

**Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Herz- und Thoraxchirurgie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

(Direktor: Prof. Dr. med R.-E. Silber)



**Die altersabhängige Expression von
Advanced Glycation Endproducts (AGE) - Rezeptoren
am menschlichen Herzen**

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

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

von Christian Andreas Caßelmann
geboren am 08.05.1977 in Kassel

Gutachter :

Univ.-Doz. Dr. Simm
Prof. Dr. Isenberg
Prof. Dr. Weiß

verteidigt am 08.12.2005

urn:nbn:de:gbv:3-000009899

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009899>]

Gewidmet

meinen lieben Eltern

Kurzreferat

Zielsetzung

Den Endprodukten der Maillardreaktion, auch Advanced Glycation Endproducts (AGE) genannt, und der Interaktion mit ihren Rezeptoren, wird eine Rolle in der Änderung der Zellfunktion während des Alterns zugesprochen. Man vermutet weiter eine Mitbeteiligung bei der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen. Daher wurde die Expression von den bekannten fünf AGE-Rezeptoren in Abhängigkeit vom Alter am menschlichen Herzen untersucht und mit klinischen Parametern verglichen.

Material und Methoden

Die während kardiochirurgischen Eingriffen gewonnenen rechten Herzohren wurden mittels PCR und Western-Blot auf die Genexpression der AGE-Rezeptoren RAGE, AGE-R1, -R2, -R3 und des Scavengerrezeptors ScR-II untersucht. Es wurden drei Altersgruppen gebildet: Kinder ($2,4 \pm 1,1$ Jahre), Erwachsene ($45,3 \pm 0,8$ Jahre) und Senioren ($76,4 \pm 0,4$ Jahre). Innerhalb dieser drei Gruppen wurde die altersabhängige Expression der Rezeptoren untersucht. Die klinischen Parameter ergaben sich aus der postoperativen Phase der Patienten.

Ergebnisse

Im Vergleich der drei Altersgruppen ließen sich signifikante Unterschiede in der Expression von mRNA und Protein bei den Rezeptoren AGE-R3, ScR-II und RAGE beweisen. In diesem Zusammenhang zeigte sich, daß die Expression der RNA von AGE-R3 und RAGE nicht mit der Expression des Proteins korreliert. In Bezug auf die gewonnenen klinischen Parameter zeigte sich, daß die AGE-R3-Proteinexpression mit der Anzahl von implantierten Bypässen und einer prolongierten ITS-Aufenthaltsdauer steigt und die RAGE-Proteinexpression bei verminderter Herzleistung signifikant steigt.

Schlussfolgerung

Es steht fest, daß sich die Expression von AGE-R3, ScR-II und RAGE auf RNA- und Proteinebene im Laufe des Alterns am menschlichen Herzen signifikant verändert. Die unterschiedliche RNA- und Protein Expression von AGE-R3 und RAGE läßt eine posttranskriptionelle Modifizierung vermuten. Die Signifikanzen in Bezug auf die klinischen Parameter lassen den Schluss zu, daß AGE Rezeptoren auf zellulärer Ebene weitreichende Konsequenzen für das Herz-Kreislauf-System des Menschen entfalten können.

Caßelmann, Christian: Die altersabhängige Expression von Advanced Glycation Endproducts (AGE)-Rezeptoren am menschlichen Herzen. Halle, Martin-Luther-Universität., Med.Fak., Diss., 72 Seiten, 2005

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Altern.....	1
1.2	Advanced Glycation Endproducts (AGEs).....	2
1.2.1	Entstehung von AGEs	2
1.2.2	Pharmakokinetische und pathologische Eigenschaften der AGEs.....	5
1.2.3	Therapeutische Ansätze	7
1.3	AGE Rezeptoren.....	9
1.3.1	AGE-R1 (OST-48).....	9
1.3.2	AGE-R2 (80 K-H).....	10
1.3.3	AGE-R3 (Galectin-3).....	10
1.3.4	Macrophage Scavenger Receptor II (ScR-II).....	11
1.3.5	Receptor for AGEs (RAGE)	12
1.4	Zielsetzung	13
2	Material und Methoden.....	14
2.1	Material.....	14
2.1.1	Chemikalien	14
2.1.2	Verwendete Puffer und Lösungen.....	16
2.1.3	Geräte	19
2.1.4	Sonstige Materialien.....	20
2.2	Methoden.....	20
2.2.1	Menschliches Herzohrgewebe	20
2.2.2	RNA-Isolierung.....	22
2.2.2.1	RNA Konzentrationsbestimmung	23
2.2.2.2	RNA Gelelektrophorese	23
2.2.3	Reverse Transkription (RT)	23
2.2.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	25

2.2.5	Genbanken und Computerprogramme	27
2.2.6	Proteinpräparation	28
2.2.6.1	Proteinkonzentrationsbestimmung	28
2.2.7	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	29
2.2.8	Western-Blot	30
2.2.9	Herzindexmessung	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Altersabhängige Expression der AGE-Rezeptoren auf mRNA und Proteinebene	33
3.1.1	Altersabhängige Genexpression der AGE-Rezeptoren.....	33
3.1.2	Altersabhängige Expression der AGE-Rezeptoren auf Proteinebene	36
3.2	Expression der AGE-Rezeptoren auf mRNA und Proteinebene in Abhängigkeit von klinischen Parametern	39
3.2.1	Expression der mRNA- und Proteinexpression von RAGE in Abhängigkeit vom Herzindex	39
3.2.2	Expression der mRNA- und Proteinexpression von AGE-R3 in Abhängigkeit von dem Herzindex	39
3.2.3	Expression der mRNA- und Proteinexpression von RAGE und AGE-R3 in Abhängigkeit von dem postoperativen Intensivstationaufenthalt	42
3.2.3.1	Expression der mRNA- und Proteinexpression von RAGE in Abhängigkeit von dem postoperativen Intensivstationaufenthalt	42
3.2.3.2	Expression der mRNA- und Proteinexpression von AGE-R3 in Abhängigkeit von dem postoperativen Intensivstationaufenthalt	43
3.2.4	Expression der mRNA- und Proteinexpression von RAGE und AGE-R3 in Abhängigkeit von der Anzahl der implantierten Bypässe	46
3.2.4.1	Expression der mRNA- und Proteinexpression von RAGE in Abhängigkeit von der Anzahl der implantierten Bypässe.....	46

3.2.4.2	Expression der mRNA- und Proteinexpression von AGE-R3 in Abhängigkeit von der Anzahl der implantierten Bypässe.....	46
4	Diskussion	49
4.1	Expression von AGE-Rezeptoren am menschlichen Herzen in verschiedenen Altersgruppen	49
4.2	Post-transkriptionelle Regulation des RAGE und AGE-R3.....	56
4.3	Auswirkung der Expression von AGE-R3 und RAGE auf klinische Parameter	57
4.4	Ausblick.....	58
5	Literaturverzeichnis	59
6	Thesen	72

Abkürzungen und Symbole

°C	Grad Celsius
A	Ampère
Abb.	Abbildung
ACB	Aorto-coronare-Bypässe
AGE	Advanced Glycation Endproduct
ALT-711	4,5-Dimethyl-3-Phenacylthiazolchlorid
APS	Ammoniumpersulfat
ASD	Vorhofseptumdefekt
BCA	Bichinonsäure-Lösung
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	complementary DNA
CIHK	chronisch ischämischen Herzkrankheit
CML	N ^ε -(carboxymethyl)Lysin
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DDT	Dithiothreitol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	double-stranded DNA
EDTA	Ethylendintrilotetraessigsäure
FGF	Fibroblast Growth Factor
g	Erdbeschleunigung
GTC	Guanidinthiocyanat
HMV	Herzminutenvolumen
IL-6	Interleukin-6
ITS	Intensivstation
kD	kilo Dalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low-Density-Lipoproteins
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck

M	Molar
MAPK	Mitose-aktivierende Proteinkinase
MMP	Matrix Metalloprotease
mRNA	messenger RNA
NF- κ B	nuclear factor - κ B
NMDA	N-methyl-D-Aspartat
NOD	non obese diabetic
NYHA	New York Heart Association
OST-48	Oligosaccharyltransferasekomplex 48
oxLDL	oxidierte Low-Density-Lipoproteins
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKC	Proteinkinase C
PTB	N-Phenacylthiazolbromid
RAGE	Receptor for Advanced Glycation Endproducts
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
mRNA	messenger RNA
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription
ScR-II	macrophage scavenger receptor II
SDS	Natriumdodecylsulfat
sRAGE	soluble RAGE
ssDNA	single-stranded DNA
TEMED	N,N,N',N',Tetramethylendiamin
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
V	Volt
VSD	Ventrikelseptumdefekt

1 Einleitung

1.1 Altern

Gegenwärtig existieren- neben weiteren- zwei hauptsächlich anerkannte Theorien, die den Vorgang des Alterns zu erklären versuchen, namentlich die Genregulationstheorie und die Theorie der freien Radikale.

Die Genregulationstheorie (Replikative Seneszenz) basiert darauf, daß die Proliferationskapazität von Zellen genetisch festgelegt und die Fortpflanzungsfähigkeit von Zellen durch die Aktivierung bzw. die Repression von bestimmten Genen gesteuert werden soll [30]. Menschliche Fibroblasten teilen sich in vitro nur begrenzt, so daß nach etwa 50 Populationsverdopplungen die Teilungsphase irreversibel eingestellt wird [45]. Somit liegt der Schluß nahe, daß die Zellen die Anzahl der Mitosen registrieren und ab einem bestimmten Punkt die Fähigkeit zur Zellteilung, der genetisch determiniert sein soll, verlieren.

Die Theorie der freien Radikale [44] geht davon aus, daß die Zellen endogene freie Sauerstoffradikale wie Superoxid oder Hydroxyl-Radikale bilden, die ungerichtet sind und durch ihre Akkumulation die Zelle schädigen [43]. Diese freien Radikale, die sich unter dem Begriff reactive oxygen species (ROS) subsummieren lassen, können entweder direkt oder über die Aktivierung spezifischer Signalkaskaden die Zelle schädigen. Die Konfrontierung der Zelle mit ROS wird oxidativer Streß genannt, für dessen Bekämpfung der Zelle verschiedene antioxidative Systeme zur Verfügung stehen [38, 81], beispielsweise die Superoxiddismutase, Katalase oder auch Glutathionperoxidase. In welchem Maße eine Zelle einem oxidativen Streß tatsächlich ausgesetzt ist, ist von der Balance zwischen der ROS-Produktion und der antioxidativen Kapazität der Zelle abhängig.

Durch den oxidativen Streß kommt es als Konsequenz in der Zelle zu Modifikationen mit nachfolgendem Funktionsverlust von Proteinen, Lipiden und DNA. Diese Effekte akkumulieren während des Alterns und führen letztendlich in ihrer Gesamtheit zu Organdysfunktionen [9], wie sie im Rahmen des Alterns bei chronischen Krankheiten anzutreffen sind. Als Hinweis hierfür wird auch die erhöhte Inzidenz chronischer Krankheiten in gealterten Individuen gesehen, wobei hier Erkrankungen des Herz-

Kreislauf-Systems an vorderster Stelle stehen [74]. Zudem ist die Mortalitätsrate der Herz-Kreislauf-Erkrankungen mit knapp 50% die höchste in den Industrienationen [1]. Eng korreliert mit dem oxidativen Streß ist die Bildung von Maillardprodukten (Advanced Glycation Endproducts (AGEs)). Es hat sich gezeigt, daß bei der Bildung von AGEs ROS entstehen können und somit zu einem Ungleichgewicht zwischen ROS und den oxidationsprotektiven Systemen führen kann. Daher wird den AGEs ein enger Bezug zu dem Prozeß des Alterns und besonders zu der Altersakzeleration zugesprochen [10, 15, 26, 35, 67]. Sie können einen negativen Einfluß auf chronische Erkrankungen, die besonders im fortgeschrittenen Alter auftreten, nehmen.

1.2 Advanced Glycation Endproducts (AGEs)

1.2.1 Entstehung von AGEs

1912 inkubierte Maillard Glucose mit Aminosäuren und entdeckte als Erster, daß sich nach gewisser Zeit gelblich- bräunliche Pigmente bildeten [78]. Diese Pigmente resultieren aus einer nicht-enzymatischen Glykierungsreaktion der Glucose mit den Aminosäuren. Diese Bräunungsreaktion wurde nach ihrem Entdecker als Maillard-Reaktion benannt. Ausgangsstoffe für diese Reaktion sind Glucose und eine freie, reaktive Aminogruppe von Proteinen, welche in einer ersten nicht-enzymatischen Reaktion eine Schiff'sche Base bilden. Diese Schiff'sche Base ist das Korrelat der gelblich-braunen Pigmente, die Maillard entdeckt hatte. Dieser Schritt vollzieht sich innerhalb von Minuten bis Stunden und ist hochreversibel, da die Schiff'sche Base eine sehr instabile Verbindung ist [124]. Die Menge der Schiff'schen Base ist direkt von der Glucosekonzentration abhängig, da das Produkt innerhalb von Minuten zerfällt, wenn der Reaktion Glucose entzogen oder die Konzentration verringert wird [55]. Im weiteren lagert sich die instabile Schiff'sche Base zu dem weitaus stabileren Amadori-Produkt um. Dieser Prozeß ist wesentlich langsamer (Tage), aber da er weniger reversibel ist, akkumulieren die Amadori-Produkte innerhalb von Wochen an Proteinen. Ein sehr bekanntes Amadori-Produkt ist das Hämoglobin A_{1C}, welches ein Addukt aus Glucose und der N-terminalen Valin-Aminogruppe der β -Kette des Hämoglobins darstellt. Praktische Anwendung findet die Messung des Hämoglobin A_{1C} bei der Therapiekontrolle von Diabetikern, da es eine Aussage über den Glucosespiegel im Blut über die letzten Wochen zulässt [66]. Die primären Amadori-Produkte lagern sich um

und reagieren weiter zu den Endprodukten der Maillard-Reaktion, den Advanced Glycation Endproducts (AGE). Durch Umlagerung und Polymerisation können die AGEs Quervernetzungen mit anderen Proteinen ausbilden. Aufgrund des Entstehungsweges gibt es sehr viele verschiedene und komplexe Formen von AGEs, wobei N^ε-(carboxymethyl)Lysin (CML) , Furosin und Pentosidin[42, 135] am intensivsten untersucht wurden.

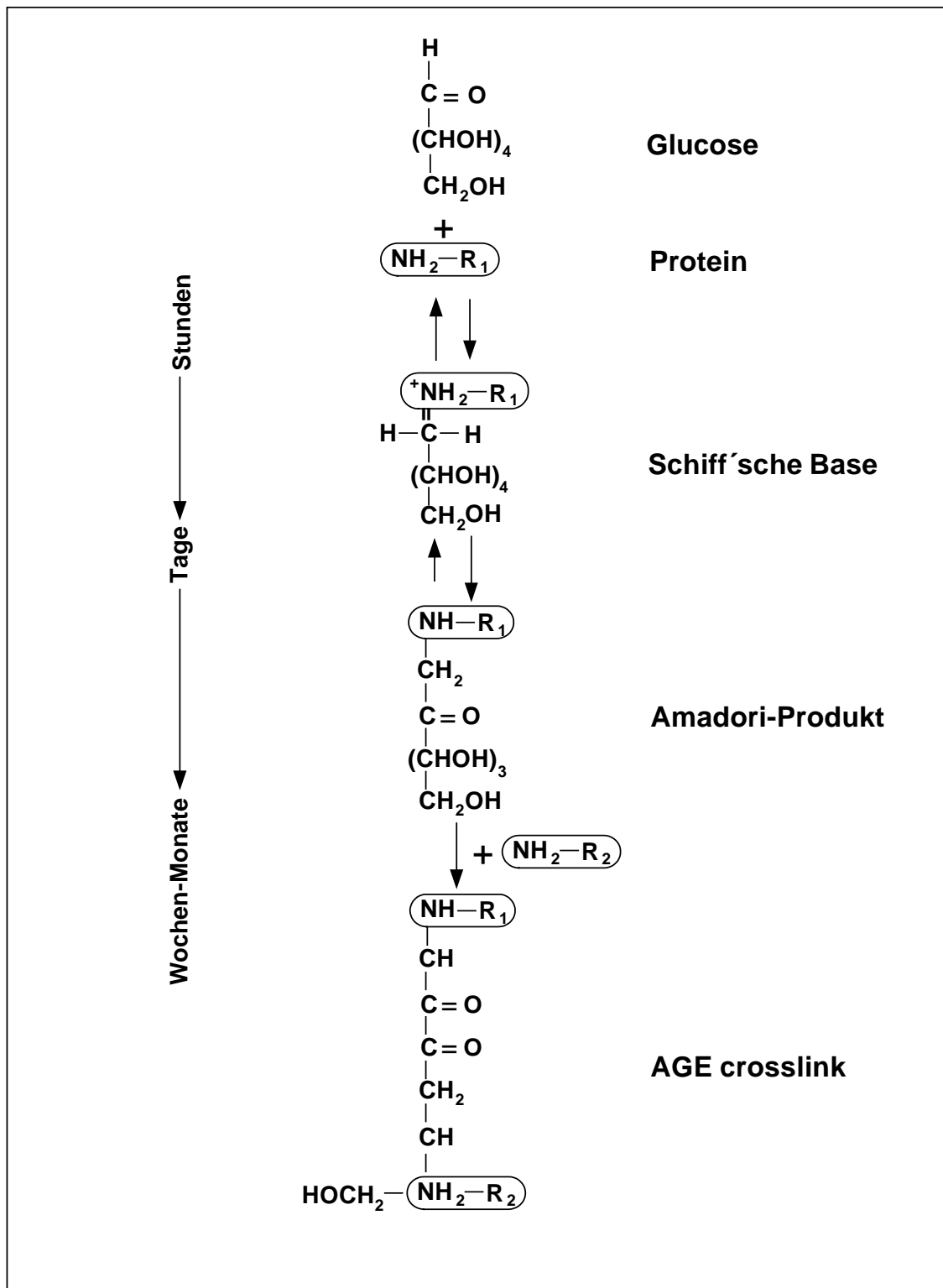


Abbildung 1

Entstehungsweg der AGEs. Glucose bildet mit Proteinen in einer nichtenzymatischen Reaktion eine Schiff'sche Base. Durch Umlagerung entsteht ein wesentlich stabileres Amadori-Produkt, welches sich mit anderen Amadori-Produkten zu AGEs zusammenschließt. Die AGEs bilden nun nicht mehr spaltbare AGE Quervernetzungen aus. Modifiziert nach Nawroth, P.P. et al. [87]

1.2.2 Pharmakokinetische und pathologische Eigenschaften der AGEs

Die Majorität der im menschlichen Körper vorkommenden AGEs wird endogen gebildet. Allerdings weiß man, daß AGEs auch exogen gebildet werden können, wie etwa durch Zigarettenrauch und hitzebehandelte Nahrung, und somit dem Organismus zugeführt werden [25, 89, 90]. Obwohl die orale Bioverfügbarkeit der AGEs nur ungefähr 10% beträgt und die gastrointestinale Resorption gering ist, spielt dieser Weg der AGE-Aufnahme keine untergeordnete Rolle. Da sich die AGEs als Modifikation dem enzymatischen Metabolismus entziehen, ist nur die Niere in der Lage, die AGEs durch Filtration und Ausscheidung dem Körper zu entziehen. In der Konsequenz bedeutet dies, daß die Menge an zirkulierenden AGEs bei Patienten mit Niereninsuffizienz erhöht ist [74]. Es zeigte sich jedoch, daß die Filtrationsrate der AGEs geringer ist als die des Kreatinins, was ein Hinweis darauf ist, daß nicht alle AGEs filtriert werden [79, 132].

