12**:231-236.
- Müller-Schweinitzer E (1990) Venoconstrictor responses to dihydroergocristine and dihydroergotamine: evidence for the involvement of 5-HT₁ like receptors. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **4**:1455-1460.
- Müller T, Fritze J (2003) Fibrosis associated with dopamine agonist therapy in Parkinson's disease. *Clin. Neuropharmacol.* **26**:109-111.
- Munchau A, Bhatia KP (2000) Pharmacological treatment of Parkinson's disease. *Postgrad. Med. J.* **76**:602-610.
- Nagaraja D, Jayashree S (2001) Randomized study of the dopamine receptor agonist piribedil in the treatment of mild cognitive impairment. *Am. J. Psychiatry.* **158**:1517-1519.
- Nagatomo T, Rashid M, Abul Muntasir H, Komiyama T (2004) Functions of 5-HT_{2A} receptor and its antagonists in the cardiovascular system. *Pharmacol. Ther.* **104**:59-81.
- Nebigil CG, Launay JM, Hickel P, Tournois C, Maroteaux L (2000) 5-hydroxytryptamine 2B receptor regulates cell-cycle progression: cross-talk with tyrosine kinase pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**:2591-2596.

- Nebigil CG, Maroteaux L (2001) A novel role for serotonin in heart. *Trends Cardiovasc. Med.* **11**:329-335.
- Nebigil CG, Jaffre F, Messaddeq N, Hickel P, Monassier L, et al. (2003) Overexpression of the serotonin 5-HT_{2B} receptor in heart leads to abnormal mitochondrial function and cardiac hypertrophy. *Circulation* **107**:3223-3229.
- Nelson DL, Lucaites VL, Audia JE, Nissen JS, Wainscott DB (1993) Species differences in the pharmacology of the 5-hydroxytryptamine₂ receptor: structurally specific differentiation by ergolines and tryptamines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **265**:1272-1279.
- Nemecek GM, Coughlin SR, Handley DA, Moskowitz MA (1986) Stimulation of aortic smooth muscle cell mitogenesis by serotonin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**:674-678.
- Neubig RR, Spedding M, Kenakin T, Christopoulos A (2003) International union of pharmacology committee on receptor nomenclature and drug classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **55**:597-606.
- Newman-Tancredi A, Cussac D, Audinot V, Nicolas J-P, De Ceuninck F, et al. (2002a) Differential actions of antiparkinson agents at multiple classes of monoaminergic receptor. II. Agonist and antagonist properties at subtypes of dopamine D₂-like receptor and α ₁/ α ₂-adrenoceptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **303**:805-814.
- Newman-Tancredi A, Cussac D, Quentric Y, Touzard M, Verri le L, et al. (2002b) Differential actions of antiparkinson agents at multiple classes of monoaminergic receptor. III. Agonist and antagonist properties at serotonin, 5-HT₁ and 5-HT₂, receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **303**:815-822.
- Nichols DE, Nichols CD (2008) Serotonin receptors. *Chem. Rev.* **108**:1614-1641.
- Nimni ME (1983) Collagen: structure, function, and metabolism in normal and fibrotic tissues. *Semin. Arthritis Rheum.* **13**:1-86.
- Noize P, Sauer M, Bruneval P, Moreau M, Pathak A, et al. (2006) Valvular heart disease in a patient taking benfluorex. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **20**:577-578.
- Oda Y, Renaux B, Bjorge J, Saifeddine M, Fujita DJ, et al. (1999) cSrc is a major cytosolic tyrosine kinase in vascular tissue. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **77**:606-617.
- Oertel WH, Benes H, Bodenschatz R, Peglau I, Warmuth R, et al. (2006) Efficacy of cabergoline in restless legs syndrome: a placebo-controlled study with polysomnography (CATOR). *Neurology* **67**:1040-1046.
- Parsons SJ, Parsons JT (2004) Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* **23**:7906-7909.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu B-e, Karandikar M, et al. (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* **22**:153-183.
- Pellikka PA, Tajik AJ, Khandheria BK, Seward JB, Callahan JA, et al. (1993) Carcinoid heart disease. Clinical and echocardiographic spectrum in 74 patients. *Circulation* **87**:1188-1196.
- Pertz H, Eich E (1999) Ergot alkaloids and their derivatives as ligands for serotonergic, dopaminergic, and adrenergic receptors, in *Ergot: the genus Claviceps* (Křen V and Cvak L eds) pp 411-440, Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Petrossians P, Thonnard AS, Beckers A (2010) Medical treatment in cushing's syndrome: dopamine agonists and cabergoline. *Neuroendocrinology* **92**:116-119.
- Pho M, Lee W, Watt DR, Laschinger C, Simmons CA, et al. (2008) Cofilin is a marker of myofibroblast differentiation in cells from porcine aortic cardiac valves. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **294**:H1767-H1778.
- Pinero A, Marcos-Alberca P, Fortes J (2005) Cabergoline-related severe restrictive mitral regurgitation. *N. Engl. J. Med.* **353**:1976-1977.
- Pontiroli AE, Viberti GC, Mangili R, Cammelli L, Dubini A (1987) Selective and extremely long inhibition of prolactin release in man by 1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)-3-(6'-