Aufgrund des Entstehungsweges der AGEs ist zu vermuten, daß bei Patienten mit Diabetes mellitus AGEs in einem höheren Maße als bei Nicht-Diabetikern gebildet werden, da Diabetiker eine im Mittel höhere Glucosekonzentration im Plasma haben als die Normalbevölkerung. Tatsächlich konnte dies durch Studien, die gezeigt haben, daß die Serumkonzentration von AGEs bei Diabetikern signifikant höher ist als in gesunden Individuen, bestätigt werden [109].

Die bekannten diabetischen Spätfolgen wie Makroangiopathie, Mikroangiopathie, Nephropathie, Retinopathie oder Neuropathie sind Erkrankungen, die normalerweise erst im hohen Alter auftreten [97]. Bei Patienten, die an Diabetes mellitus leiden, treten diese Erkrankungen allerdings schon sehr viel früher im Sinne eines beschleunigten Alterungsprozesses auf.

Durch die Makroangiopathie sind Diabetiker in höherem Maße als die Normalbevölkerung gefährdet, einen Herzinfarkt oder apoplektischen Insult als Folge einer Gefäßokklusion zu erleiden [75, 102, 104]. AGEs scheinen dabei eine wichtige Rolle in der Entstehung und Beschleunigung von arteriosklerotischen Gefäßläsionen zu spielen. Es wurde gezeigt, daß AGEs in atheromatösen Plaques akkumulieren [69, 110]. Immunhistologische Untersuchungen des Nierengewebes von normalen und diabetischen Ratten haben gezeigt, daß sich AGEs in der glomerulären Basalmembran, im Mesangium, in den Podozyten und in den Tubuluszellen ablagern [131]. Nichtdiabetischen Tiere wurde über längere Zeit AGE modifiziertes Spezies-spezifisches

Albumin infundiert. Diese Behandlung resultierte in glomerulärer Hypertrophie, Basalmembranverdickung, Mesangiumexpansion und Albuminurie, was in der Gesamtheit mit einer glomerulären Pathologie der diabetischen Nephropathie in Einklang zu bringen ist [129, 130].

Ein negativer Einfluß der AGEs auf die Entstehung einer Retinopathie läßt sich vermuten, da gezeigt wurde, daß AGEs entlang der kleinen Blutgefäßen menschlicher Retinas von Diabetikern akkumulieren [85]. Dies war bei keiner der nicht-diabetischen Kontrollen nachweisbar. Auch bei der Kataraktentstehung scheinen die AGEs involviert zu sein, wovon die Diabetiker nicht nur häufiger, sondern auch viel früher betroffen sind. Ein Hinweis darauf ergibt sich, da die Akkumulation von AGEs besonders langlebige Proteine betrifft, wie Kollagen [112, 113], Knorpel [34, 127] und die Linsenmatrix [11, 76]. Als ein Hauptpathomechanismus der Linsenveränderung wird eine, durch die Einlagerung der AGEs, ausgelöste Oxidation der Linsenmatrix bzw. eine Quervernetzung der Linsenproteine angenommen [147].

Darüberhinaus sind AGE-Ablagerungen in Haut, Lunge, Intestinum, Zwischenwirbelscheiben [110] und in den pathologischen Läsionen des M. Alzheimer [108, 115, 128] und des M. Parkinson [23] immunolokalisiert worden.

Es scheinen mehrere Wege zu existieren, durch welche die AGEs schädigenden Einfluß auf Gewebe nehmen können. Zum einen sind die AGEs in der Lage, komplexe Quervernetzungen auszubilden [18, 19]. Diese können vom Körper nicht mehr gespalten werden, da keine entsprechenden Enzyme vorhanden sind. Proteine, die diesem Prozeß unterliegen, sind in der Mehrheit stabil und langlebig, obwohl auch kurzlebige Proteine davon affektiert werden können [87, 114]. Die durch die AGEs induzierte pathologische Quervernetzung führt beim Beispiel Kollagen zu einer erhöhten Starrheit der Proteinmatrix, was eine verringerte Elastizität des Gewebes zur Folge hat [114]. Dies macht die betroffenen Kollagenanteile weniger angreifbar für Metalloproteinasen, die für den Abbau der Kollagene verantwortlich sind [84, 106]. Eine Veränderung beim Remodelling kann z.B. bei einer gleichzeitigen Funktionsstörung der Kollagensynthese [60] in einer Fibrose oder Sklerose resultieren. Ein weiterer Weg erschließt sich daraus, daß nicht nur oxidativer Streß die Bildung von AGEs begünstigt, sondern vielmehr AGEs in der Lage sind oxidativen Streß zu induzieren [87]. Der oxidative Streß seinerseits modifiziert Proteine, Lipide und DNA und führt so zu Dysfunktionen der Organsysteme. Eine letzte Möglichkeit, Zellen direkt zu beeinflussen, besteht in der Interaktion mit AGE-Rezeptoren, wobei die Wirkung über entsprechende Signalkaskaden

gesteuert wird [121]. Aus diesen Möglichkeiten der AGE Wirkung ergeben sich die Behandlungsansätze, die auf verschiedene Wege versuchen, die pathologischen Eigenschaften der AGEs auf das Gewebe zu vermindern und zu blockieren.

1.2.3 Therapeutische Ansätze

Aus den dargestellten pathophysiologischen Mechanismen ergeben sich verschiedene Therapieansätze, deren Ziel es ist, die AGE-Mechanismen zu unterbinden. Es ist möglich die AGE-Bildung durch Substanzen wie Aminoguanidin oder Pyridoxamin zu inhibieren [36, 82]. Aminoguanidin reagiert mit terminalen Aminogruppen von Intermediärprodukten der Maillard-Reaktion und verhindert dadurch die weitere Umlagerung zu AGEs und deren Quervernetzung. Untersuchungen an der Ratte haben gezeigt, daß durch die Inhibition der AGE-Bildung durch Aminoguanidin die altersabhängige Herzhypertrophie und die erhöhte Arterienrigidität signifikant gesenkt werden konnte [29, 74]. Ein weiterer Ansatz besteht darin, die schon quervernetzten AGE-Formationen mit sogenannten „cross-link breakern“ wieder aufzubrechen: Da AGEs während des Alterns akkumulieren, reicht es bei bereits gealterten Individuen nicht aus, nur die weitere Entstehung von AGEs zu inhibieren. Durch die Möglichkeit der Zerstörung bestehender AGE-Addukte durch „cross-link breaker“ ist eine weitere Therapiemöglichkeit gefunden worden. Der Prototyp dieser Substanzklasse ist N-Phenacylthiazolbromid (PTB). Diese Substanz ist in der Lage, die Kohlenstoff-Kohlenstoff-Brücken zwischen Carbonylen von AGE-Quervernetzungen *in vitro* und *in vivo* aufzubrechen [125]. Als Folgeprodukt wurde mit 4,5-Dimethyl-3-Phenacylthiazolchlorid (ALT-711) ein stabileres und aktiveres Derivat entwickelt. Alte Hunde, die für vier Wochen mit ALT-711 behandelt wurden, zeigten eine signifikant verbesserte Herzfunktion und eine verminderte myokardiale Steifigkeit in bezug zu der Kontrollgruppe [4].

Die Interaktion von AGEs mit ihren Rezeptoren ist ein weiterer Mechanismus, mit dem man versuchen kann, AGE bedingte Veränderungen zu inhibieren. Es hat sich gezeigt, daß es möglich ist durch den löslichen extramembranösen Anteil des Rezeptors für AGEs (RAGE) AGEs zu binden. „Soluble RAGE“ (sRAGE) dient somit als kompetitiver Inhibitor bei der Bindung von AGEs an deren Rezeptoren. Untersuchungen haben gezeigt, daß die Behandlung mit sRAGE die Wundheilung bei diabetischen Mäusen verbessert [40] und darüber hinaus nicht nur die beschleunigte Atherosklerose verhindert,

sondern auch eine bestehende Atherosklerose in diabetischen apolipoprotein E-null Knock-out Mäusen stabilisiert [20, 65].

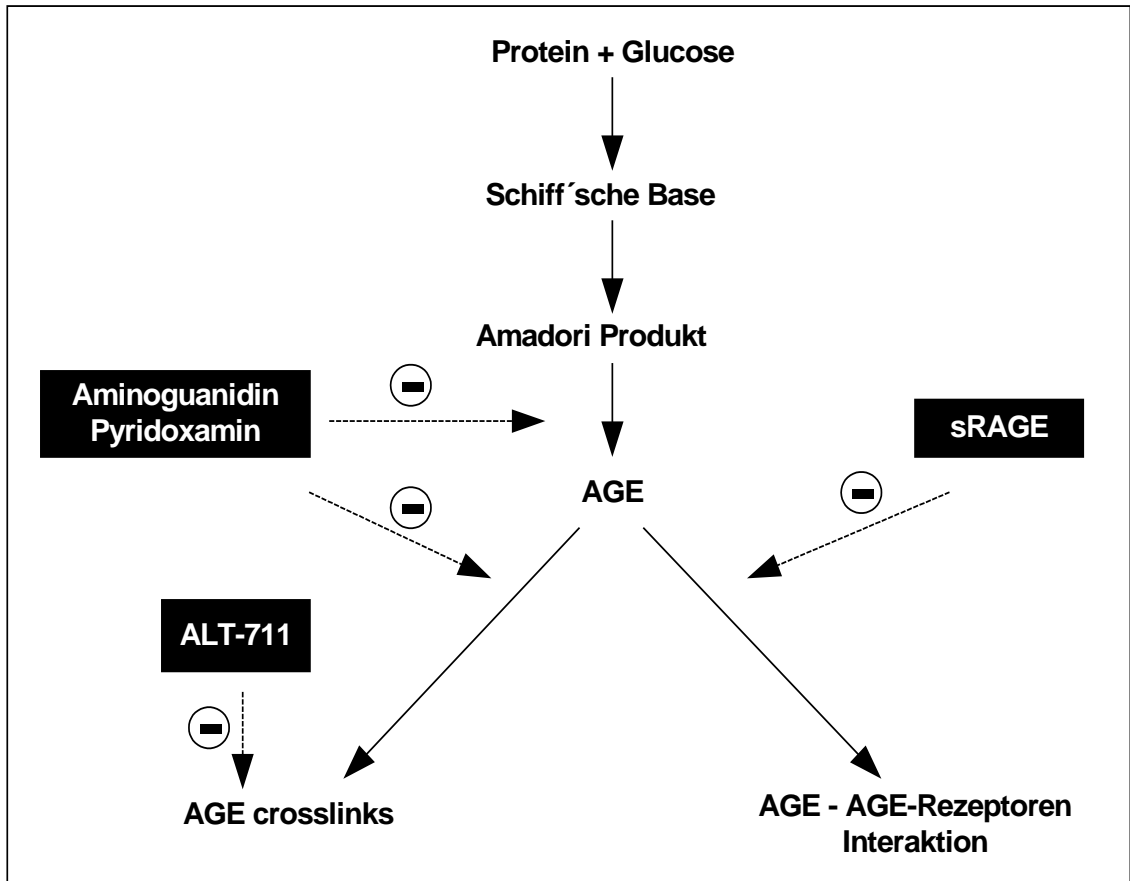


Abbildung 2

Möglichkeiten den pathogenen Einfluß der AGEs auf verschieden Stufen zu bekämpfen. Aminoguanidin und Pyridoxamin hemmen die Entstehung der AGEs und deren Umlagerung zu AGE cross-links. Schon bestehende cross-links können durch ALT-711 wieder aufgebrochen werden, wozu die körpereigenen Enzyme nicht in der Lage sind. sRAGE kann als falscher Ligand, AGEs binden und verhindert so die Interaktion mit AGE-Rezeptoren.

1.3 AGE Rezeptoren

Als die AGEs entdeckt wurden und man erkannt hatte, daß AGEs sich *in vivo* nicht durch Enzymsysteme spalten lassen, spekulierte man, daß Rezeptorsysteme existieren müßten, durch die AGE-Produkte aus dem Gewebe entfernt werden und ihr schädigender Effekt limitiert werden könnte. Es wurden verschiedene Rezeptoren identifiziert, die spezifisch AGE-modifizierte Proteine erkennen und binden. Diese Rezeptoren scheinen eine Schlüsselrolle in der AGE- Biologie bzw. Pathologie zu spielen. Zu den AGE-Rezeptoren zählen AGE-R1 (OST-48), AGE-R2 (80 K-H), AGE-R3 (Galectin-3), Macrophage Scavenger Receptor II (ScR-II) und RAGE (Receptor for AGE).

1.3.1 AGE-R1 (OST-48)

Aus den Membranen von Rattenleberzellen wurden zwei AGE-bindende Proteine, p60 und p90, extrahiert. Es wurde bewiesen, daß p60 mit OST-48 identisch ist. Das 48 kD Protein ist ein Mitglied aus dem Oligosaccharyltransferasekomplex, welcher aus mikrosomalen Membranen isoliert wurde [73]. Dieser Komplex zeigt die Fähigkeit, AGEs endozytotisch aufzunehmen und zu binden. Daher wird er in der neuen Nomenklatur als AGE-R1 bezeichnet. Die Rezeptorexpression korreliert mit der Höhe der AGE-Level, so daß ein hoher AGE-Level zu einer Hochregulation des Rezeptors führt. In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, daß sich in Nieren von diabetischen Mäusen, welche durch die Krankheit geschädigt wurden, eine Dysbalance zwischen den AGE-Level des Nierengewebes und der Rezeptorexpression im Mesangium zeigte. Trotz hoher AGE-Level war die AGE-R1-Expression jedoch unverhältnismäßig gering [47, 142].

Bei Patienten mit diabetischen Komplikationen sinkt die AGE-R1-Expression bei steigendem Serum AGE-Level, wohin gegen bei Patienten ohne diabetische Komplikationen eine mit dem Serum AGE-Level steigende AGE-R1 Expression zu verzeichnen ist [46]. Dies läßt die Annahme zu, daß der AGE-R1 eine protektive Funktion für das Gewebe hat, indem er die AGEs aufnimmt und einem noch

unbekannten Abbaumechanismus zuführt. Durch Störung dieser Homöostase könnte das Gewebe eher dem schädigenden Einfluß der AGEs ausgesetzt sein.

1.3.2 AGE-R2 (80 K-H)

Dieser Rezeptor war wie der AGE-R1 schon länger bekannt als das AGE-bindende Protein p90, welches mit 80 K-H identisch ist [73]. In der neuen Nomenklatur wird dieses 80 kD Phosphoprotein AGE-R2 genannt.

Dieser Rezeptor ist ein tyrosinphosphoryliertes Substrat der Proteinkinase C (PKC), welcher durch AGEs induzierbar ist. Über diesen Weg ist der Rezeptor an der Signaltransduktion von Fibroblasten und epidermalen Karzinomzellen via Proteinkinase C involviert [49, 105]. Die physiologische Funktion des Rezeptors ist bisher weitgehend unbekannt. Dem Rezeptor wird jedoch eine Rolle im Fibroblast Growth Factor (FGF) Signalweg zugesprochen [62].

1.3.3 AGE-R3 (Galectin-3)

Der AGE-Rezeptor 3 wurde zuerst als ein Mitglied der Lectinfamilie identifiziert [7], als Galectin-3 terminiert und nun aufgrund seiner Affinität zu AGEs als AGE-R3 bezeichnet. Dieses 30 –35 kD Protein ist involviert in Zellwachstum, Adhäsion, Zelldifferenzierung, Apoptose und maligne Transformation [70, 80, 146].

Die Expression von AGE-R3 ist abhängig von der Replikationskapazität der Zelle, was eine verringerte Expression im Alter in Verbindung mit einem Verlust der Rezeptorregulation bedeutet [98]. Die Partizipation des Rezeptors in der Regulation der Zellproliferation und der Apoptose wird durch seine prä-mRNA splicing Aktivität und seine Assoziation zu bcl-2, einem apoptosemodulierenden Protein, erklärt. In proliferierenden Zellen wird der Rezeptor hochreguliert, was eine Beteiligung im Vorgang des Zellwachstums impliziert. Die Verknüpfung zu bcl-2 läßt vermuten, daß der Rezeptor eine potentielle Wirkung auf die Apoptose Funktion besitzt, da bcl-2 ein gut charakterisierter Suppressor der Apoptose ist [143].

In bezug auf die Beteiligung an der malignen Transformation stellte sich heraus, daß keine einheitliche tumorabhängige Hoch- oder Herabregulation des Rezeptors besteht. Dies ist vielmehr von dem Ursprungsgewebe der Malignome abhängig. So zeigt sich eine

Hochregulation des Rezeptors in Tumoren des Zentralnervensystems [16], in Malignomen der Epidermis, Mamma und Prostata jedoch eine reduzierte Expression. Die Expression von AGE-R3 wird in proliferierenden glatten Muskelzellen induziert. Auch in den Muskelzellen von Arterien, bei in experimentellen Tiermodellen iatrogen ausgelöster Atherosklerose, als auch in menschlichen Patienten mit fortgeschrittenen atherosklerösen Läsionen wird die Expression des Rezeptors hochreguliert [3, 86]. In hyperglykämisch geschädigtem Gewebe zeigt sich eine gesteigerte Expression des Rezeptors, was auf die beschleunigte AGE Akkumulation zurückgeführt wird. Mesangiumzellen reagieren mit einer gesteigerten AGE-R3-Expression, wenn sie AGE-modifizierten Proteinen ausgesetzt sind [101]. Diese Hochregulation des Rezeptors in Geweben, die mit erhöhten AGE-Gehalten konfrontiert werden, impliziert durch die postulierte Clearancefunktion einen protektiven Effekt des Rezeptors [98].

1.3.4 Macrophage Scavenger Receptor II (ScR-II)

Der Macrophage Scavenger Receptor II ist Mitglied der großen Familie der Scavenger-Rezeptoren, die aus mindestens sechs Klassen besteht, wobei der ScR-II zur Klasse A zählt. Alle Klassen haben gemein, dass sie die Aufnahme von modifizierten Low-Density-Lipoproteinen (LDL) beeinflussen [68].

Der ScR-II ist kein sehr spezifischer Rezeptor von AGEs, da er eine breite Auswahl von Liganden besitzt, wobei AGEs und oxidierte LDLs (oxLDL) die Hauptliganden sind [33]. Der Rezeptor scheint eine gewichtige Rolle bei der Entstehung von atherosklerotischen Läsionen zu spielen [58]. AGEs induzieren die Expression von ScR-II auf Makrophagen, die in die Gefäßwände einwandern. Der ScR-II vermittelt die Adhäsion der Makrophagen in den atherosklerotischen Plaques, die Ausschüttung von Zytokinen wie z.B. TNF- α , IL-6, sowie die Formierung von Schaumzellen der Plaques [33]. Der ScR-II vermittelt jedoch nicht nur proatherogentische Faktoren, sondern auch antiatherogentische, wobei die Imbalance zu Gunsten der proatherogentischen Einflüsse ausfällt.

Welchen Stellenwert die Rezeptorinduktion durch AGEs besitzt ist jedoch umstritten, da dieser Rezeptor eher als Clearance- Rezeptor denn als Signalrezeptor diskutiert wird.