- allylergoline-8'-beta- carbonyl)-urea-diphosphate (FCE 21336). *Br. J. Clin. Pharmacol.* **23**:433-438.
- Popov N, Schmitt M, Schulzeck S, Matthies H (1975) [Reliable micromethod for determination of the protein content in tissue homogenates]. *Acta Biol. Med. Ger.* **34**:1441-1446.
- Pritchett AM, Morrison JF, Edwards WD, Schaff HV, Connolly HM, et al. (2002) Valvular heart disease in patients taking pergolide. *Mayo Clin. Proc.* **77**:1280-1286.
- Rabkin-Aikawa E, Farber M, Aikawa M, Schoen FJ (2004) Dynamic and reversible changes of interstitial cell phenotype during remodeling of cardiac valves. *J. Heart Valve Dis.* **13**:841-847.
- Rabkin E, Aikawa M, Stone JR, Fukumoto Y, Libby P, et al. (2001) Activated interstitial myofibroblasts express catabolic enzymes and mediate matrix remodeling in myxomatous heart valves. *Circulation* **104**:2525-2532.
- Radad K, Gille G, Rausch WD (2005) Short review on dopamine agonists: insight into clinical and research studies relevant to Parkinson's disease. *Pharmacol. Rep.* **57**:701-712.
- Rains CP, Bryson HM, Fitton A (1995) Cabergoline: a review of its pharmacological properties and therapeutic potential in the treatment of hyperprolactinaemia and inhibition of lactation. *Drugs* **49**:255-279.
- Rajamannan NM, Caplice N, Anthikad F, Sebo TJ, Orszulak TA, et al. (2001) Cell proliferation in carcinoid valve disease: a mechanism for serotonin effects. *J. Heart Valve Dis.* **10**:827-831.
- Rajput AH (1992) Frequency and cause of Parkinson's disease. *Can. J. Neurol. Sci.* **19**:103-107.
- Rascol O, Brooks DJ, Korczyn AD, De Deyn PP, Clarke CE, et al. (2000) A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. 056 Study Group. *N. Engl. J. Med.* **342**:1484-1491.
- Rasmussen VG, Poulsen SH, Dupont E, Østergaard K, Safikhany G, et al. (2008) Heart valve disease associated with treatment with ergot-derived dopamine agonists: a clinical and echocardiographic study of patients with Parkinson's disease. *J. Intern. Med.* **263**:90-98.
- Rasmussen VG, Ostergaard K, Dupont E, Poulsen SH (2011) The risk of valvular regurgitation in patients with Parkinson's disease treated with dopamine receptor agonists. *Mov. Disord.* **26**:801-806.
- Raymond JR, Mukhin YV, Gelasco A, Turner J, Collinsworth G, et al. (2001) Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacol. Ther.* **92**:179-212.
- Redfield MM, Nicholson WJ, Edwards WD, Tajik AJ (1992) Valve disease associated with ergot alkaloid use: echocardiographic and pathologic correlations. *Ann. Intern. Med.* **117**:50-52.
- Richelson E, Souder T (2000) Binding of antipsychotic drugs to human brain receptors: Focus on newer generation compounds. *Life Sci.* **68**:29-39.
- Rinne U, Bracco F, Chouza C, Dupont E, Gershanik O, et al. (1998) Early treatment of Parkinson's disease with cabergoline delays the onset of motor complications: results of a double-blind levodopa controlled trial. *Drugs* **55**:23-30.
- Rinne UK (1978) Recent advances in research on Parkinsonism. *Acta Neurol. Scand. Suppl.* **67**:77-113.
- Risberg B (1989) Pathophysiological mechanisms of thromboembolism. *Acta Chir. Scand. Suppl.* **550**:104-114.
- Robiolio PA, Rigolin VH, Wilson JS, Harrison JK, Sanders LL, et al. (1995) Carcinoid heart disease. *Circulation* **92**:790-795.
- Roosens B, Bala G, Droogmans S, Van Camp G, Breyne J, et al. (2013) Animal models of organic heart valve disease. *Int. J. Cardiol.* **165**:398-409.
- Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenlund K, et al. (2008) Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the american heart association statistics committee and stroke statistics subcommittee. *Circulation* **117**:e25-146.