1.3.5 Receptor for AGEs (RAGE)

Der Receptor for AGE (RAGE) ist ein 30-45 kD Protein, welches ein Mitglied der Immunoglobulin Superfamilie ist und auf Zelloberflächen exprimiert wird [88]. RAGE ist ein Multiligandprotein, welches nicht nur spezifisch AGEs bindet, sondern auch S100/Calgranuline und β -Faltblatt-Fibrillen, welche aus verschiedenen Amyloiden bestehen und Amphoterin, welches für Neuronendifferenzierung wichtig ist [21, 54, 111]. Eine erhöhte Expression von RAGE wurde in Endothelzellen und glatten Muskelzellen im Rahmen von Nierenerkrankungen [2, 14], in Neuronen und Astrozyten in Gehirnen von Patienten, die an M. Alzheimer litten [108] und in Herzgewebe von diabetischen Ratten demonstriert [118]. AGEs sind in der Lage die RAGE-Expression im Sinne einer positiven Rückkopplung zu stimulieren. So korrelieren erhöhte AGE-Level in Nierengewebe mit einer gesteigerten RAGE-Expression in Mesangiumzellen [47]. Desweiteren wurde demonstriert, daß AGEs die RAGE-Expression in den Podozyten von diabetischen Patienten induzieren [120]. Die Ligand-Rezeptor Interaktion stimuliert nicht nur die Expression des Rezeptors, sondern letztendlich auch die rezeptorvermittelten Effekte in der Zelle [111]. Im Gegensatz zu AGE-R1 und AGE-R3 mit Clearance-Funktion ist RAGE ein Promotor von intrazellulären Signalkaskaden, wenn er durch seine Liganden aktiviert wird [131]. RAGE induziert oxidativen Streß in der Zelle, indem „reaktive oxygen species“ (ROS) entstehen [134]. Durch den intrazellulären oxidativen Streß wird die Bildung des Transkriptionsfaktors NF- κ B angeregt [141]. Dieser Transkriptionsfaktor disloziert in den Zellkern und stimuliert die NF- κ B-abhängige Genexpression [6]. Dadurch werden multiple vaskuläre Homöostasefunktionen gestört. Gene, die durch NF- κ B aktiviert werden sind zum Beispiel Zytokine, Rezeptoren für Gerinnungsfaktoren, Leukozytenadhäsionsmoleküle und Endothelin-1 [87]. AGEs induzieren Mitose-aktivierende Proteine wie z.B. p38MAPK, die ihrerseits die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen veranlassen [144].

Es wird angenommen, daß RAGE durch seine intrazelluläre Signaltransduktion einen erheblichen Beitrag zu der akzelerierten Atherosklerose bei Diabetes beiträgt, da es durch eine Kompetition um AGEs durch sRAGE zu einer vollständigen Suppression der Atherosklerose führt [94]. Die Kompetition von RAGE hat weiter gezeigt, daß die durch S100/Calgranuline vermittelte Bildung von proinflammatorischen Mediatoren, die auch von NF- κ B abhängig ist, wirksam inhibiert werden kann [50].

1.4 Zielsetzung

Da viele Untersuchungen der AGEs und deren Rezeptoren besonders im Zusammenhang mit Diabetes nur an der Niere etabliert wurden, war es Ziel dieser Arbeit, die altersabhängige Verteilung der fünf AGE-Rezeptoren am menschlichen Herzen zu untersuchen. Es sollte weiterhin geklärt werden, ob die AGE-Rezeptorexpression einen Zusammenhang zwischen klinischen Parametern des herzchirurgischen Patientenguts erkennen läßt und ob die Rezeptorexpression einen pathophysiologischen oder protektiven Effekt hervorbringt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

β-Mercaptoethanol	Fluka, Seelze
10x Reaktionspuffer	Promega, Mannheim
5x Erststrang-Puffer	Gibco, Karlsruhe
Agarose	Serva, Heidelberg
Ammoniumpersulfat (APS)	Biomol, Hamburg
Benzonase	Merck, Darmstadt
Bichinonsäure-Lösung (BCA)	Sigma, Deisenhofen
Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
Bovines Serumalbumin Fraktion V	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Bio-Rad, München
Cäsiumchlorid	Merck, Darmstadt
Comassi Blau	Bio-Rad, München
Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP)	Invitex, Berlin
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Dithiothreitol (DDT)	Gibco, Karlsruhe
DNA-Leiter 100 Bp	Promega, Mannheim
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol 70%	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylendinitrietetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Glycerol	Sigma, Deisenhofen
Glycin	Biomol, Hamburg
Guanidinthiocyanat (GTC)	Serva, Heidelberg

Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kupfer-II-sulfat	Sigma, Deisenhofen
Luminol	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Roth, Karlsruhe
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen
N,N,N',N',Tetramethyldiamin (TEMED)	Sigma, Deisenhofen
Natriumazid	Fluka, Seelze
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Biomol,Hamburg
Natriumhydroxid 1M	Merck, Darmstadt
Natriumvanadat	Sigma, Deisenhofen
N-Lauroylsarcosyl	Fluka, Seelze
p-Cumarsäure	Sigma, Deisenhofen
Phenol	Amresco, Solon, Ohio, USA
Ponceau	Sigma, Deisenhofen
Proteinase-Inhibitor	Roche, Mannheim
Proteinstandard See blue Plus 2	Invitrogen, Karlsruhe
RNAse Inhibitor	Gibco, Karlsruhe
Salzsäure 1M	Merck, Darmstadt
Stickstoff	Messer, Griesheim
Superscript™ II Reverse Transkriptase	Gibco, Karlsruhe
Taq-Polymerase	Promega, Mannheim
Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
TWEEN 20	Sigma, Deisenhofen
Wasserstoffperoxid	Fluka, Seelze
Xylencyanol	Bio-Rad, München

2.1.2 Verwendete Puffer und Lösungen

2x SDS Probenpuffer

250 mM Tris-HCl, pH 6,8

4 % SDS

20 % Glycerin

40 mM DDT

8 % β -Mercaptoethanol

2 mM EDTA

ad. ddH₂O

0,01 % Bromphenolblau

4x Elektrodenpuffer

50 mM Tris

380 mM Glycine

0,1 % SDS

ad. ddH₂O

Blot-Puffer

25 mM Tris-HCl pH 8,2

192 mM Glycin

20 % Methanol

0,0375 % SDS

ad. ddH₂O

Ponceau-Färbelösung

0,5 g Ponceau

1 ml Essigsäure

ad. 100 ml ddH₂O

Tris-gepufferte Salzlösung-Tween (TBS-T)

20 mM Tris-HCl, pH 7,5

150 mM NaCl

0,1 % Tween 20

ad. ddH₂O

GTC-Lösung

4 M Guanidinthiocyanat

1 % N-Lauroylsarcosyl

25 mM Natriumacetat, pH 6,0

1 mM EDTA, pH 6,5

1 M β-Mercaptoethanol

ad. ddH₂O

CsCl-Kissen

5,7 M CsCl

100 mM EDTA, pH 6,5

ad. DEPC-H₂O

6 mM β-Mercaptoethanol

steril filtrieren (Nalgene-Filter)

TSPE-Puffer

10 mM Tris-HCl

1 % N-Lauroylsarcosyl

5 % Phenol

1mM EDTA, pH 6,5

ad. DEPC-H₂O

steril filtrieren (Nalgene-Filter)

10x Probenpuffer für Agarosegele

50 % Glycerol

1 mM EDTA

0,01 % Xylencyanol

ad. ddH₂O

Lysispuffer

50 mM Tris-HCl, pH 6,7

2 % SDS

1 mM Na₃VO₄

TAE-Puffer

121 g Tris

100 ml 250mM EDTA, pH 8

29 ml Essigsäure

ad. 500 ml ddH₂O

Luminollösung

500 µl 250 mM Luminol in DMSO gelöst

220 µl 90 mM p-Cumarsäure in DMSO gelöst

ad. 50 ml mit 100 mM Tris-HCl, pH 8,5

H₂O₂ Lösung für Chemolumineszenz

5,4 mM in 0,1 M Tris-HCl pH 8,5

Luminolgebrauchslösung: Luminollösung und H₂O₂ Lösung 1:1 mischen.

2.1.3 Geräte

Blot-Kammer	Bio-Rad, München
Brutschrank	Hereaus, Hanau
Elisa-Reader	SLT, Crailsheim
Feinwaage BP210S	Sartorius, Göttingen
Gelelektrophorese-Kammer	Bio-Rad, München
Handy Step Multipipette	Brand, Wertheim
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen
Mikrowelle	AEG, Frankfurt a. Main
PAGE-Gelkammer	Bio-Rad, München
pH-Meter	WTW, Weilheim
Photometer Ultrospec 2000	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Polaroidkamera DS 34	Polaroid, Offenbach
Power Pack 25	Biometra, Göttingen
Probenschüttler KS 250 basic	IKA Labortechnik, Staufen
Reinstwasseranlage Milli-Qplus PF	Millipore, Eschborn
Thermocycler TRIO-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Ultraturrax T8	IKA Labortechnik, Staufen
Ultrazentrifuge Optima Max	Beckman Coulter, Unterschleißheim-
UV-Transilluminator	Biometra, Göttingen
Vakuumzentrifuge concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY USA
Zentrifuge Biofuge fresco	Hereaus, Hanau
Zentrifuge Varifuge 3.0R	Hereaus, Hanau

2.1.4 Sonstige Materialien

Blot-Papier		Schleicher& Schuell, Düren
Filterpapier		Whatman, Maidstone, UK
Geldokumentationsfilm Polapan 665PN		Polaroid, Offenbach
Hyperfilm		Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Nitrocellulosemembran	0,45µm	Bio-Rad, München
Porengröße		

2.2 Methoden

2.2.1 Menschliches Herzohrgewebe

Das verwendete menschliche Herzgewebe ist das morphologische Korrelat des rechten Vorhofes, welches während kardiochirurgischen Eingriffen unter Verwendung der Herz-Lungen-Maschine entfernt wird. Dies ist nötig, um den venösen Schenkel des Systems, in Form eines großlumigen Katheters über den rechten Vorhof in die Vena cava zu legen. Direkt nach der operativen Entnahme wurden die Herzohren in flüssigem Stickstoff eingefroren, um später dauerhaft bei -80°C gelagert zu werden.

Die Patienten wurden vor der Operation durch einen Informationsbogen und ein Aufklärungsgespräch über Sinn und Zweck, sowie Verwendung und Handhabung der Proben informiert. Der Patient musste auf einer Einverständniserklärung schriftlich dokumentieren, ob die Proben zu Forschungszwecken verwendet werden durften. Im Falle der Ablehnung wurde das entfernte Herzohrgewebe verworfen. Diese Vorgehensweise wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bestätigt.

Aus dem gesammelten Pool der Gewebeproben wurden drei Altersgruppen gebildet: Kinder (jünger 14 Jahre, mittleres Alter : $2,4 \pm 1,1$ Jahre, $n = 10$), Erwachsene (jünger als 50 Jahre, mittleres Alter : $45,3 \pm 0,8$ Jahre, $n = 23$), Senioren (älter als 70 Jahre, mittleres Alter : $76,4 \pm 0,4$ Jahre, $n = 27$). Der Grund für die Operationen bei den Erwachsenen

und Senioren war eine Koronare Herzkrankheit (KHK), die eine operative Revaskularisierung durch Aorto-Coronare-Bypässe (ACB) nötig machte. Der Schweregrad der KHK wurde nach den Richtlinien der New York Heart Association (NYHA) eingeteilt und ergab ein Mittel der erwachsenen und alten Patienten im Stadium II. Dieses Stadium ist definiert mit Beschwerden und Leistungseinschränkung bei mittelschwerer körperlicher Belastung, z.B. Gartenarbeit. Der Anlaß der Herzoperationen bei den Kindern erklärt sich aus kongestiven Herzfehlern: Ventrikelseptumdefekt (VSD), Vorhofseptumdefekt (ASD), Fallot- Tetralogie. Daher ist eine NYHA-Klassifikation bei diesen Patienten nicht möglich. Eine Übersicht von weiteren klinischen Patientenangaben gibt Tabelle 1.

Die Gewebeproben der Erwachsenen und Senioren stammen aus der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie der Martin- Luther- Universität Halle- Wittenberg, die der Kinder aus der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie der Universität Leipzig.

Tabelle 1 Übersicht über klinische Daten der Gruppen der Erwachsenen und Senioren

n = Anzahl der verwerteten Daten ; k.A. = keine Angaben ; LVEDP = linksventrikulärer enddiastolischer Druck; n.s. = nicht signifikant. Der p-Wert wurde mittels eines Studentischen T-Tests für jedes einzelnes Datenpaar errechnet, um signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zu erkennen.

	Alter	NYHA Stadium	Ejektionsfraktion	Herzindex	Herzminutenvolumen	LVEDP	Anzahl Bypässe	Serumkreatinin (µmol/L)	Serumharnstoff (mmol/L)
Erwachsene	45.3	2	54.6	2.75	5.6	16.2	3.1	81.2	5.2
n	23	23	21	9	9	16	21	21	20
k.A.	-	-	2	14	14	7	2	2	3
Senioren	76.4	2	63.2	2.78	5.7	16.7	3.4	99.1	7.41
n	27	27	26	6	6	20	25	24	23
k.A.	-	-	1	21	21	7	2	3	4
p	<0.001	n.s	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<0.01	<0.01

2.2.2 RNA-Isolierung

Für die Gewinnung der RNA aus dem Gewebe wurde die CsCl-Methode verwendet [27]. 100 mg der bei -80°C gelagerten Herzohrproben wurden abgewogen und in Aluminiumfolie verpackt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Sie wurden mit einem Hammer mechanisch pulverisiert und mit 1 ml GTC- Lösung durch einen Ultraturrax homogenisiert. Nach jeder Probe wurde der Stab des Ultraturrax mit einer 0,1%igen SDS-Lösung und anschließend mit destilliertem Wasser gespült. Zur Herstellung des CsCl-Dichtegradienten wurde 1 ml des CsCl-Kissens in ein Safe-Seal-Tube gegeben und das Homogenisat, im Verhältnis 1 : 1 vorsichtig darüber geschichtet. Das Austarieren der einzelnen Proben geschah mit GTC-Lösung. Anschließend wurden die Proben in einer Ultrazentrifuge (Rotor MLS 130) bei $100000 \times g$ und Raumtemperatur über 23 Std zentrifugiert. Das Prinzip beruht darauf, daß nur die RNA durch die hohe Dichte ($> 1,8 \text{ g / ml}$) im Gegensatz zu anderen Makromolekülen, wie DNA, Proteine, Lipide oder Polysaccharide unter diesen Bedingungen durch die dichte CsCl-Lösungen ($5,7 \text{ M} = 1,7 \text{ g / ml}$) sedimentiert, während die anderen Komponenten im Überstand verbleiben.

Der Überstand und die Zwischenphase wurden dekantiert und das RNA-Pellet auf Eis zweimal in je $100 \mu\text{l}$ TSPE-Puffer in ein Röhrchen überführt. Durch den Zusatz von 0,1 Vol.% 3 M Na-Acetat (pH 6,0) und 4 ml 96% Ethanol wurde die RNA über Nacht bei -20°C ausgefällt. Anschließend wurde der Ansatz bei $5000 \times g$ bei 4°C für 1 Std. zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das RNA-Pellet, auf Eis gehalten, nach dem Trocknen zweimal in je $100 \mu\text{l}$ mit DEPC behandeltem destilliertem Wasser aufgenommen. Für die nun folgende zweite Fällung über Nacht bei -20°C wurde erneut 0,1 Vol.% 3 M Na-Acetat (pH 6,0) und 2,5 Vol.% 96% Ethanol hinzugegeben. Im Anschluß daran folgte eine Zentrifugation bei $13000 \times g$ bei 4°C über 30 min, wonach der Überstand dekantiert, das Pellet zweimal in $500 \mu\text{l}$ 70 % Ethanol gewaschen und bei $13000 \times g$, 4°C , 10 min erneut zentrifugiert wurde. Nachfolgend wurde das Pellet in der Vakuum-Zentrifuge für 5 min getrocknet und anschließend in $50 \mu\text{l}$ DEPC-behandeltem destilliertem Wasser aufgenommen.

2.2.2.1 RNA Konzentrationsbestimmung

Die Reinheit und Konzentration der RNA wurde mit einem UV Spektrophotometer bei 260 bzw. 280 nm gegen Wasser gemessen. Der Konzentrationsbestimmung liegt die Beziehung $1 \text{ OD}_{260} = 40 \mu\text{g} / \text{ml RNA}$ zugrunde. Der Reinheitskoeffizient errechnet sich aus dem Verhältnis $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ und ist eine Größe, die über die Verunreinigung der RNA durch Proteine Auskunft gibt. Für reine Nukleinsäuren sollte ein Reinheitskoeffizient von $\geq 1,7$ erreicht werden. Für die Konzentrationsbestimmung wurde die RNA 1 : 100 mit DEPC-Wasser verdünnt. Die RNA wurde im Anschluß auf $50 \text{ ng} / \mu\text{l}$ verdünnt und aliquotiert bei -20°C aufbewahrt.

2.2.2.2 RNA Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Intaktheit der RNA wurde diese auf einem 1 % Agarose-Gel aufgetrennt. Dazu wurde 1,5 g Agarose in 150 ml TAE-Puffer gegeben, in der Mikrowelle aufgeköcht und danach mit $15 \mu\text{l}$ Ethidiumbromid versetzt in die Gelkammer gegossen. Als Laufpuffer diente auch der TAE-Puffer. Von der unverdünnten RNA-Probe wurde $1 \mu\text{l}$ mit $1 \mu\text{l}$ 10x Probenpuffer und $5 \mu\text{l}$ DEPC-Wasser gemischt und bei konstanter Spannung von 90 V aufgetrennt.

2.2.3 Reverse Transkription (RT)

Die Reverse Transkription ist ein Verfahren, um RNA mittels des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA (complementary DNA) umzuschreiben. Während diesem Vorgang entstehen durch die Verwendung von Zufalls(Random)-Primern verschieden lange cDNA Einzelstränge. Die Reverse Transkriptase synthetisiert die cDNA aus den im Reaktionsansatz befindlichen Nucleotidtriphosphaten dATP, dGTP, dTTP, dCTP zwischen den angelagerten Primern in $5' \rightarrow 3'$ Richtung.

Für die reverse Transkription wurde folgender Ansatz verwendet:

RNA (50 ng / μ l)	6 μ l
5x Erststrang-Puffer	5 μ l
dNTP (12,5 mM)	1 μ l
Random-Primer (30 ng / μ l)	3 μ l
DEPC-Wasser	5 μ l
<hr/>	
Ansatz	20 μ l

Dieser Ansatz wurde für 3 min auf 72°C erhitzt, um die RNA zu denaturieren, und anschließend auf 4°C heruntergekühlt. Jetzt konnten folgende restlichen Komponenten hinzupipettiert werden:

DTT (0,1 mM)	2,5 μ l
RNAse Inhibitor (35 U / μ l)	0,3 μ l
Superscript™ II Reverse Transkriptase (200 U / μ l)	0,3 μ l
DEPC-Wasser	1,9 μ l
<hr/>	
Ansatz	5 μ l

Die endgültige Reaktion erfolgte für 30 min bei 42°C. Danach wurde für 1 min auf 95°C erhitzt, um die reverse Transkriptase zu inaktivieren und anschließend auf 4°C abgekühlt. Aus den oben angegebenen Volumina ergibt sich ein gesamtes RT-Volumen von 25 μ l. Es wurde sichergestellt, daß alle Chemikalien und Geräte RNAse-frei waren. Alle Reagenzien wurden auf Eis gelagert.

2.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist ein Verfahren, mit der spezifische DNA-Abschnitte einer gesamtgenomischen DNA oder cDNA vervielfältigt werden können. Die PCR ist als thermozyklische Reaktion in drei Schritte während eines Zyklus eingeteilt. Erstens Denaturierung der DNA bei 95°C, um doppelsträngige DNA (dsDNA) in amplifizierbare einzelsträngige DNA (ssDNA) aufzuspalten. Im zweiten Schritt wird die Reaktion auf die optimale Hybridisierungstemperatur der spezifischen Startermoleküle (Primer) der gesuchten Gene heruntergekühlt. Bei dieser Temperatur können sich die Primer an die komplementären Abschnitte der ssDNA anlagern und entsprechend kurze doppelsträngige Abschnitte bilden (Primer-Annealing). Im dritten und letzten Schritt wird ausgehend von der 3'-OH-Gruppe der Primer durch die Taq-Polymerase in Anwesenheit von Nukleotiden der Einzelstrang zum komplementären Doppelstrang synthetisiert. Dazu wird die Reaktionstemperatur auf das Optimum der Polymerase eingestellt. Es entstehen in einem Zyklus aus einem doppelsträngigen DNA-Molekül zwei neue, identische Doppelstränge. So ist es möglich die Ausgangs-DNA je nach Anzahl der Reaktionszyklen (n) exponentiell zu vermehren (2^n -mal). Die Anzahl der Amplifikationszyklen ist von der Expressionstärke der gesuchten in cDNA umgeschriebenen RNA abhängig und muß in empirischen Versuchen bestimmt werden. Für die PCR-Reaktion wurde folgender Ansatz verwendet:

RT-Ansatz s.o	1 µl
10x Reaktionspuffer	2,5 µl
dNTP (100 mM)	3 µl
sense Primer (10 pmol / µl)	0,5 µl
antisense Primer (10 pmol / µl)	0,5 µl
Taq-Polymerase (5 U / µl)	0,2 µl
ddH ₂ O	17,3 µl
<hr/>	
Gesamtansatz	25 µl

Dieser Ansatz wurde mit 50 µl Mineralöl überschichtet. So wurde ein Flüssigkeitsverlust durch Kondensation, der zu einer Volumenveränderung des PCR-Ansatzes führt, verhindert. Bei 95 °C erfolgte eine einminütige Denaturierung der cDNA vor dem Beginn der Amplifikationsschritte:

1. Denaturierung	95°C	20 sec
2. Primer-Hybridisierung	x °C (s. Tab. x)	30 sec
3. Strangsynthese	72°C	30 sec

Nach Ablauf der aus Tab. 2 zu entnehmenden Zyklen wurde die Reaktion durch eine bei 72°C stattfindende und 5 min währende Strangsynthese beendet und anschließend auf 4°C heruntergekühlt. Nun wurde jede Probe mit 5 µl 10x Probenpuffer versetzt und kurz abzentrifugiert. Der PCR-Ansatz konnte jetzt mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt werden. Für die Gene von AGE-R1, AGE-R2, AGE-R3, Macrophage Scavenger Receptor II und 18S wurde ein 1%iges Gel (6 g Agarose / 600 ml 1x TAE-Puffer) verwendet und für RAGE ein 1,2%iges Gel (7,2 g Agarose / 600ml). Der TAE-Puffer diente sowohl als Gel- als auch als Laufpuffer. Die Auftrennung fand bei einer konstanten Spannung von 150 V statt. Jedes Gel wurde mit Ethidiumbromid (0,1 µl 1 M / 1 ml Gel) versetzt, um die DNA-Fragmente im UV-Licht sichtbar zu machen. Da Ethidiumbromid ein fluoreszierender Stoff ist, der mit Nukleinsäuren interkaliert ist es möglich die Größe der amplifizierten cDNA-Fragmente zu bestimmen und die Stärke der Banden densitometrisch auszuwerten. Dazu wurde das Programm Aida 2.0 verwendet. Alle Proben wurden auf 18S rRNA abgeglichen, um unterschiedliche Auftragungsmengen zu relativieren.

Tabelle 2 Übersicht über verwendete Primer

S = sense Primer, AS = antisense Primer; Unter den jeweiligen Accession Numbers findet man in der Gendatenbank NCBI die Sequenzen der Gene, welche für die Primerauswahl benutzt wurden

Primer-name	Primersequenz	Fragment-größe	Annealing-temperatur/Zyklen	Accession number
AGE-R1	S: 5'-TGTTCAAGGAGGAGGGTGTC-3' AS: 5'-AGCCTAGCCGGTTGTAATCC-3'	300 bp (1002-1301)	58/35	KIAA0115
AGE-R2	S: 5'-AGGGCCGTAAGGAGAGAGAG-3' AS: 5'-GTGGCGTCTGTCTGTGTGTC-3'	442 bp (492-933)	61/35	J03075
AGE-R3	S: 5'-GATAACAATTCTGGGCACGG-3' AS: 5'-TGAAGCACTGGTGAGGTCTATG-3'	342 bp (446-791)	60/32	AB006780
ScR-II	S: 5'-TTAAGATCAGGTGGGTTGGG-3' AS: 5'-AGGTATGAGCATGGGAGCAG-3'	211 bp (1140-1350)	61/34	D90188
RAGE	S: 5'-TGAACACAGGCCGGACAGAAG-3' AS: 5'-CCCATCCAAGTGCCAGCTAAG-3'	325 bp (182-507)	58/40	AB036432
18S rRNA	S: 5'-GTTGGTGGAGCGATTTGTCTGG-3' AS: 5'-AGGGCAGGGACTTAATCAACGC-3'	345 bp (1496-1791)	59/11	M10098

2.2.5 Genbanken und Computerprogramme

Für die Konstruktion der Primer war es zunächst nötig, die entsprechende Sequenz der verschiedenen Gene zu kennen. Diese Sequenzen wurden in der NCBI Gendatenbank unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> herausgesucht.

Folgende Computerprogramme standen zur Verfügung :

- *Primer3Input* zur Primerauswahl
- *Gene Runner* zur Primerauswahl
- *Aida 2.0* zur densitometrischen Auswertung von Polaroid-Negativen und ECL-Filmen.

2.2.6 Proteinpräparation

Für die Herstellung von Proteinlysaten aus den Herzohrproben wurden 50 mg der bei -80°C gelagerten Proben in Alufolie verpackt und in flüssigem Stickstoff erneut eingefroren. Das Gewebe wurde mit einem Hammer mechanisch pulverisiert und in 250 μl Lysispuffer und 10 μl Proteinase-Inhibitor mit einem Ultraturrax homogenisiert. Der Stab des Ultraturrax wurde nach jeder Probe mit 0,1%igen SDS-Lösung und anschließend mit destilliertem Wasser gesäubert. Die homogenisierten Proben wurden danach 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt, um eine Reduktion der Schaumbildung zu erreichen. Nach Zugabe von 50 μl einer 6%igen Benzonaselösung wurden die Proben für 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend bei 13000 x g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Abnahme eines Aliquots für die Proteinbestimmung wurde der Überstand mit 5 μl β -Mercaptoethanol versetzt, für 5 Minuten bei 90°C inkubiert und eingefroren.

2.2.6.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Konzentration der präparierten Proteine wurde die Bichinonsäure-Methode verwendet. Hierzu wurden zur Erstellung einer Eichkurve neun verschieden konzentrierte Standardproteinlösungen benötigt. Dazu wird eine BSA-Stammlösung soweit weiter verdünnt, bis man schließlich folgende Konzentrationsstandards erhält (in $\mu\text{g} / \mu\text{l}$) : 0, 10, 20, 30, 40, 160, 320, 640, 1000. Von den Standards und den zur Messung 1 : 100 verdünnten Proben wurden je 10 μl als Doppelbestimmung in zwei Reihen und in festgelegter Reihenfolge auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen. Von der Reagenzlösung, welche im Verhältnis 50 : 1 aus Bichinonsäure-Lösung (BCA) und CuSO_4 bestand, wurde 200 μl in die einzelnen Fächer hinzupipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde für 30 sec auf einen Schüttler gestellt und anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert. Im ELISA-Reader wurden die Proben sofort nach der Inkubation bei 562 nm vermessen.

Voraussetzung ist, daß sich die gemessene Konzentration der unbekanntenen Proben innerhalb der Eichkurve liegen, um verwertbare Ergebnisse zu bekommen.

2.2.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die elektrophoretische Auftrennung der Proteine wurde eine SDS-PAGE verwendet. Aus Vorversuchen ergab sich, daß ein 12,5%iges Gel die beste Auftrennung für die gesuchten Proteine bietet. Bei einer SDS-PAGE kommen zwei unterschiedlich zusammengesetzte Gele zum Einsatz. Ein Sammelgel, in dem sich die Proteine unabhängig von ihrer Größe in einer Ebene sammeln, bevor sie das Laufgel erreichen, in dem dann die eigentliche Auftrennung stattfindet. Durch die Polymerisation des Acrylamids entstehen Poren, die je nach Konzentration des Acrylamides bzw. des Verhältnisses von Acrylamid zu Bisacrylamid in ihrer Größe variieren. Daher eignen sich niedrigprozentige Gele gut zur Auftrennung von großen Proteinen und höherprozentige Gele für kleine Proteine.

Der Ansatz lautet folgendermaßen:

Sammelgel

30 % Bisacrylamid	0,67 ml
Sammelgelpuffer (1 M Tris)	0,5 ml
10 % APS	25 µl
TEMED	5 µl
ddH ₂ O	2,76 ml

Laufgel

30 % Bisacrylamid	3,0 ml
Laufgelpuffer (1,5 M Tris)	2,25 ml
10 % APS	50 µl
TEMED	5 µl
ddH ₂ O	0,64 ml

Nachdem 3 ml Laufgel zwischen zwei eingespannte Glasplatten pipettiert wurden, wurde es mit 1 ml Isopropanol überschichtet und für 2 Stunden polymerisiert. Anschließend wurde das Gel durch das Sammelgel komplettiert, nachdem die Isopropanolrückstände durch Filterpapier vorsichtig entfernt wurden. Nach weiteren 2 Std. war das Gel für die Elektrophorese bereit. Die Proben wurden vor dem Auftragen 1 : 1 mit 2x SDS-Puffer versetzt und so verdünnt, daß in jeder Bahn 10 µg Protein aufgetrennt wurden. Für die Elektrophorese wurde die PAGE-Gelkammer mit 1x Elektrodenpuffer gefüllt und eine Spannung von 35 V angelegt. Zur Größenbestimmung der Proteine wurde bei jedem Gel ein Proteinstandard (See Blue Plus 2) aufgetragen.

2.2.8 Western-Blot

Im Anschluß an die SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine mittels Elektrotransfer auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Transfer erfolgte unter Kühlung in einer Blot-Kammer bei 1,5 mA / cm² Gel und konstanten Gleichstrom für 1 Std in Blot-Puffer. Der Erfolg des Vorgangs wurde anschließend durch eine Ponceau-Färbung verifiziert: Dazu wird die Nitrocellulosemembran für 2 min in der Färbelösung belassen und solange mit Wasser schrittweise entfernt, bis nur noch die Proteinbanden sichtbar sind. Diese wurden dann zur Dokumentation kopiert bzw. eingescannt.

Die Membran wurde nun in einer Blockierlösung (2% BSA in TBS-T) für entweder 1 Std bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Dieser Schritt dient dazu, unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Danach wurde der für das jeweilige Protein spezifische Primärantikörper der Blockierlösung hinzugegeben. Die Behandlung der Nitrocellulosemembran mit den Antikörpern erfolgte nach den in Tabelle 3 dargelegten Parametern. Jetzt wurde unspezifisch gebundener Primärantikörper in drei Waschschritten mit TBS-T für je 10 min entfernt. Nach Inkubation mit einem mit Peroxidase gekoppelten und gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper wurde wiederum 3-mal mit TBS-T für jeweils 10 min gewaschen. Danach wurde die Membran für 2 min mit der Luminolgebrauchslösung inkubiert. Luminol wird in einer Peroxidase-katalysierten Umsetzung von Wasserstoffperoxid über mehrere Zwischenstufen zu einem kurzlebigen, energiereichen cyclischen Peroxid oxidiert.

Bei dem Zerfall dieses Produktes wird Licht emittiert, dessen Spektrum im Bereich der Sensitivität von blauempfindlichen Röntgenfilmen liegt. Daher wurden die Membranen in einer Dunkelkammer auf ECL-Filme gelegt und die spezifischen Banden auf dem Film schwarz abgebildet.

Die Banden wurden anschließend eingescannt und mit dem Programm Aida 2.0 densitometrisch ausgewertet. Um Schwankungen der Proteinbeladung zu relativieren, wurden alle untersuchten Proteine auf die Ladungskontrolle α,β -Actin abgeglichen.

Tabelle 3 Übersicht über verwendete Antikörper

Alle Antikörper wurden in 2% BSA / TBS-T gelöst. Die primären Antikörper wurden zusätzlich mit 0,005% NaN_3 behandelt, um sie haltbar und wiederverwendbar zu machen.

Antikörper	Verdünnung	Inkubation
anti-RAGE IgG, polyclonal, rabbit (Universität Würzburg)	1 : 1000	30 min
anti-AGE-R3 IgG, monoclonal, mouse (NovoCasta)	1 : 1000	1 h
anti- α,β -Actin IgG, monoclonal, mouse (Sigma)	1 : 4000	30 min
donkey anti-rabbit, IgG, HRP konjugiert (Gibco)	1 : 10000	1 h
anti-mouse, IgG, HRP konjugiert (Gibco)	1 : 10000	1 h

2.2.9 Herzindexmessung

Die Messung des Herzindexes ist eine anerkannte Methode zur suffizienten Beurteilung der Herzleistung. Das Grundprinzip ist die Thermodilution, die zu den Indikatorverdünnungsmethoden zählt. Es wird über einen Pulmonalkatheter eine definierte gekühlte Infusionslösung verabreicht und durch einen Meßfühler distal die Temperaturänderung registriert. Es ist so möglich aus dem Integral der Temperaturänderung das Herzminutenvolumen (HMV) zu errechnen. Nun kann man den Herzindex errechnen, indem man das Herzminutenvolumen durch die Körperoberfläche (Körpergröße in m zum Quadrat) dividiert.[56]

Im Rahmen der präoperativen Diagnostik vor der Operation wurden Rechtsherzkatheter, und damit die Messung des Herzindexes, routinemäßig von den einweisenden Kliniken oder niedergelassenen Kardiologen durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Altersabhängige Expression der AGE-Rezeptoren auf mRNA und Proteinebene

3.1.1 Altersabhängige Genexpression der AGE-Rezeptoren

Es wurde untersucht, ob es am menschlichen alternden Herzen zu einer veränderten Expression der AGE-Rezeptor-Gene kommt. Dazu wurde aus menschlichem Herzgewebe, gewonnen aus dem rechten Vorhof, RNA isoliert, um die Expression der AGE Rezeptoren mit Hilfe der RT-PCR zu bestimmen. Als Beladungskontrolle wurde die Menge an ribosomaler 18S RNA bestimmt und die Expression auf diese abgeglichen.

Es wurden drei verschiedene Altersgruppen untersucht, bestehend aus Kindern (mittleres Alter $2,4 \pm 1,1$ Jahre, $n = 10$), Erwachsenen (mittleres Alter $45,3 \pm 0,8$ Jahre, $n = 23$) und Senioren (mittleres Alter $76,4 \pm 0,4$ Jahre, $n = 27$). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 und 4 zusammengefaßt. Es zeigt sich, daß sich die mRNA Expression für die Rezeptoren AGE-R1 und AGE-R2 im alternden Herzen nicht signifikant verändert. Die AGE-R3 mRNA Expression hat hingegen ein Maximum in der Erwachsenenengruppe, welches signifikant höher ist als in der Kindergruppe (23%, $p = 0,015$). Der Vergleich der Kinder- zur Seniorengruppe ergab keine signifikante Erhöhung. Die mRNA Expression des Macrophage Scavenger Rezeptors II war annähernd gleich hoch in den Gruppen der Kinder und Erwachsenen, um schließlich in der Seniorengruppe sein Maximum zu erreichen, welches gegenüber der Erwachsenenengruppe signifikant höher war (23%, $p = 0,035$). Die Analyse der RAGE mRNA zeigte folgendes Ergebnis: Die Expression in der Kindergruppe war signifikant höher als in der Erwachsenenengruppe (60%, $p = 0,024$) und der Seniorengruppe (50%, $p = 0,038$). Zwischen der Erwachsenen – und Seniorengruppe gab es keinen signifikanten Unterschied.

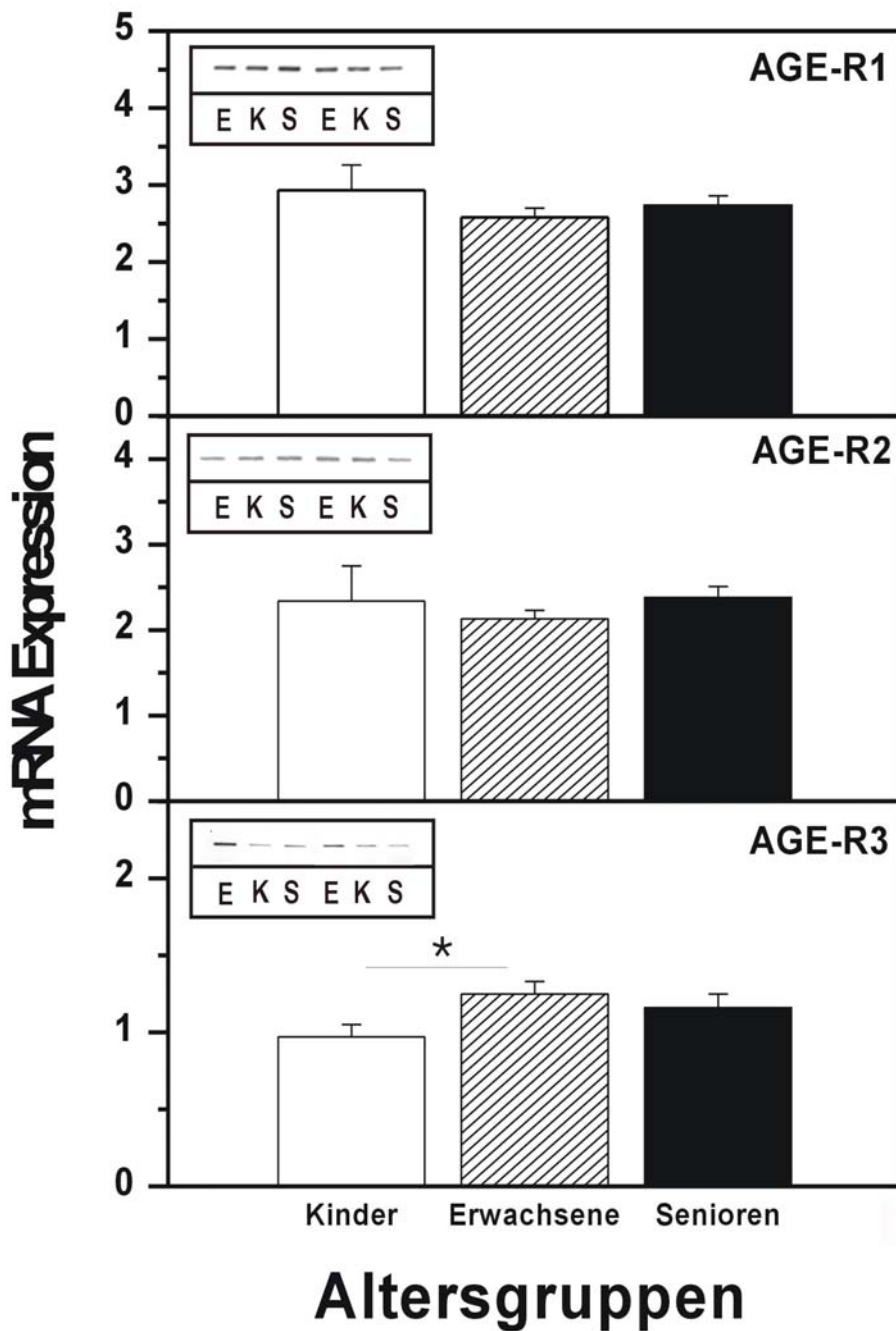


Abbildung 3

Densitometrische Analyse der RT-PCR Ergebnisse für die Rezeptoren AGE-R1, AGE-R2 und AGE-R3 von der aus menschlichem Herzgewebe gewonnenen RNA. Jedes untersuchte Gen wurde auf 18S rRNA abgeglichen. Es wurden jeweils drei unterschiedliche Gruppen untersucht: Kinder ((K) mittleres Alter $2,4 \pm 1,1$ Jahre, $n = 10$), Erwachsene ((E) mittleres Alter $45,3 \pm 0,8$ Jahre, $n = 23$) und Senioren ((S) mittleres Alter $76,4 \pm 0,4$ Jahre, $n = 27$). Die entsprechenden RT-PCR Ergebnisse sind beispielhaft in der jeweilig linken oberen Ecke jedes Graphen abgebildet. (* $P < 0,05$)