- Roth BL, Nakaki T, Chuang DM, Costa E (1984) Aortic recognition sites for serotonin (5HT) are coupled to phospholipase C and modulate phosphatidylinositol turnover. *Neuropharmacology* **23**:1223-1225.
- Roth BL (1994) Multiple serotonin receptors: clinical and experimental aspects. *Ann. Clin. Psychiatry* **6**:67-78.
- Roth BL (2007) Drugs and valvular heart disease. *N. Engl. J. Med.* **356**:6-9.
- Rothman RB, Baumann MH, Savage JE, Rauser L, McBride A, et al. (2000) Evidence for possible involvement of 5-HT_{2B} receptors in the cardiac valvulopathy associated with fenfluramine and other serotonergic medications. *Circulation* **102**:2836-2841.
- Roy A, Brand NJ, Yacoub MH (2000a) Molecular characterization of interstitial cells isolated from human heart valves. *J. Heart Valve Dis.* **9**:459-464; discussion 464-455.
- Roy A, Brand NJ, Yacoub MH (2000b) Expression of 5-hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNA in interstitial cells from human heart valves. *J. Heart Valve Dis.* **9**:256-260; discussion 260-251.
- Rubinfeld H, Seger R (2005) The ERK cascade. *Mol. Biotechnol.* **31**:151-174.
- Ruddell RG, Oakley F, Hussain Z, Yeung I, Bryan-Lluka LJ, et al. (2006) A role for serotonin (5-HT) in hepatic stellate cell function and liver fibrosis. *Am. J. Pathol.* **169**:861-876.
- Sachdev M, Miller WC, Ryan T, Jollis JG (2002) Effect of fenfluramine-derivative diet pills on cardiac valves: a meta-analysis of observational studies. *Am. Heart J.* **144**:1065-1073.
- Sachs DH (1994) The pig as a potential xenograft donor. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **43**:185-191.
- Sacks MS, David Merryman W, Schmidt DE (2009) On the biomechanics of heart valve function. *J. Biomech.* **42**:1804-1824.
- Saini HK, Takeda N, Goyal RK, Kumamoto H, Arneja AS, et al. (2004) Therapeutic potentials of sarpogrelate in cardiovascular disease. *Cardiovasc. Drug Rev.* **22**:27-54.
- Samii A, Nutt JG, Ransom BR (2004) Parkinson's disease. *Lancet* **363**:1783-1793.
- Schade R, Andersohn F, Suissa S, Haverkamp W, Garbe E (2007) Dopamine agonists and the risk of cardiac-valve regurgitation. *N. Engl. J. Med.* **356**:29-38.
- Schaffner W, Weissmann C (1973) A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal. Biochem.* **56**:502-514.
- Schapiro AHV (2003) Neuroprotection in PD—A role for dopamine agonists? *Neurology* **61**:S34-S42.
- Schiff PL (2006) Ergot and its alkaloids. *Am. J. Pharm. Educ.* **70**:98.
- Schlotter K, Boeckler F, Hubner H, Gmeiner P (2005) Fancy bioisosteres: metallocene-derived G-protein-coupled receptor ligands with subnanomolar binding affinity and novel selectivity profiles. *J. Med. Chem.* **48**:3696-3699.
- Schmuck K, Ullmer C, Kalkman HO, Probst A, Lubbert H (1996) Activation of meningeal 5-HT_{2B} receptors: an early step in the generation of migraine headache? *Eur. J. Neurosci.* **8**:959-967.
- Schoen FJ (2005) Cardiac valves and valvular pathology: update on function, disease, repair, and replacement. *Cardiovasc. Pathol.* **14**:189-194.
- Schoen FJ (2008) Evolving concepts of cardiac valve dynamics. *Circulation* **118**:1864-1880.
- Scholz H, Trenkwalder C, Kohlen R, Riemann D, Kriston L, et al. (2011) Dopamine agonists for restless legs syndrome. *Cochrane Database Syst. Rev.*:CD006009.
- Seeman P (2002) Atypical antipsychotics: mechanism of action. *Can. J. Psychiatry.* **47**:27-38.
- Seghatol FF, Rigolin VH (2002) Appetite suppressants and valvular heart disease. *Curr. Opin. Cardiol.* **17**:486-492.
- Serratrice J, Disdier P, Habib G, Viallet F, Weiller PJ (2002) Fibrotic valvular heart disease subsequent to bromocriptine treatment. *Cardiol. Rev.* **10**:334-336.
- Setola V, Hufeisen SJ, Grande-Allen KJ, Vesely I, Glennon RA, et al. (2003) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy") induces fenfluramine-like proliferative actions on human cardiac valvular interstitial cells in vitro. *Mol. Pharmacol.* **63**:1223-1229.