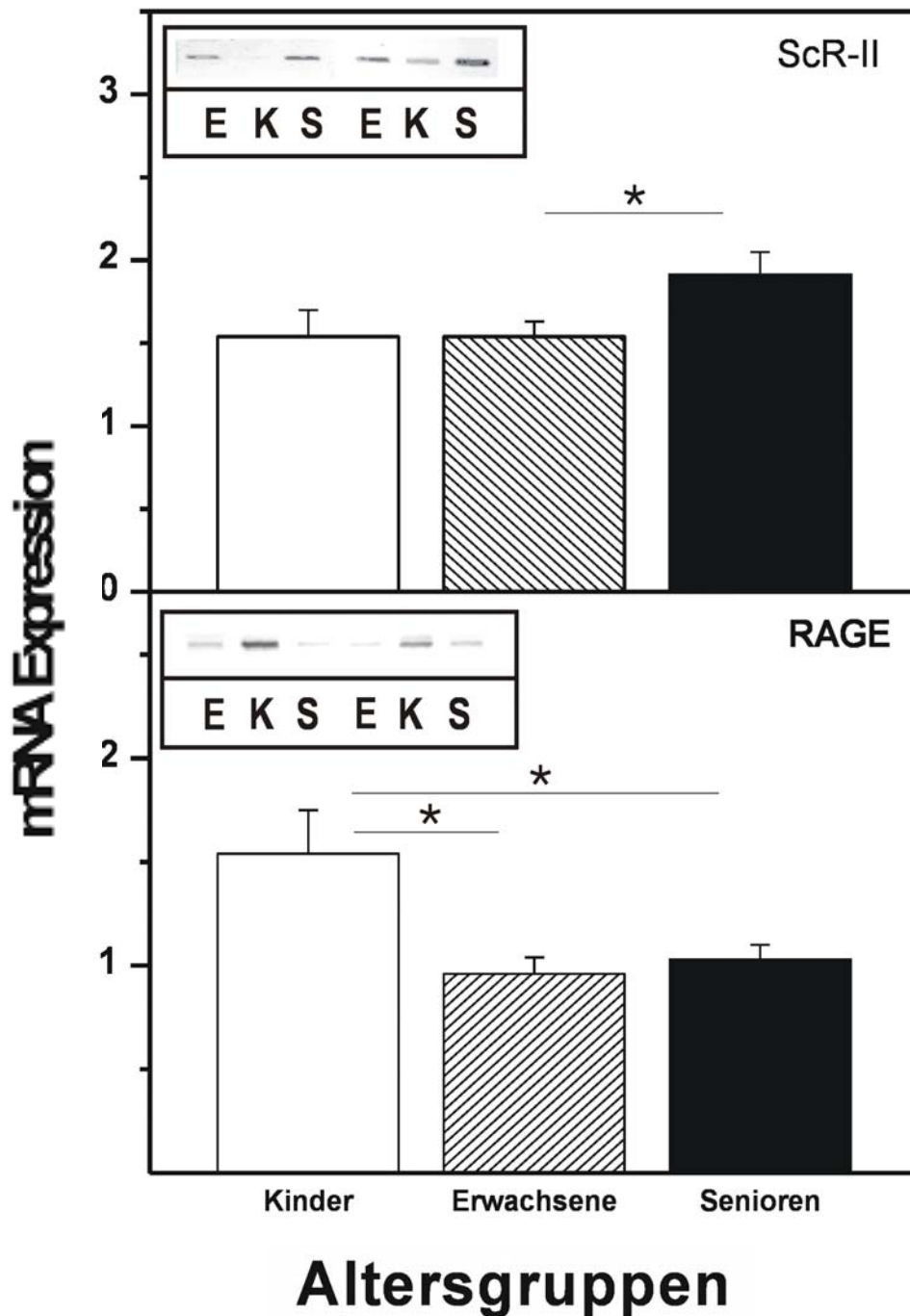


Abbildung 4

Densitometrische Analyse der RT-PCR Ergebnisse für die Rezeptoren ScR-II und RAGE von der aus menschlichem Herzgewebe gewonnenen RNA. Jedes untersuchte Gen wurde auf 18S rRNA abgeglichen. Es wurden jeweils drei unterschiedliche Gruppen untersucht: Kinder ((K) mittleres Alter $2,4 \pm 1,1$ Jahre, $n = 10$), Erwachsene ((E) mittleres Alter $45,3 \pm 0,8$ Jahre, $n = 23$) und Senioren ((S) mittleres Alter $76,4 \pm 0,4$ Jahre, $n = 27$). Die entsprechenden RT-PCR Ergebnisse sind in der jeweilig linken oberen Ecke jedes Graphen abgebildet. . (* $P < 0,05$)

3.1.2 Altersabhängige Expression der AGE-Rezeptoren auf Proteinebene

Basierend auf den Ergebnissen der Quantifizierung der Genexpression mittels RT-PCR, wurde weiterführend untersucht, ob am menschlichen, alternden Herzen eine Veränderung der Proteinexpression der AGE-Rezeptoren ebenfalls existiert. Dazu wurden aus menschlichem Herzgewebe, gewonnen aus dem rechten Vorhof, Proteine isoliert und die Expression von Proteinen mit Hilfe des Western-Blot-Verfahrens bestimmt. Die Expression wurde allerdings nur für die Rezeptoren AGE-R3 und RAGE bestimmt, weil einerseits in der vorangegangenen Untersuchung der Genexpression nur für AGE-R3, RAGE und den ScR-II signifikante Ergebnisse resultierten und andererseits nur für diese beiden Proteine Antikörper verfügbar waren. Die Proteinexpression der beiden Rezeptoren wurde jeweils auf Actin als Beladungskontrolle abgeglichen.

Es wurden drei verschiedene Altersgruppen untersucht, bestehend aus Kindern (mittleres Alter $2,4 \pm 1,1$ Jahre, $n = 10$), Erwachsenen (mittleres Alter $44,3 \pm 1,4$ Jahre, $n = 10$) und Senioren (mittleres Alter $75,8 \pm 0,9$ Jahre, $n = 10$). Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 zusammengefaßt. Wie beschrieben zeigen sich die Banden bei den durchgeführten Western-Blots für RAGE bei annähernd 55 kD [37] und für AGE-R3 bei ungefähr 30 kD [100].

Eine signifikante Steigerung der Expression des RAGE Proteins zeigt sich in der Gruppe der Erwachsenen (265%, $p = 0,00004$) und Senioren (307%, $p = 0,00038$) verglichen mit der Gruppe der Kinder (Abb. 4). Im Vergleich der Erwachsenen mit den Senioren manifestiert sich nur eine kleine, nicht signifikante Steigerung der RAGE Expression der Senioren gegenüber den Erwachsenen. Verglichen mit der mRNA Expression von RAGE innerhalb der drei Gruppen zeigt sich, daß die Proteinexpression nicht der Verteilung der Genexpression (Abb. 4) folgt, sondern es läßt sich eine teilweise inverse Korrelation der Gruppen der Kinder und Senioren erkennen.

Eine signifikant erhöhte Proteinexpression von AGE-R3 war in der Gruppe der Senioren gegenüber der Gruppen der Kinder (134%, $p = 0,034$) und Erwachsenen (151%, $p = 0,0024$) nachweisbar. Auch hier lief die Proteinexpression von AGE-R3 der Genexpression während des Alterns nicht parallel. Die gezeigte Erhöhung der Protein-Expression in der Seniorengruppe gegenüber der Erwachsenenengruppe ist nicht mit einer korrespondierenden Erhöhung auf mRNA-Ebene verbunden (Abb.3). Die Erhöhung der Genexpression von AGE-R3 in der Erwachsenenengruppe gegenüber der Kindergruppe

(Abb. 3) läßt sich nicht auf die Proteinebene übertragen, da dort in diesem Gruppenvergleich keine Signifikanz nachzuweisen war (Abb. 5).

Zusammenfassend kann man sagen, daß die Proteinexpression der Rezeptoren AGE-R3 und RAGE in menschlichem Herzgewebe im Laufe des Alters ansteigt, sich aber auf der Ebene der Genexpression keine Korrelation zur Proteinexpression nachweisbar war. Die Ergebnisse sind in Abb. 5 zusammengefaßt.

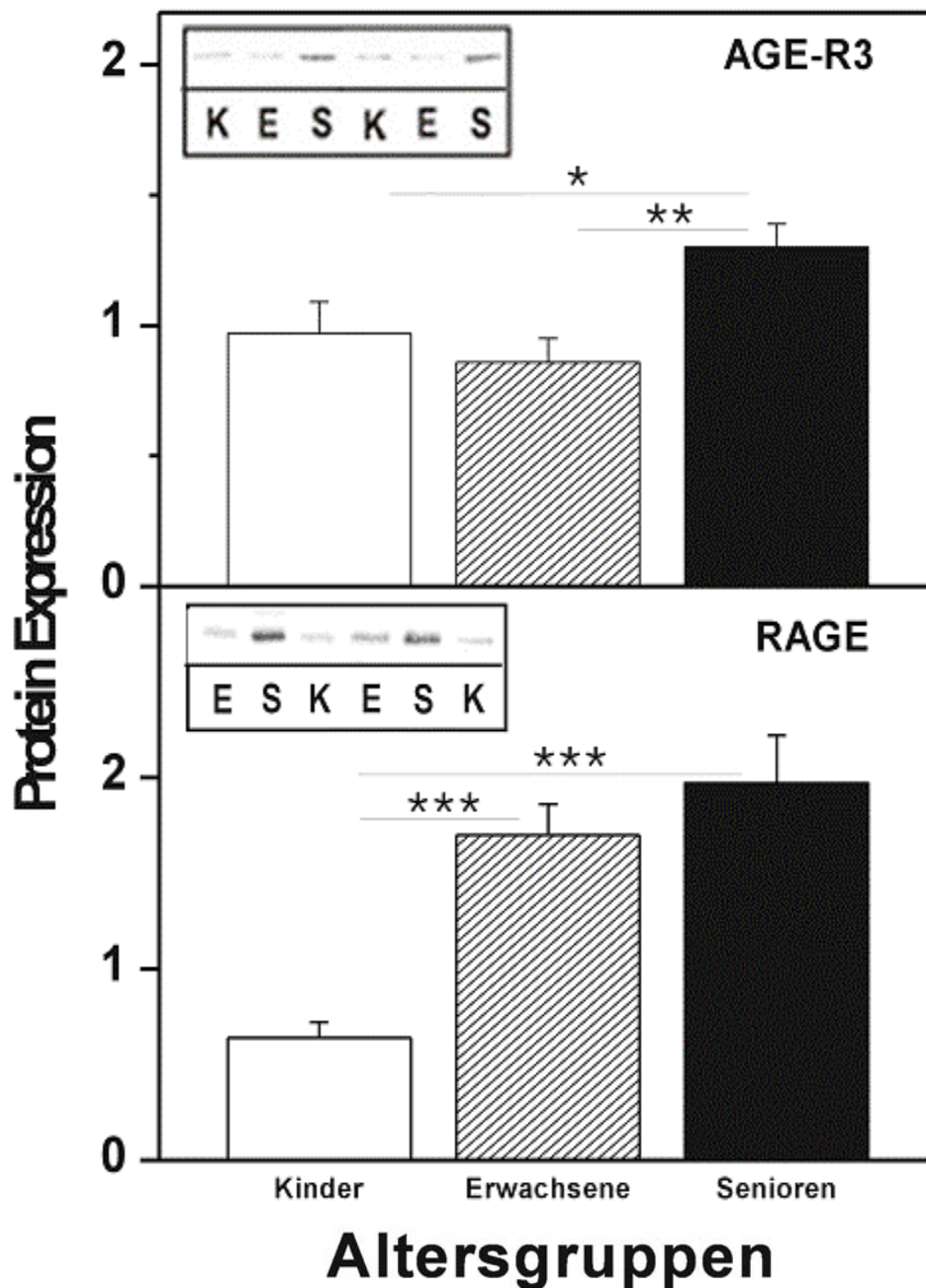


Abbildung 5

Densitometrische Analyse der Western-Blot Ergebnisse von den aus menschlichem Herzgewebe gewonnenen Proteinen. Die Proteinexpression der beiden Rezeptoren wurde auf Actin abgeglichen. Es wurden jeweils drei unterschiedliche Gruppen untersucht : Kinder ((K) mittleres Alter $2,4 \pm 1,1$ Jahre, $n = 10$), Erwachsene ((E) mittleres Alter $44,3 \pm 1,4$ Jahre, $n = 10$) und Senioren ((S) mittleres Alter $75,8 \pm 0,9$ Jahre, $n = 10$). Die entsprechenden Western-Blot Ergebnisse sind in der jeweilig linken oberen Ecke jedes Graphen abgebildet. . (* $p < 0,05$), (** $p < 0,01$), (***) $p < 0,001$)

3.2 Expression der AGE-Rezeptoren auf mRNA und Proteinebene in Abhängigkeit von klinischen Parametern

3.2.1 Abhängigkeit zwischen Herzindex und der Expression von RAGE

Im Rahmen der präoperativen Vorbereitung wurden bei den Patienten Rechtsherzkatheteruntersuchungen durchgeführt, währenddessen es möglich ist, den Herzindex zu messen. Als Indikator für die Herzleistung ist der Herzindex genauer und aussagekräftiger als die reine Beurteilung der Ejektionsfraktion durch eine transthorakale Echokardiographie. Aus diesem Grund wurde der Vergleich der Gen- und Proteinexpression mit dem Herzindex durchgeführt.

Die Patientenproben wurden aus Gruppen der Senioren und Erwachsenen ausgewählt, wobei die PCR- und Western-Blot Ergebnisse von korrespondierenden Patienten ausgewählt wurden. Die Ergebnisse sind in Abb. 6 zusammengefaßt.

Man erkennt eine signifikante Abhängigkeit der RAGE Proteinexpression vom Herzindex ($p = 0,015$, $n = 14$). Dies bedeutet eine Abnahme der Herzleistung mit zunehmender Expression von RAGE. Eine Signifikanz auf mRNA-Ebene konnte nicht gezeigt werden ($p = 0,613$, $n = 14$).

3.2.2 Abhängigkeit zwischen Herzindex und der Expression von AGE-R3

Desweiteren wurde auch die Abhängigkeit der Gen- und Proteinexpression von AGE-R3 in bezug auf den Herzindex untersucht. Die verwendeten Expressionsdaten stammen aus dem Patientengut der Senioren und Erwachsenen. Es wurden jeweils korrespondierende PCR- und Western-Blot Daten gegen den Herzindex aufgetragen. In Abb. 7 zeigt sich, daß weder in der mRNA-Expression ($p = 0,805$, $n = 9$) noch in der Proteinexpression ($p = 0,769$, $n = 9$) eine signifikante Abhängigkeit zu dem Herzindex besteht.

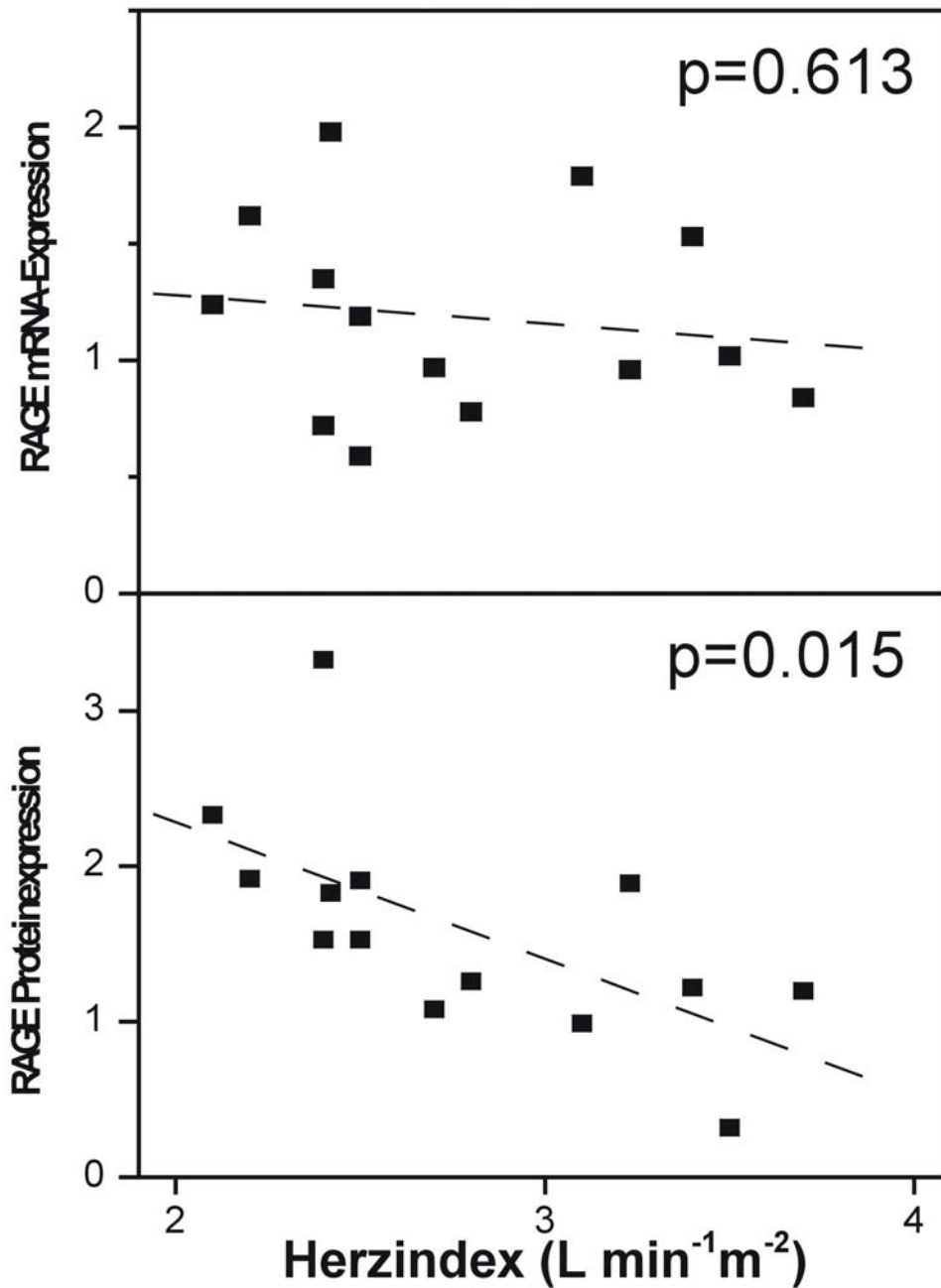


Abbildung 6

Abhängigkeit der Gen- und Proteinexpression von RAGE gegenüber dem Herzindex. Es wurden jeweils die PCR- und Western-Blot Daten des gleichen Patientenguts (n = 14) mit dem Herzindex verglichen. Eine signifikante Abhängigkeit ergibt sich für die Proteinexpression gegenüber dem Herzindex (p = 0,015). Auf mRNA-Ebene lässt sich keine Abhängigkeit zeigen (p = 0,613)