- Setola V, Dukat M, Glennon RA, Roth BL (2005) Molecular determinants for the interaction of the valvulopathic anorexigen norfenfluramine with the 5-HT_{2B} receptor. *Mol. Pharmacol.* **68**:20-33.
- Seuwen K, Magnaldo I, Pouyssegur J (1988) Serotonin stimulates DNA synthesis in fibroblasts acting through 5-HT_{1B} receptors coupled to a G_i-protein. *Nature* **335**:254-256.
- Siegel GJ, Agranoff BW, Albers WR, Fisher SK, Uhler MD (1999) *Basic neurochemistry, molecular, cellular and medical aspects*, Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Sim EKW, Muskawad S, Lim C-S, Yeo JH, Hiang Lim K, et al. (2003) Comparison of human and porcine aortic valves. *Clin. Anat.* **16**:193-196.
- Simula DV, Edwards WD, Tazelaar HD, Connolly HM, Schaff HV (2002) Surgical pathology of carcinoid heart disease: a study of 139 valves from 75 patients spanning 20 years. *Mayo Clin. Proc.* **77**:139-147.
- Soini Y, Satta J, Maatta M, Autio-Harmainen H (2001) Expression of MMP2, MMP9, MT1-MMP, TIMP1, and TIMP2 mRNA in valvular lesions of the heart. *J. Pathol.* **194**:225-231.
- Stelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, et al. (2004) JAK//STAT, Raf//MEK//ERK, PI3K//Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* **18**:189-218.
- Steffee CH, Singh HK, Chitwood WR (1999) Histologic changes in three explanted native cardiac valves following use of fenfluramines. *Cardiovasc. Pathol.* **8**:245-253.
- Stephens EH, Chu C-K, Grande-Allen KJ (2008) Valve proteoglycan content and glycosaminoglycan fine structure are unique to microstructure, mechanical load and age: relevance to an age-specific tissue-engineered heart valve. *Acta Biomaterialia* **4**:1148-1160.
- Stephens J, Price D, Ionescu A (2007) Dopamine agonists and valvular heart disease. *N. Engl. J. Med.* **356**:1676-1680.
- Stocchi F (2003) Prevention and treatment of motor fluctuations. *Parkinsonism Relat. Disord.* **9 Suppl 2**:S73-81.
- Strange PG (2010) Use of the GTPγS ([³⁵S]GTPγS and Eu-GTPγS) binding assay for analysis of ligand potency and efficacy at G protein-coupled receptors. *Br. J. Pharmacol.* **161**:1238-1249.
- Sugden PH, Clerk A (1997) Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cell. Signal.* **9**:337-351.
- Tambasco N, Simoni S, Marsili E, Sacchini E, Murasecco D, et al. (2012) Clinical aspects and management of levodopa-induced dyskinesia. *Parkinsons Dis.* **2012**:745947.
- Tan LCS, Ng KKC, Au W-L, Lee RKK, Chan Y-H, et al. (2009) Bromocriptine use and the risk of valvular heart disease. *Mov. Disord.* **24**:344-349.
- Tao G, Kotick JD, Lincoln J (2012) Heart valve development, maintenance, and disease: the role of endothelial cells. *Curr. Top. Dev. Biol.* **100**:203-232.
- Taylor PM, Allen SP, Yacoub MH (2000) Phenotypic and functional characterization of interstitial cells from human heart valves, pericardium and skin. *J. Heart Valve Dis.* **9**:150-158.
- Taylor PM, Allen SP, Dreger SA, Yacoub MH (2002) Human cardiac valve interstitial cells in collagen sponge: a biological three-dimensional matrix for tissue engineering. *J. Heart Valve Dis.* **11**:298-306; discussion 306-297.
- Taylor PM, Batten P, Brand NJ, Thomas PS, Yacoub MH (2003) The cardiac valve interstitial cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**:113-118.
- Tepper SJ, Rapoport AM, Sheftell FD (2002) Mechanisms of action of the 5-HT_{1B/1B} receptor agonists. *Arch. Neurol.* **59**:1084-1088.
- Tepper SJ, Millson D (2003) Safety profile of the triptans. *Expert Opin. Drug Saf.* **2**:123-132.
- Thomas SM, Brugge JS (1997) Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**:513-609.
- Todman DH, Oliver WA, Edwards RL (1990) Pleuropulmonary fibrosis due to bromocriptine treatment for Parkinson's disease. *Clin. Exp. Neurol.* **27**:79-82.