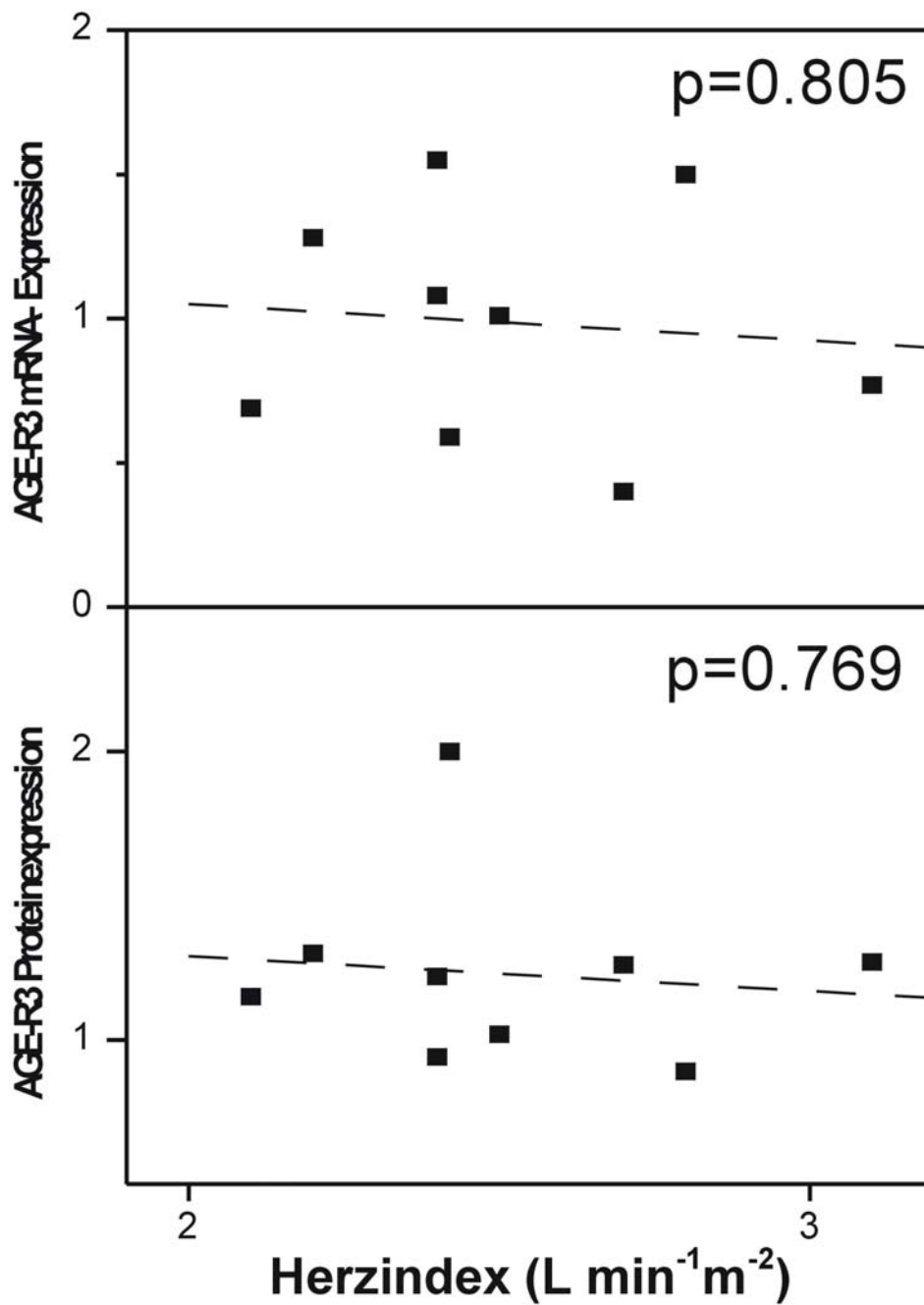


Abbildung 7

Abhängigkeit der Gen- und Proteineexpression von AGE-R3 gegenüber dem Herzindex. Es wurden jeweils die PCR- und Western-Blot Daten des gleichen Patientenguts (n = 9) mit dem Herzindex verglichen. Eine signifikante Abhängigkeit ergibt sich weder für die Proteineexpression gegenüber dem Herzindex (p = 0,769) noch für die mRNA Ebene gegenüber dem Herzindex (p = 0,805)

3.2.3 Expression der mRNA- und Proteinexpression von RAGE und AGE-R3 in Abhängigkeit von dem postoperativen Intensivstationaufenthalt

Patienten, die sich einer koronarchirurgischen Operation unterziehen mussten, werden postoperativ zunächst standardmäßig auf die Intensivstation gebracht, da sie intubiert und beatmet verlegt werden. Auf der Intensivstation werden sie soweit stabilisiert, daß sie von der Beatmungsmaschine entwöhnt werden können, um letztendlich vom narkotisierten in den wachen Zustand überführt zu werden. Das weitere Procedere besteht darin, die Patienten weiter zu stabilisieren, bis sie kardiopulmonal belastbar und ohne Unterstützung von Katecholaminen von der Intensivstation verlegt werden können. Als normalen Zeitraum für die Dauer des Intensivstationaufenthalt kann man unter Berücksichtigung von konstitutionellen Unterschieden 1 – 3 Tage annehmen (z.B. unter Berücksichtigung von Problemen der Verlegung von Patienten am Wochenende). Eine Liegedauer von länger als 3 Tagen resultiert meist aus postoperativ auftretenden Komplikationen, wie Nierenversagen, Herzrhythmusstörungen oder „cardiac-low-output syndrome“. Desweiteren bleiben die meisten Patienten aufgrund ihrer insuffizienten kardialen Leistung katecholaminpflichtig. Unter diesen Gesichtspunkten wurde die Einteilung der beiden Gruppen bezüglich des Intensivstationaufenthaltes in 1 – 3 Tage geltend als normal und länger als 3 Tage geltend als verlängert eingeteilt.

3.2.3.1 Vergleich der Expression von RAGE mit dem postoperativen Intensivstationaufenthalt

Es wurde untersucht, ob die Genexpression oder die Proteinexpression von RAGE einen Einfluß auf die postoperative intensivpflichtige Behandlung hat. Die verwendeten Gen- und Proteinexpressionsdaten wurden aus der Altersgruppe der Erwachsenen und Senioren erhoben und abhängig von der Länge des intensivstationären Aufenthaltes den entsprechenden Gruppen zugeordnet.

Es besteht zwischen der Genexpression und der Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation keine signifikante Abhängigkeit (s. Abb.8) (Gruppe 1 – 3 Tage: n = 30, Gruppe > 3 Tage: n = 14 ; p = 0,370). Auch bei der Proteinexpression ließ sich keine Abhängigkeit zur intensivstationären Liegedauer zeigen (Gruppe 1 – 3 Tage: n = 17, Gruppe > 3 Tage : n = 6 ; p = 0,279)

3.2.3.2 Vergleich der Expression von AGE-R3 mit dem postoperativen Intensivstationaufenthalt

Auch für den Rezeptor AGE-R3 wurde überprüft, ob zwischen der Genexpression und der Proteinexpression eine Abhängigkeit zur Dauer der postoperativen intensivpflichtigen Behandlung besteht. Auch hier wurden die verwendeten Gen- und Proteinexpressionsdaten aus der Altersgruppe der Erwachsenen und Senioren genutzt und abhängig von der Länge der intensivstationären Behandlung den entsprechenden Gruppen zugeordnet.

Eine signifikante Abhängigkeit zwischen der Genexpression und der Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation besteht nicht (s. Abb.9) (Gruppe 1 – 3 Tage: n = 30, Gruppe > 3 Tage: n = 14 ; p = 0,457). Im Vergleich der Proteinexpression zwischen den beiden erstellten Gruppen zeigt einen erkennbaren, signifikanten Anstieg der Proteinexpression in der Gruppe > 3 Tage gegenüber der Gruppe 1 – 3 Tage (Gruppe 1 – 3 Tage: n = 17, Gruppe > 3 Tage : n = 6 ; p = 0,002). Dieses Ergebnis zeigt, daß eine zunehmende AGE-R3 Proteinexpression am menschlichen Herzen, mit einem prolongierten und komplikationsträchtigeren Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation nach Bypass-Operationen assoziiert werden kann.

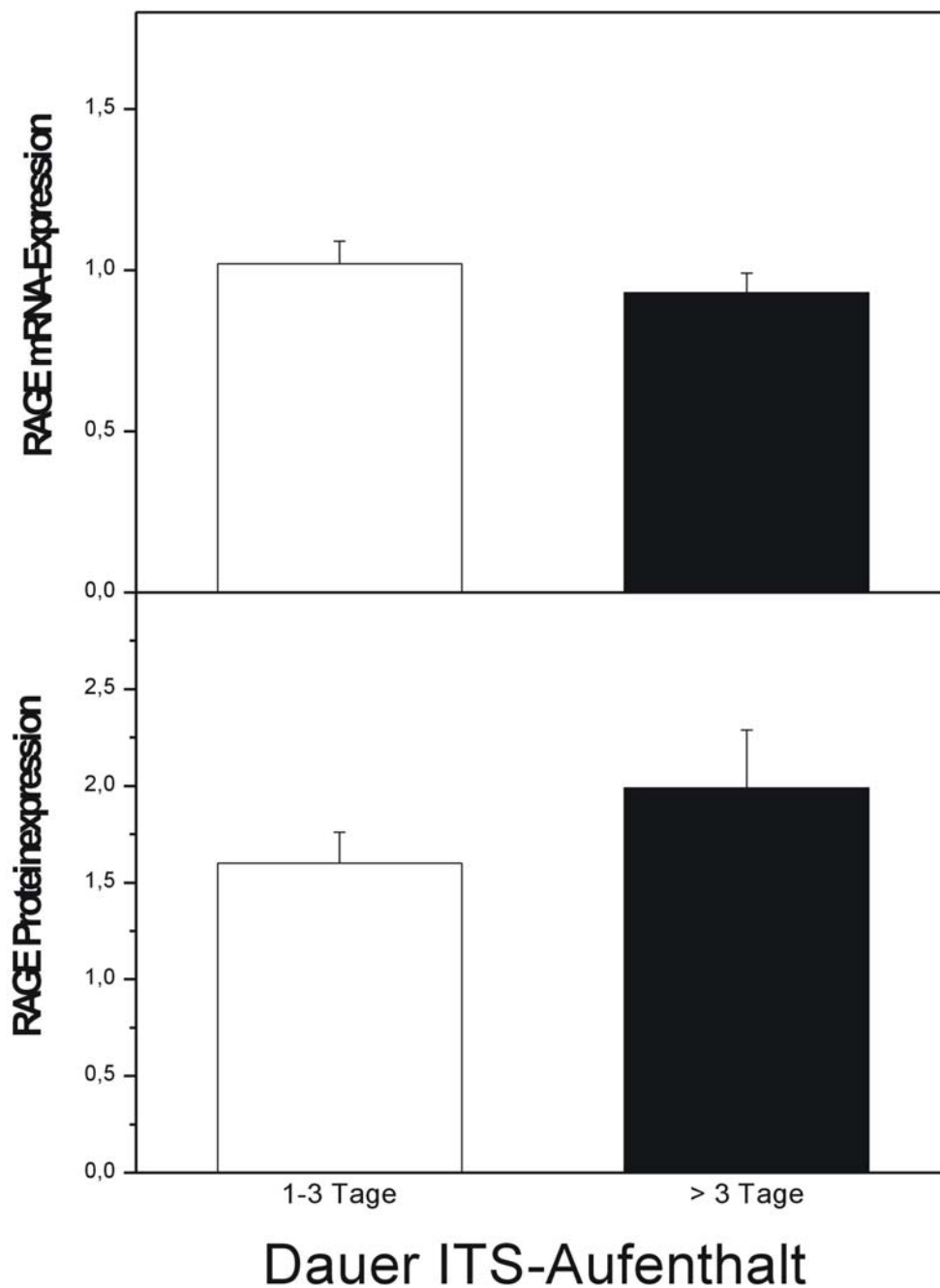


Abbildung 8

Abhängigkeit der RAGE Gen- und Proteinexpression von der Dauer des intensivstationären Aufenthaltes. Es ergaben sich weder bei der Genexpression (Gruppe 1 – 3 Tage : n = 30, Gruppe > 3 Tage : n = 14 ; p = 0,370), noch bei der Proteinexpression zeigen (Gruppe 1 – 3 Tage : n = 17, Gruppe > 3 Tage : n = 6 ; p = 0,279) signifikante Ergebnisse.

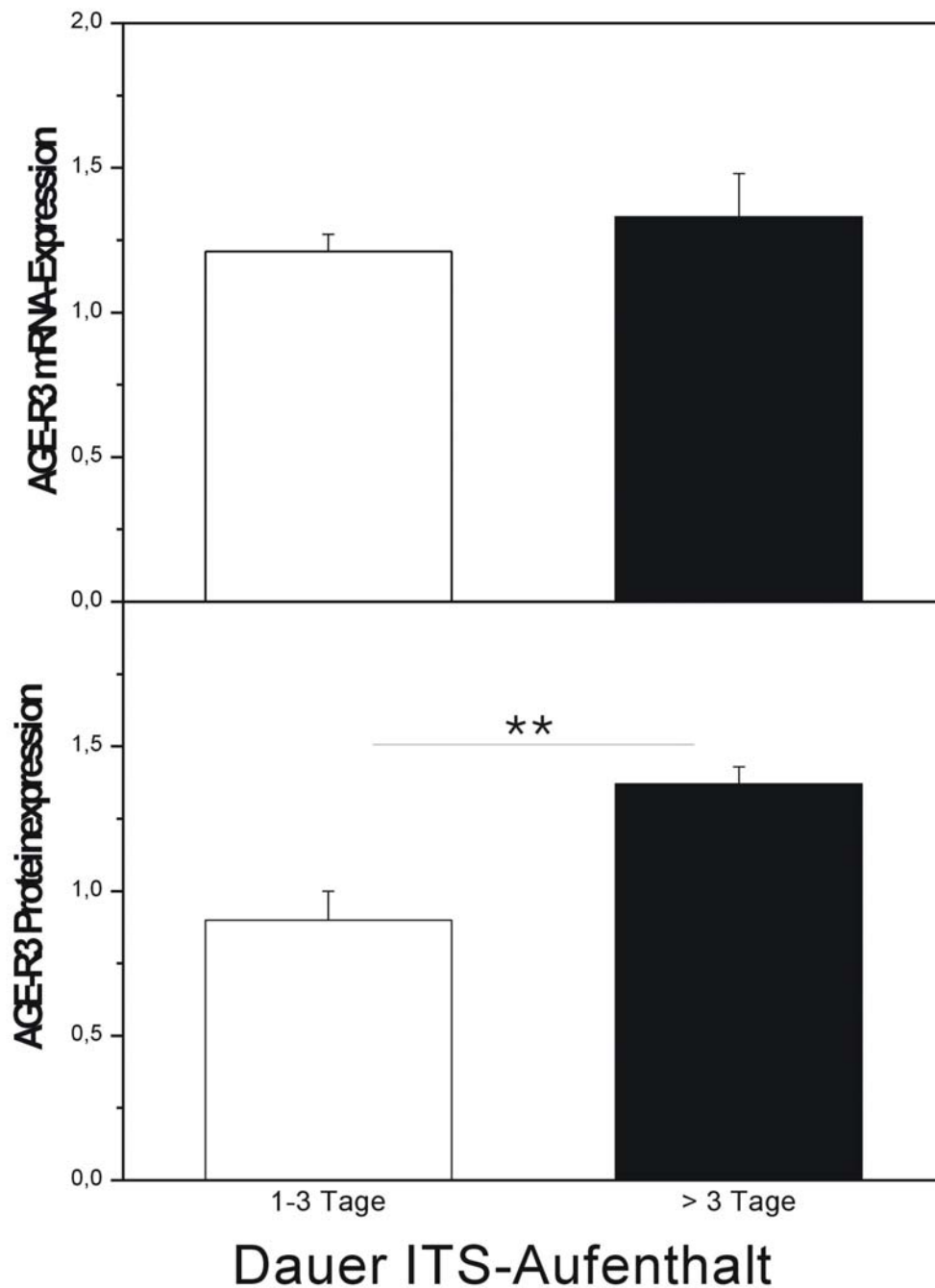


Abbildung 9

Abhängigkeit der AGE-R3 Gen- und Proteineexpression von der Dauer des intensivstationären Aufenthaltes. Es ergaben sich für die Genexpression (Gruppe 1 – 3 Tage : n = 30, Gruppe > 3 Tage : n = 14 ; p = 0,457) keine Signifikanzen, jedoch zeigt sich die Proteineexpression bei Intensivstationaufenthalten länger als 3 Tage signifikant erhöht. (Gruppe 1 – 3 Tage : n = 17, Gruppe > 3 Tage : n = 6 ; p = 0,002). (** P < 0,01)

3.2.4 Zusammenhang zwischen der Expression von RAGE bzw. AGE-R3 und der Anzahl der implantierten Bypässe

Aufgrund der differierenden Ausprägung der Koronarsklerose innerhalb des Patientengutes der Erwachsenen und Senioren, wurden die Patienten mit einer unterschiedlichen Anzahl von Bypässen versorgt. Durch die präoperative Linksherzkatheterdiagnostik ist es möglich, die Anzahl der Gefäße und die Schwere der Stenosen zu bestimmen. Auf dieser Grundlage wird über die Anzahl der zu implantierenden Bypässe entschieden. Man kann davon ausgehen, daß ein Herz umso mehr geschädigt ist, je mehr Gefäße kritisch stenosiert sind und mit Bypässen versorgt werden müssen.

3.2.4.1 Zusammenhang zwischen der Expression von RAGE und der Anzahl der implantierten Bypässe

Zum Nachweis einer Abhängigkeit zwischen der Gen- und Proteinexpression von RAGE und der Anzahl der Bypässe, mit denen die Patienten versorgt wurden, werden die Daten gegeneinander aufgetragen. Die Daten stammen aus dem Patientengut der Erwachsenen und Senioren. Abb. 10 zeigt, daß weder bei der mRNA-Expression ($n = 45$, $p = 0,547$), noch bei der Proteinexpression ($n = 23$, $p = 0,425$) eine signifikante Abhängigkeit besteht.

3.2.4.2 Zusammenhang zwischen der Expression von AGE-R3 und der Anzahl der implantierten Bypässe

Die Daten der Gen- und Proteinexpression von AGE-R3 und die Anzahl der implantierten Bypässe werden in Abb. 11 in ihrer Abhängigkeit gezeigt. Man erkennt keine signifikante Abhängigkeit der Genexpression von AGE-R3 gegenüber der Anzahl der Bypässe ($n = 45$, $p = 0,995$). Jedoch läßt sich eine signifikante Abhängigkeit der Proteinexpression gegenüber der Anzahl der Bypässe verifizieren ($n = 18$, $p = 0,017$). Das bedeutet, daß die Proteinexpression von AGE-R3 ansteigt, je mehr Bypässe ein Patient benötigt.

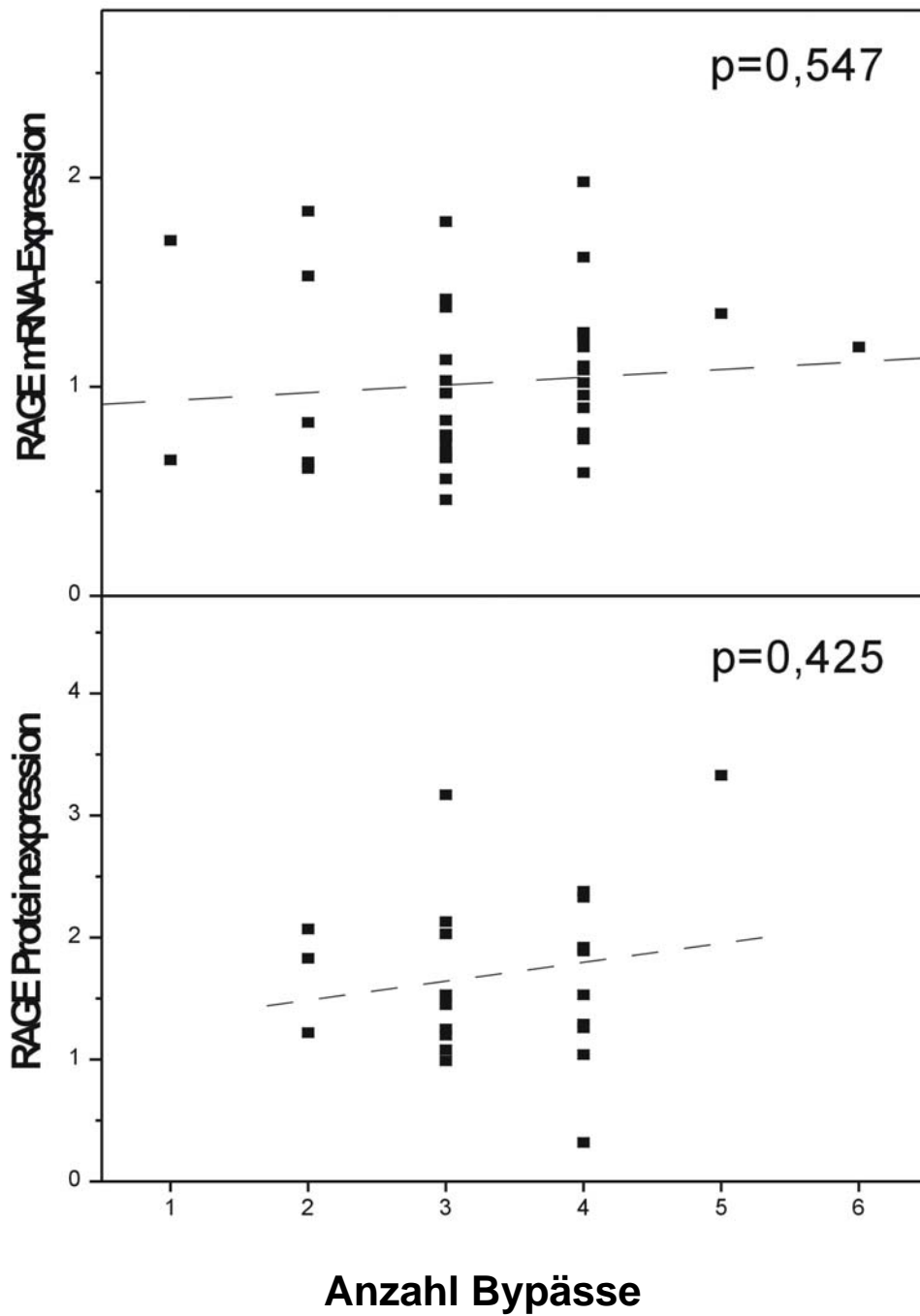


Abbildung 10

Abhängigkeit der RAGE Gen- und Proteinexpression von der Anzahl der implantierten Bypässe. Es ergaben sich weder bei der Genexpression ($n = 45$, $p = 0,547$), noch bei der Proteinexpression ($n = 23$, $p = 0,425$) signifikante Ergebnisse.

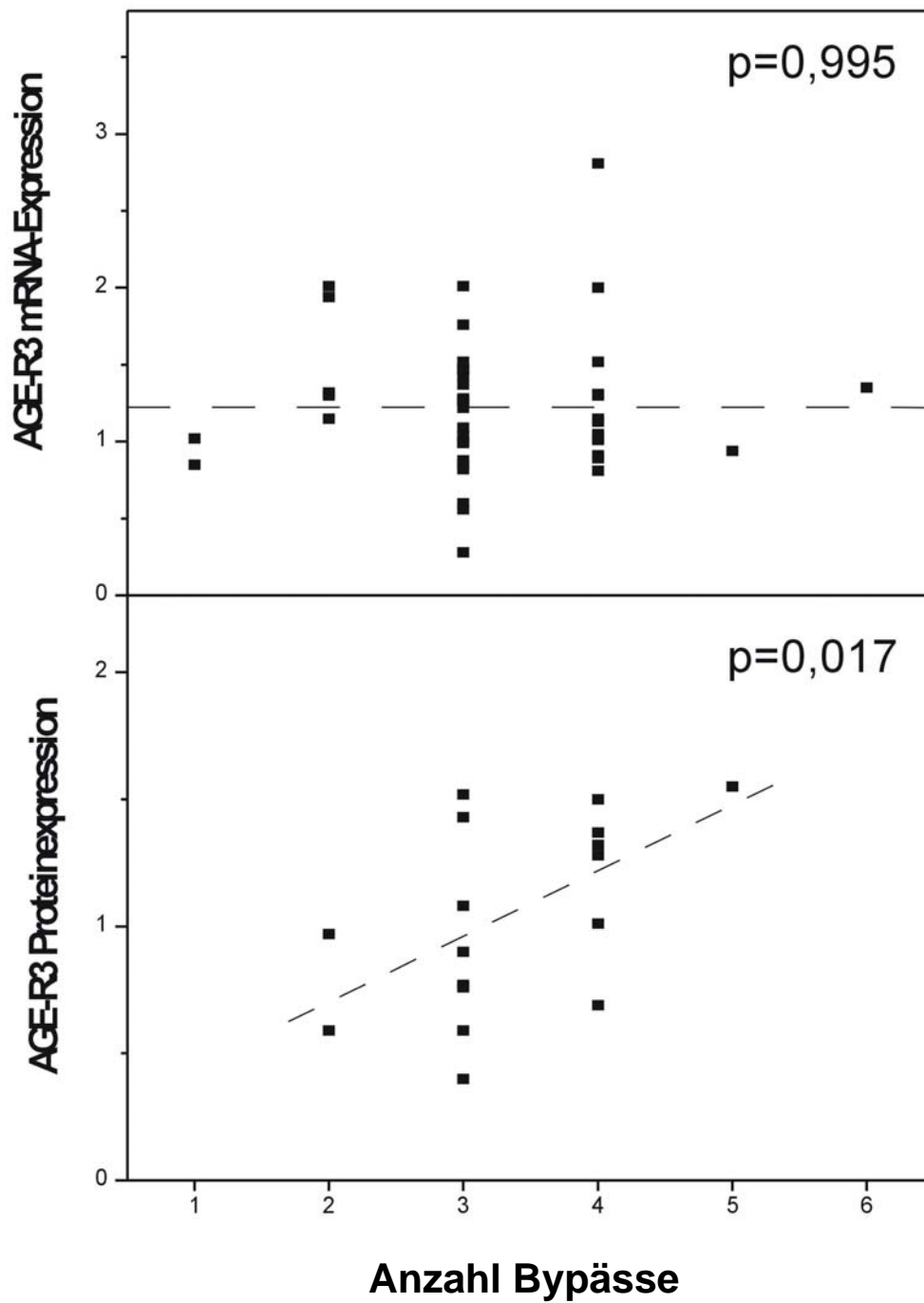


Abbildung 11

Abhängigkeit der AGE-R3 Gen- und Proteineexpression von der Anzahl der implantierten Bypässe. Es ergaben sich bei der Genexpression ($n = 45$, $p = 0,995$) keine signifikanten Ergebnisse. Allerdings ergab sich zwischen der Proteineexpression und der Anzahl der Bypässe eine signifikante Abhängigkeit ($n = 18$, $p = 0,017$).

4 Diskussion

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die Haupttodesursachen der gealterten Bevölkerung in den Industrieländern [1]. Entsprechend der Prävalenz sind die Ätiologie der Entstehung dieser Krankheiten sowie die Risikofaktoren, die zur Ausbildung kardiovaskulärer Erkrankungen prädisponieren, recht gut geklärt. Allerdings sind die zellulären Mechanismen in den beteiligten Organsystemen in weiten Bereichen noch nicht hinreichend entschlüsselt. So werden den AGEs und der Interaktion mit ihren Rezeptoren pathophysiologische Auswirkungen auf verschiedene altersabhängige Erkrankungen wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Nierenerkrankungen und neurodegenerative Erkrankungen, zugeschrieben. Die Ablagerung von AGEs ist in vielen verschiedenen Geweben nachgewiesen worden, wie z.B. in Niere, Lunge, Knorpel und Herz bei gealterten und an Diabetes leidenden Patienten [110, 126, 127]. Viele der AGE-vermittelten Effekte und der AGE-Rezeptoren sind an Nieren von diabetischen Patienten oder diabetischen Tiermodellen untersucht worden. Durch solche Studien ist es möglich, einen Zusammenhang zwischen AGEs bzw. ihrer Interaktion mit AGE-Rezeptoren und chronischen Nierenerkrankungen herzustellen [2, 14, 47, 120]. Allerdings ist die Expression von AGE-Rezeptoren in anderen Geweben kaum untersucht. Daher sollte diese Arbeit die Expression der fünf AGE-Rezeptoren am menschlichen Herz in Abhängigkeit vom Alter untersuchen. Des weiteren wird gezeigt, daß die Expression verschiedener AGE-Rezeptoren mit der Herzleistung und der Schwere der Herzschädigung korreliert.

4.1 Expression von AGE-Rezeptoren am menschlichen Herzen in verschiedenen Altersgruppen

Es können keine Unterschiede innerhalb der drei Altersgruppen bezüglich der mRNA-Expression des AGE-R1 nachgewiesen werden. Dem AGE-R1 wird die Aufgabe zugeschrieben, AGEs aufzunehmen und nachfolgend abzubauen [73]. Es wird angenommen, dass die Induktion des AGE-R1 durch die AGEs selbst erreicht wird, wobei dies nur in nicht geschädigten Geweben nachzuweisen war. He et al. zeigen dagegen eine signifikant erniedrigte mRNA-Expression von AGE-R1 in den Nieren von nichtfettleibigen diabetischen NOD Mäusen verglichen mit ihren altersgleichen nicht-

diabetischen Kontrollmäusen [47]. Dies wurde durch den Diabetes und die entsprechenden Gewebeveränderungen erklärt. Der Mechanismus der AGE-Induktion durch hohe AGE-Level, wie sie beim Diabetes zweifelsohne erreicht werden, ist in diesem Fall außer Funktion geraten.

Da man die pathologischen Folgeerkrankungen, die durch den Diabetes verursacht werden, als ein Modell eines beschleunigten Alterungsprozesses werten kann, hätte man auch entsprechend dem oben angeführten Modell eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression von AGE-R1 erwarten können. Allerdings läßt sich auch keine Expressionssteigerung feststellen, die in den alten Herzen unter der Prämisse einer im Alter erhöhten AGE-Ablagerung hätte manifest werden können. Die protektive Rolle des AGE-R1 gegen den schädigenden Effekt von AGEs auf das Gewebe und die zugeschriebene Funktion der Regulierung der Homöostase im Modell der NOD Maus [47] läßt sich so nicht auf das menschliche Herz übertragen.

Die mRNA-Expression des Rezeptors AGE-R2 im menschlichen Herzen ändert sich ebenfalls nicht in Abhängigkeit vom Alter. In Übereinstimmung mit unseren Daten war in den Nieren von diabetischen verglichen mit Kontroll-Mäusen keine Expressionsteigerung des AGE-R2 nachweisbar [47]. Es wird diskutiert, daß der AGE-R2 eine funktionelle Abhängigkeit vom AGE-R1 aufweist. So wird angenommen, daß die Induktion von AGE-R2 mit nachfolgender Phosphorylierung durch die verantwortliche Tyrosinkinase, welche noch nicht identifiziert wurde [47], über die Aktivierung des AGE-R1-Rezeptors laufen soll. Im Herzen findet weder eine Expressionsänderung für AGE-R1 noch AGE-R2.

Die mRNA-Expression des ScR-II im menschlichen Herzgewebe zeigt auch keine Unterschiede im Vergleich zwischen Kinder und Erwachsenen. Es kann aber ein signifikanter Expressionsanstieg in der Gruppe der Senioren verglichen mit der Gruppe der Erwachsenen beobachtet werden. Der Rezeptor soll die Aufnahme und den Abbau von AGEs durch Makrophagen und die Entstehung von Schaumzellen in atheromatösen Plaques vermitteln [59, 83, 107]. Die elevierte Rezeptorexpression im hohen Alter läßt auf eine erhöhte Aktivität bzw. Infiltration von Makrophagen und die Manifestation der in der Gesamtheit überwiegenden proatherogenetischen Faktoren im menschlichen Herzen schließen. Es ist bekannt, daß sich die Arteriosklerose und die fibrotische Veränderung von Geweben vornehmlich im höheren Alter ausbilden. Im Zusammenhang

mit diesen Resultaten scheint es möglich, daß die ScR-II-Induktion im höheren Alter einen Beitrag zu diesen pathologischen Veränderungen am menschlichen Herzen hat. Es ist nicht zu bewerten, welchen Stellenwert die Expression und Aktivierung des ScR-II in der Ätiologie der Atherogenese und Gewebsfibrose einnimmt, da es sich um ein multifaktorielles Geschehen handelt. Desweiteren ist noch nicht geklärt, welchen Anteil die AGEs an der Aktivierung des Rezeptors inne haben, da der Rezeptor noch durch weitere Liganden aktiviert wird [33], wobei oxLDL als Hauptligand gilt. Es kann am Tiermodell demonstriert werden, daß LDLs und AGEs gekoppelt als Liganden dienen können, indem die LDLs *in vitro* durch AGEs modifiziert werden können und der ScR-II dieses Produkt als Liganden akzeptiert und aufnimmt [59]. Es ist jedoch noch unklar, ob sich dieses Phänomen *in vivo* am Menschen replizieren läßt. Daher ist das Ausmaß der durch die AGEs vermittelten Aktivierung des ScR-II nicht hinreichend geklärt und die Rolle des Rezeptors in der Atherogenese und Fibrogenese am menschlichen Herzen sollte daher nicht überbewertet werden. Letztlich könnte auch eine erhöhte Infiltration des Gewebes mit Makrophagen und die daraus resultierende forcierte Bildung von Schaumzellen für die Gewebefibrose verantwortlich sein.

Die mRNA-Expression von AGE-R3 zeigt einen signifikanten altersabhängigen Anstieg im Vergleich der Gruppen der Kinder zu den Erwachsenen. Dieses Ergebnis zeigt sich mit früher gezeigten Daten konsistent, in denen veranschaulicht wurde, daß es zu einer Hochregulation des Rezeptors in Fibroblasten und Mesangiumzellen während des Alterungsprozesses kommt [93, 101], obwohl ein weiterer Anstieg der Expression in der Gruppe der Senioren nicht zu verzeichnen ist. Dieser Anstieg in der Rezeptorexpression könnte sich daraus erklären, daß im Alter die Menge der im Serum zirkulierenden und im Gewebe akkumulierten AGEs erhöht ist. Eine um das zweifache erhöhte Genexpression des AGE-R3 wird auch in den Nieren von NOD-Mäusen verglichen mit den nichtdiabetischen Kontrollen gefunden [47]. Unter der Prämisse, daß man die Auswirkung des Diabetes als einen beschleunigten Alterungsprozess annimmt, decken sich diese Daten mit der gefundenen Genexpression von AGE-R3 im menschlichen Herzen.

Betrachtet man die altersabhängige Proteinexpression des AGE-R3, so erkennt man eine andere Verteilung als die Genexpression hätte vermuten lassen: Es kann eine signifikante Erhöhung der Proteinexpression in der Gruppe der Senioren im Vergleich zu den

Gruppen der Erwachsenen und der Kinder demonstriert werden. Signifikante Unterschiede zwischen der Gruppen der Kinder und der Erwachsenen bestehen nicht. So läßt sich auf Proteinebene die Vermutung erhärten, dass AGEs am menschlichen Herzen zu einer Induktion der AGE-R3-Expression führen, da die AGE-Level im Alter durch Akkumulation höher sind als in jungen Jahren.

Dem AGE-R3 werden verschiedenen Funktionen zugeschrieben, wie AGE-Aufnahme und Abbau insbesondere in Schaumzellen in atheromatösen Plaques [149]. Desweiteren ist er involviert in der Regulation von Zellmatrix-Interaktionen [70], Regulation von Genexpression [31] und der Kontrolle von Zellproliferation und Zelltod [5, 91]. Eine Erhöhung der AGE-R3-Expression soll ein Geweberemodelling induzieren [95]. Im menschlichen Pankreasgewebe wird bei chronischer Pankreatitis eine erhöhte AGE-R3-Expression verifiziert. Es wird nun angenommen, daß eine Hochregulation des AGE-R3 zu einem Geweberemodelling führt und so eine Induktion der Fibrogenese auslöst [133]. Solche AGE-R3 induzierte Geweberemodellings sollen in Osteoblasten während der Osteogenese [5] und in proliferierenden Lungenfibroblasten [57] stattfinden.

Dem AGE-R3 wird allerdings auch ein protektiver Mechanismus gegenüber einer durch AGEs ausgelösten Gewebeschädigung zugeschrieben, da sich in AGE-R3 knock-out Mäusen eine beschleunigte Glomerulopathie ausbildet [99].

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind mit einer Rolle des AGE-R3 beim Geweberemodelling und der Fibrogenese des menschlichen Herzens konform. Auf der anderen Seite könnte es möglich sein, dass die Hochregulation des AGE-R3 einen protektiven Mechanismus gegen die AGE-abhängigen Gewebeveränderungen darstellt.

Die altersabhängige Genexpression von RAGE zeigt ein unerwartetes Ergebnis: Es wird eine signifikante Herunterregulation des Rezeptors in den Gruppen der Erwachsenen und der Senioren im Vergleich zu den Kindern detektiert. Zwischen den Gruppen der Erwachsenen und den Senioren lassen sich keine Expressionsunterschiede feststellen. Die allgemeine Theorie besagt, daß sich AGEs, wie in vielen anderen Geweben, auch im Herz [110] während des Alterns anhäufen und diese dann die RAGE-Expression stimulieren [12, 118, 119]. Die hohe mRNA-Expression von RAGE könnte jedoch auch in juvenilen Zellen einen physiologischen Einfluss auf das Zellwachstum haben, da gezeigt wird, daß die Amphoterin-RAGE Interaktion eine Rolle bei der Zellmigration während der Entwicklung spielt [52, 54]. In diesem Zusammenhang wird demonstriert, daß in sich entwickelnden Rattengehirnen Amphoterin und RAGE-mRNA-Antigen

kolokalisiert sind, was eine physiologische Aufgabe des Rezeptors im Wachstum impliziert [52].