- Tournois C, Mutel V, Manivet P, Launay JM, Kellermann O (1998) Cross-talk between 5-hydroxytryptamine receptors in a serotonergic cell line. Involvement of arachidonic acid metabolism. *J. Biol. Chem.* **273**:17498-17503.
- Tribouilloy C, Rusinaru D, Henon P, Tribouilloy L, Leleu F, et al. (2010) Restrictive organic mitral regurgitation associated with benfluorex therapy. *Eur. J. Echocardiogr.* **11**:614-621.
- Tuteja N (2009) Signaling through G protein coupled receptors. *Plant Signal. Behav.* **4**:942-947.
- Uitto J, Kouba D (2000) Cytokine modulation of extracellular matrix gene expression: relevance to fibrotic skin diseases. *J. Dermatol. Sci.* **24**, Suppl **1**:S60-S69.
- Ullmer C, Schmuck K, Kalkman HO, Lübbert H (1995) Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels. *FEBS Lett.* **370**:215-221.
- Ungefroren H, Sebens S, Groth S, Gieseler F, Fandrich F (2011) The Src family kinase inhibitors PP2 and PP1 block TGF-beta1-mediated cellular responses by direct and differential inhibition of type I and type II TGF-beta receptors. *Curr. Cancer Drug Targets* **11**:524-535.
- Usiello A, Baik J-H, Rouge-Pont F, Picetti R, Dierich A, et al. (2000) Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature* **408**:199-203.
- Vallette S, Serri K, Rivera J, Santagata P, Delorme S, et al. (2009) Long-term cabergoline therapy is not associated with valvular heart disease in patients with prolactinomas. *Pituitary* **12**:153-157.
- Van Camp G, Flamez A, Cosyns B, Weytjens C, Muyltermans L, et al. (2004) Treatment of Parkinson's disease with pergolide and relation to restrictive valvular heart disease. *Lancet* **363**:1179-1183.
- van den Broek R, Bhalla P, MaassenVanDenBrink A, de Vries R, Sharma H, et al. (2002) Characterization of sumatriptan-induced contractions in human isolated blood vessels using selective 5-HT1B and 5-HT1D receptor antagonists and in situ hybridization. *Cephalalgia* **22**:83-93.
- van Schie DL, de Jeu RM, Steyn DW, Odendaal HJ, van Geijn HP (2002) The optimal dosage of ketanserin for patients with severe hypertension in pregnancy. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **102**:161-166.
- van Zwieten PA, Blauw GJ, van Brummelen P (1992) Serotonergic receptors and drugs in hypertension. *Pharmacol. Toxicol.* **70**:S17-22.
- Vanhoutte P, Amery A, Birkenhager W, Breckenridge A, Buhler F, et al. (1988) Serotonergic mechanisms in hypertension. Focus on the effects of ketanserin. *Hypertension* **11**:111-133.
- Venturini PL, Horowski R, Valenzano M, Costantini S, Fasce V, et al. (1986) Effect of terguride on prolactin levels in normal, puerperal and hyperprolactinaemic women. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **30**:195-197.
- Verrecchia F, Mauviel A (2002) Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J. Invest. Dermatol.* **118**:211-215.
- Vilar L, Azevedo M, Naves L, Casulari L, Albuquerque J, et al. (2011) Role of the addition of cabergoline to the management of acromegalic patients resistant to longterm treatment with octreotide LAR. *Pituitary* **14**:148-156.
- Villalón CM, Centurión D (2007) Cardiovascular responses produced by 5-hydroxytryptamine: a pharmacological update on the receptors/mechanisms involved and therapeutic implications. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **376**:45-63.
- Volmar KE, Hutchins GM (2001) Aortic and mitral fenfluramine-phentermine valvulopathy in 64 patients treated with anorectic agents. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **125**:1555-1561.
- von Campenhausen S, Bornschein B, Wick R, Bötzel K, Sampaio C, et al. (2005) Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **15**:473-490.
- Wakil A, Rigby AS, Clark AL, Kallvikbacka-Bennett A, Atkin SL (2008) Low dose cabergoline for hyperprolactinaemia is not associated with clinically significant valvular heart disease. *Eur. J. Endocrinol.* **159**:R11-R14.

- Walker GA, Masters KS, Shah DN, Anseth KS, Leinwand LA (2004) Valvular myofibroblast activation by transforming growth factor-beta: implications for pathological extracellular matrix remodeling in heart valve disease. *Circ. Res.* **95**:253-260.
- Waltenberger J, Lundin L, Oberg K, Wilander E, Miyazono K, et al. (1993) Involvement of transforming growth factor-beta in the formation of fibrotic lesions in carcinoid heart disease. *Am. J. Pathol.* **142**:71-78.
- Wang Y, Xu R, Sasaoka T, Tonegawa S, Kung MP, et al. (2000) Dopamine D2 long receptor-deficient mice display alterations in striatum-dependent functions. *J. Neurosci.* **20**:8305-8314.
- Watson JA, Elliott AC, Brown PD (1995) Serotonin elevates intracellular Ca²⁺ in rat choroid plexus epithelial cells by acting on 5-HT_{2C} receptors. *Cell Calcium* **17**:120-128.
- Watts SW (1996) Serotonin activates the mitogen-activated protein kinase pathway in vascular smooth muscle: use of the mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor PD098059. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **279**:1541-1550.
- Watts SW (1998) Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway via the 5-HT_{2A} receptor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **861**:162-168.
- Watts SW, Morrison SF, Davis RP, Barman SM (2012) Serotonin and blood pressure regulation. *Pharmacol. Rev.* **64**:359-388.
- Weaver ME, Pantely GA, Bristow JD, Ladley HD (1986) A quantitative study of the anatomy and distribution of coronary arteries in swine in comparison with other animals and man. *Cardiovasc. Res.* **20**:907-917.
- Weddell RA, Weiser R (1995) A double-blind cross-over placebo-controlled trial of the effects of bromocriptine on psychomotor function, cognition, and mood in de novo patients with Parkinson's disease. *Behav. Pharmacol.* **6**:81-91.
- Weiner DM, Burstein ES, Nash N, Croston GE, Currier EA, et al. (2001) 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor inverse agonists as antipsychotics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299**:268-276.
- Weintraub M, Hasday JD, Mushlin AI, Lockwood DH (1984) A double-blind clinical trial in weight control. Use of fenfluramine and phentermine alone and in combination. *Arch. Intern. Med.* **144**:1143-1148.
- Weintraub M, Sundaresan PR, Schuster B, Ginsberg G, Madan M, et al. (1992) Long-term weight control study. II (weeks 34 to 104). An open-label study of continuous fenfluramine plus phentermine versus targeted intermittent medication as adjuncts to behavior modification, caloric restriction, and exercise. *Clin. Pharmacol. Ther.* **51**:595-601.
- Weissman NJ, Tighe JF, Jr., Gottdiener JS, Gwynne JT (1998) An assessment of heart-valve abnormalities in obese patients taking dexfenfluramine, sustained-release dexfenfluramine, or placebo. Sustained-release dexfenfluramine study group. *N. Engl. J. Med.* **339**:725-732.
- Welsh DJ, Harnett M, MacLean M, Peacock AJ (2004) Proliferation and signaling in fibroblasts. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **170**:252-259.
- Wight TN, Potter-Perigo S (2011) The extracellular matrix: an active or passive player in fibrosis? *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **301**:G950-G955.
- Wilke A, Hesse H, Hufnagel G, Maisch B (1997) Mitral, aortic and tricuspid valvular heart disease associated with ergotamine therapy for migraine. *Eur. Heart J.* **18**:701.
- Xu J, Jian B, Chu R, Lu Z, Li Q, et al. (2002) Serotonin mechanisms in heart valve disease II: the 5-HT₂ receptor and its signaling pathway in aortic valve interstitial cells. *Am. J. Pathol.* **161**:2209-2218.
- Xu S, Grande-Allen KJ (2010) The role of cell biology and leaflet remodeling in the progression of heart valve disease. *Methodist DeBakey Cardiovasc. J.* **6**:2-7.
- Yamamoto M, Uesugi T, Nakayama T (2006) Dopamine agonists and cardiac valvulopathy in Parkinson disease. *Neurology* **67**:1225-1229.
- Yoon S, Seger R (2006) The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* **24**:21-44.

- Yperman J, De Visscher G, Holvoet P, Flameng W (2004) Molecular and functional characterization of ovine cardiac valve-derived interstitial cells in primary isolates and cultures. *Tissue Eng.* **10**:1368-1375.
- Yue T-L, Gu J-L, Wang C, Reith AD, Lee JC, et al. (2000) Extracellular signal-regulated kinase plays an essential role in hypertrophic agonists, endothelin-1 and phenylephrine-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J. Biol. Chem.* **275**:37895-37901.
- Zanettini R, Antonini A, Gatto G, Gentile R, Tesei S, et al. (2007) Valvular heart disease and the use of dopamine agonists for parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* **356**:39-46.
- Zanettini R, Antonini A, Gatto G, Gentile R, Tesei S, et al. (2011) Regression of cardiac valvulopathy related to ergot-derived dopamine agonists. *Cardiovasc. Ther.* **29**:404-410.
- Zehorai E, Yao Z, Plotnikov A, Seger R (2010) The subcellular localization of MEK and ERK—A novel nuclear translocation signal (NTS) paves a way to the nucleus. *Mol. Cell. Endocrinol.* **314**:213-220.
- Zhu X, Kim JL, Newcomb JR, Rose PE, Stover DR, et al. (1999) Structural analysis of the lymphocyte-specific kinase Lck in complex with non-selective and Src family selective kinase inhibitors. *Structure* **7**:651-661.
- Zolkowska D, Baumann MH, Rothman RB (2008) Chronic fenfluramine administration increases plasma serotonin (5-hydroxytryptamine) to nontoxic levels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **324**:791-797.

Veröffentlichungen

Kekewska A, Hübner H, Gmeiner P, Pertz HH (2011) The bulky N(6) substituent of cabergoline is responsible for agonism of this drug at 5-hydroxytryptamine 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptors and thus is a determinant of valvular heart disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **338**:381-391

Kekewska A, Görnemann T, Jantschak F, Glusa E, Pertz HH (2012) Antiserotonergic properties of terguride in blood vessels, platelets, and valvular interstitial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **340**:369-376.

Kongressbeiträge

Kekewska A., Sarkar-Moser S., Pertz H.H., (2010) Characterisation of the molecular fragment that is responsible for agonism of cabergoline at serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptors (51. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, DGPT. Mainz, Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Vol. 381 (Suppl. 1):40)

Kekewska A., Pertz H.H., (2011) The role of serotonin 5-HT_{2A} receptors in cabergoline-induced valvular heart disease (Joint meeting of the Austrian and German pharmaceutical societies, Innsbruck, Abstract Book PO - 026: 123)