In Gehirnen von Ratten wird demonstriert, daß die mRNA-Level von RAGE in Gehirnen durch Ischämie induziert wird [77], was sich nicht mit den Daten dieser Arbeit vereinbaren läßt. Obwohl in dieser Arbeit die Herzgewebeprobe von Erwachsenen und Senioren, die an einer chronisch ischämischen Herzkrankheit (CIHK) erkrankt waren, mit den Gewebeprobe von Kindern, die nicht an Ischämie litten, verglichen wurden, war die Expression in den nicht-ischämischen Kinderproben höher als bei den ischämischen Erwachsenen und Älteren. In vielen weiteren Geweben wie z.B. in diabetisch veränderten Aortenwänden [140], bei Kolitis und Synovialitis [8, 50] wird unter pathologischen Bedingungen eine Hochregulation von RAGE nachgewiesen. Obwohl die Möglichkeit des Einflusses der Ischämie auf die Ergebnisse dieser Arbeit nicht wahrscheinlich ist, liegt es nahe, daß die Herunterregulation der RAGE mRNA im menschlichen Herzen altersabhängig ist und nicht in erster Linie von pathologischen Veränderungen abhängt.

Die Proteinmenge des Rezeptors ist offensichtlich im Gegensatz zur mRNA-Expression im Alter erhöht. Das RAGE-Protein, welches den eigentlich Effektor in der Signaltransduktion darstellt, wird auch im Herzen parallel zur AGE Akkumulation erhöht [12, 118, 119]. Die Biologie des RAGE ist intensiv im Zusammenhang mit Diabetes und den diabetischen Spätfolgen untersucht worden [116, 131]. Es gibt Hinweise darauf, daß die AGE-RAGE Interaktion und die dadurch ausgelöste Signalkaskade eine pathophysiologische Rolle im alternden Herzen spielt, was durch verschiedene Studien untermauert wird. So kommt es bei der Bindung von AGEs an RAGE zu einer Freisetzung von ROS, die in der Zelle oxidativen Streß auslösen [134]. Durch diesen oxidativen Streß werden die Transkriptionsfaktoren NF- κ B [13, 64, 144] und AP-1 [48, 71] aktiviert, welche ihrerseits die Genexpression von Zytokinen wie Tumour Necrosis Factor- α (TNF- α) und Transforming Growth Factor- β (TGF- β) stimulieren. In diesem Zusammenhang wird der AGE-RAGE Interaktion ein Mitwirken an der Entstehung von Gewebsfibrosen zugesprochen. In Nierenfibroblasten [53], Linsenepithelzellen [51] und Mesangiumzellen kann bewiesen werden, daß die stimulierten Zytokine TNF- α und TGF- β zu einer ungerichteten Induktion der Kollagenexpression führen [122], welche pathogenetisch ursächlich für eine Fibrose ist. Des weiteren ist das induzierte TGF- β in der Lage, die Transdifferenzierung von Epithelzellen zu Myofibroblasten zu steuern. Dieser Effekt fördert die Fibrogenese in der Niere [92] und der Leber [37], wobei die

Behandlung mit dem „cross-link breaker“ ALT-711 in der Niere gezeigt hat, daß dieser Vorgang reversibel ist [92]. Ein weiterer Anhaltspunkt, dass AGEs bzw. die Aktivierung von RAGE in der Fibrogenese des Herzens involviert sind, wird durch ihre Induktion von Matrix Metalloproteasen (MMPs) untermauert [32, 72]. In kardialen Rattenfibroblasten werden die MMPs durch AGE-Behandlung stimuliert, wobei bestimmte MMPs durch aktiviertes NF- κ B [72] und AP-1 [145], ausgelöst durch RAGE-Stimulation, induziert werden. Herzfibrose wird nicht nur durch einen Anstieg von extrazellulären Matrixproteinen, sondern auch durch ein Geweberemodelling, welches durch MMPs ausgelöst wird, bestimmt [136].

Letztendlich wird die Relevanz der AGE-RAGE Signaltransduktion im menschlichen Herz durch verschiedene Inhibitionsstudien offensichtlich. AGE „cross-link breaker“ können im Hundemodell den altersbedingten Anstieg der Myokardsteifigkeit umkehren, was eine Verbesserung der Herzleistung bedeutet [4]. In der Ratte verhindert die Inhibition der Entstehung von AGEs durch Aminoguanidin eine altersabhängige Herzhypertrophie [29, 74]. Darüber hinaus kommt es bei der Inhibition der AGE-RAGE Interaktion durch das Binden zirkulierender AGEs durch die lösliche extrazelluläre Domäne von RAGE (sRAGE), nachweislich zu einer Suppression der beschleunigten Arteriosklerose in diabetischen Ratten [94].

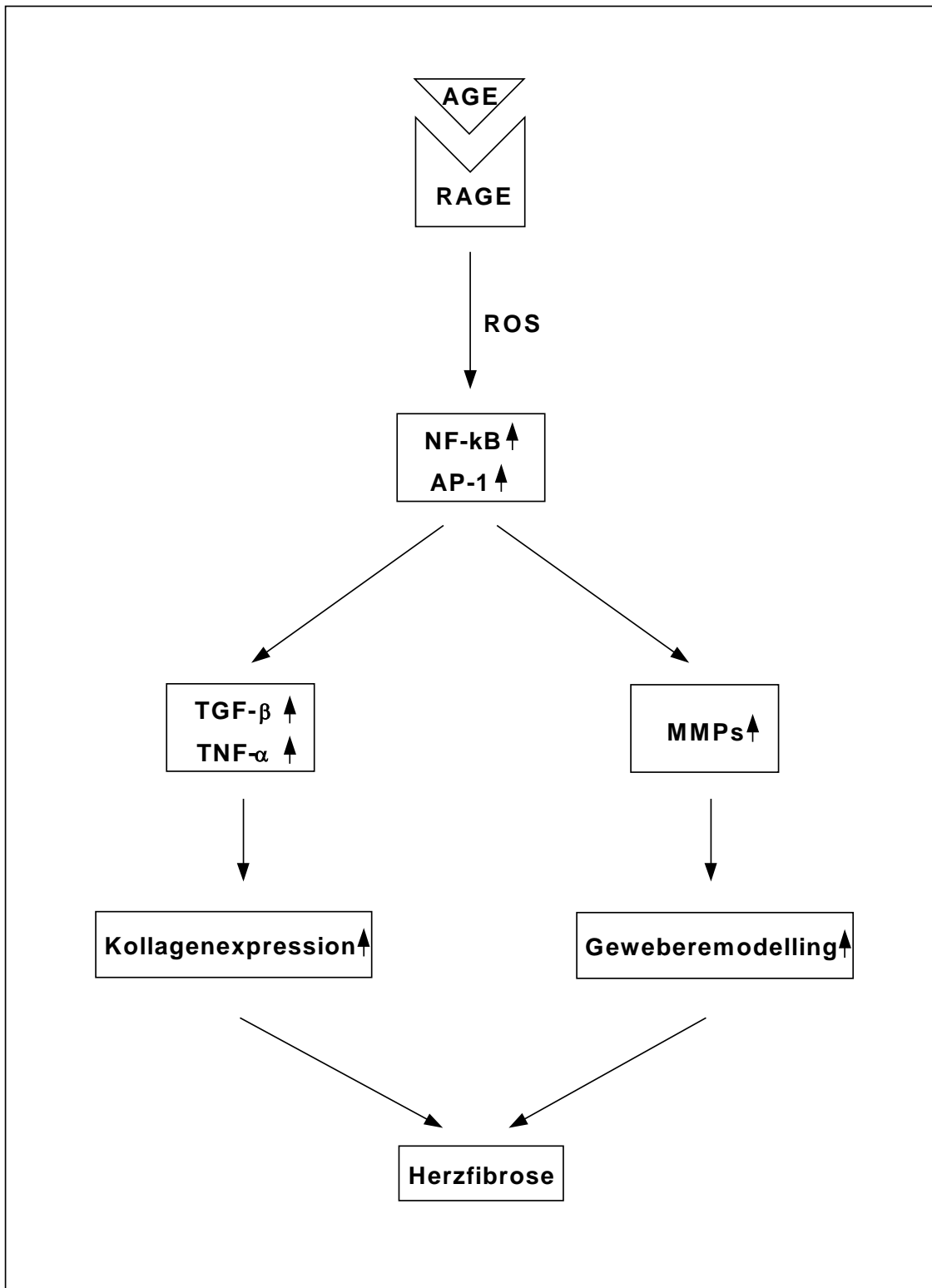


Abbildung 12

Möglicher Weg der Herzfibroseentwicklung durch die ausgelöste Signalkaskade via AGE-RAGE Interaktion.

4.2 Post-transkriptionelle Regulation des RAGE und AGE-R3

In dieser Arbeit wird trotz einer Herunterregulation der RAGE und AGE-R3 mRNA während des Alterns eine erhöhte RAGE und AGE-R3 Proteinmenge im Alter gefunden. Ausgehend von dem klassischen Transkriptionsweg sollte die Proteinexpression in gleichem Maße wie die mRNA-Expression steigen oder sinken [61, 139, 140]. Dieser Unterschied in der Protein- und Genexpression der Rezeptoren suggeriert, dass diese Rezeptoren nicht auf der klassischen Transkriptionsebene, sondern auf der post-transkriptionellen Ebene reguliert werden.

Es existieren andere Rezeptorproteine, die ebenfalls auf der post-transkriptionellen Ebene reguliert werden, darunter der β_1 -Adrenorezeptor [63], der NMDA-Rezeptor [24], der Bradykinin B1-Rezeptor [148] und der Transferrin-Rezeptor [123]. Die von der mRNA-Expression abweichend hohe Proteinexpression von AGE-R3 und RAGE, welche während des Alterns beobachtet werden, könnte durch folgende Prozesse verursacht sein: 1.) Steigerung der Translation und 2.) Verringerung des Abbaus des jeweiligen Proteins. Eine Steigerung der Translation eines Proteins kann durch den höheren Anteil an ribosomaler RNA (rRNA), der in gealterten verglichen mit jungen Zellen zu beobachten ist, erklärt werden [41]. Es ist allerdings unklar, ob diese quantitative Erhöhung mit einer gesteigerten ribosomalen Aktivität korrespondiert. Im allgemeinen geht man bisher davon aus, daß erniedrigte Proteinsyntheseraten durch eine verringerte Effektivität der Ribosomen verursacht wird [103], jedoch muß dies nicht für jede Zelle gelten, so daß das beobachtete Expressionsmuster durchaus durch eine quantitative Erhöhung der rRNA erklärbar ist. Eine andere Erklärung könnte sein, daß ein verringerter Umsatz von Rezeptorproteinen während des Alterns in einer höheren Expression resultiert. Über den Mechanismus, der den Abbau der Rezeptoren regelt, ist bisher so gut wie nichts bekannt, wobei dies durch proteasomale oder lysosomale Wege geschehen könnte [117, 138]. Von diesen beiden Möglichkeiten ist bekannt, daß sie durch Altern [39, 96], oxidativen Streß [28] und direkt durch AGEs [22], beeinträchtigt werden. Ein so verringerter Abbau der Rezeptoren könnte die Diskrepanz zwischen hohen Protein- und geringen mRNA-Level während des Alterns erklären.

4.3 Auswirkung der Expression von AGE-R3 und RAGE auf klinische Parameter

In dieser Arbeit wird nicht nur die altersabhängige Expression der fünf AGE-Rezeptoren verglichen, sondern auch gezeigt, dass diese mit den erhobenen klinischen Parameter der einzelnen Patienten korreliert.

Der Vergleich des Herzindex ergibt, daß eine erhöhte Proteinexpression des RAGE mit einer verringerten Herzleistung vergesellschaftet ist. Da RAGE über seine Signalkaskade sehr wahrscheinlich an der Generierung von Fibrose beteiligt ist, könnte dieses Ergebnis eine Bestätigung darstellen. Eine durch Fibrose verursachte myokardiale Steifigkeit führt klinisch zu einer verminderten Herzleistung, die durch die AGE-RAGE Interaktion forciert werden könnte. Die RAGE Genexpression zeigt keine signifikante Beziehung zu dem Herzindex, was aber bei der wahrscheinlichen post-transkriptionellen Regulation nicht verwunderlich scheint.

Des weiteren wird untersucht, ob die sich ein Zusammenhang zwischen der postoperativen Liegezeit auf der Intensivstation und der Rezeptorexpression erkennen läßt. Dabei war kein Zusammenhang mit der Expression von RAGE zu finden. Es zeigt sich, daß die Proteinexpression des AGE-R3 in den Herzohren der Patienten, die einen prolongierten Intensivstationaufenthalt erlebten, signifikant höher waren als jene, deren Aufenthaltszeit sich im normalen Rahmen bewegte. Obwohl der AGE-R3 auch protektive Aktivitäten für Gewebe zeigt, so veranschaulicht dieses Ergebnis, daß er am menschlichen Herzen eher eine pathophysiologische Rolle einnimmt. Da dem AGE-R3 auch beim Remodelling eine Funktion zugesprochen wird, könnte dies als pathophysiologischer Mechanismus für die verlängerte Rekonvaleszenz nach ACVB-Operationen dienen.

Als morphologisches Korrelat der Ausdehnung der Herz/Gefäßschädigung wird die Anzahl der gelegten Bypässe mit der Rezeptorexpression in Abhängigkeit gebracht.

Diskussion: AGEs > Gefäßschädigung (Arteriosklerose) > je mehr - desto mehr Bypässe > AGE-R3 korreliert so vielleicht indirekt mit den im Alter erhöhten AGEs.

Es kann demonstriert werden, daß eine erhöhte AGE-R3 Proteinexpression im menschlichen Herzen, mit einer erhöhten Anzahl von aorto-koronaren Bypässen auftritt. Der AGE-R3 ist an der Pathogenese der Schaumzellen in atheromatösen Plaques

beteiligt, was mit dem Ergebnis der Untersuchung vereinbar ist. Allerdings ist es wahrscheinlich, daß der Remodelling-Effekt des Rezeptors im Rahmen der Pathogenese der KHK auch im Herzgewebe selbst stattfindet und nicht allein durch die Beteiligung an der Entstehung von Atherosklerose zum Tragen kommt.

Durch die im Alter akkumulierenden AGEs kommt es zu Gefäßschäden. Es ist anzunehmen, daß je mehr AGEs sich ablagern potentiell mehr Bypässe zu implantieren sind, da die Gefäßschäden größer sind und nominell mehr Gefäße betroffen sind. So könnte es sein, daß die AGE-R3-Rezeptorexpression auch nur indirekt mit den im Alter erhöhten AGE-Ablagerungen korreliert.

4.4 Ausblick

Die durch die Arbeit entstandenen Erkenntnisse, könnten dazu beitragen neue, adjuvante Therapiemöglichkeiten und Prophylaxe der KHK zu entwickeln.

Mögliche Ansatzpunkte, den schädigenden Einfluß der AGE-AGE-Rezeptoren-Interaktion zu unterbinden, liegen darin, diese Interaktionen zu inhibieren. Zum einen könnte man die Möglichkeiten der Inhibition der AGE-Bildung und dem Wiederaufbrechen schon vorhandener AGE-Formationen erweitern. Viel versprechende Substanzen wie Aminoguanidin, ALT-711 und sRAGE sollten weiterentwickelt werden, so daß diese Substanzklassen auch beim Menschen einsetzbar sind. Zum anderen könnten Wege erschlossen werden, die es möglich machen, die Signalkaskaden, die letztendlich die Gewebe schädigen, zu unterbinden. Allerdings müssen weitere Studien den Ablauf dieser Signalkaskaden zu entschlüsseln helfen, da dies nicht detailliert bekannt ist. Zusätzlich müßte man die protektiven Mechanismen der AGE-Rezeptoren weiter untersuchen und prüfen inwieweit es möglich ist, diese selektiv zu stimulieren und welchen Benefit der Organismus dadurch erhält. Schließlich sollten weitere Studien den vermuteten Prozess der post-transkriptionellen Regulation des AGE-R3 und RAGE verifizieren, um den Zusammenhang zwischen der Gen- und Proteinexpression während des Alterns zu klären.

5 Literaturverzeichnis

1. *Todesursachen 1999*. 1999, Statistisches Bundesamt.
2. Abel, M., et al., *Expression of receptors for advanced glycosylated end-products in renal disease*. *Nephrol Dial Transplant*, 1995. **10**(9): p. 1662-7.
3. Arar, C., et al., *Galectin-3 gene (LGALS3) expression in experimental atherosclerosis and cultured smooth muscle cells*. *FEBS Lett*, 1998. **3**: p. 430.
4. Asif, M., et al., *An advanced glycation endproduct cross-link breaker can reverse age- related increases in myocardial stiffness*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(6): p. 2809-13.
5. Aubin, J.E., et al., *Osteoblast and chondroblast differentiation*. *Bone*, 1995. **17**(2 Suppl): p. 77S-83S.
6. Baeuerle, P. and D. Baltimore, *NF- κ B : ten years after*. *Cell*, 1996. **87**(13-20).
7. Barondes, S.H., et al., *Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(33): p. 20807-10.
8. Basta, G., et al., *Advanced glycation end products activate endothelium through signal- transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses*. *Circulation*, 2002. **105**(7): p. 816-22.
9. Baynes, J., *From life to death - the struggle between chemistry and biology during aging : the Maillard reaction as an amplifier of genomic damage*. *Biogerontology*, 2000. **1**: p. 235-246.
10. Baynes, J.W., *The Maillard hypothesis on aging: time to focus on DNA*. *Ann N Y Acad Sci*, 2002. **959**: p. 360-7.
11. Biemel, K.M., D.A. Friedl, and M.O. Lederer, *Identification and quantification of major maillard cross-links in human serum albumin and lens protein. Evidence for glucosepane as the dominant compound*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(28): p. 24907-15.
12. Bierhaus, A., et al., *Advanced glycation end product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE*. *Circulation*, 1997. **96**(7): p. 2262-71.
13. Bierhaus, A., et al., *Diabetes-associated sustained activation of the transcription*

- factor nuclear factor-kappaB*. Diabetes, 2001. **50**(12): p. 2792-808.
14. Boulanger, E., et al., *AGEs bind to mesothelial cells via RAGE and stimulate VCAM-1 expression*. Kidney Int, 2002. **61**(1): p. 148-56.
 15. Breitling-Utzmann, C.M., et al., *Identification and quantification of phosphatidylethanolamine-derived glucosylamines and aminoketoses from human erythrocytes--influence of glycation products on lipid peroxidation*. Arch Biochem Biophys, 2001. **391**(2): p. 245-54.
 16. Bresalier, R.S., et al., *Expression of the endogenous galactose-binding protein galectin-3 correlates with the malignant potential of tumors in the central nervous system*. Cancer, 1997. **80**(4): p. 776-87.
 17. Brook, M., et al., *Regulation of tumour necrosis factor alpha mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signalling cascade*. FEBS Lett, 2000. **483**: p. 57-61.
 18. Brownlee, M., *The pathological implications of protein glycation*. Clin Invest Med, 1995. **18**(4): p. 275-81.
 19. Brownlee, M., A. Cerami, and H. Vlassara, *Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications*. N Engl J Med, 1988. **318**(20): p. 1315-21.
 20. Bucciarelli, L., et al., *RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice*. Circulation, 2002. **106**: p. 2827-2835.
 21. Bucciarelli, L.G., et al., *RAGE is a multiligand receptor of the immunoglobulin superfamily: implications for homeostasis and chronic disease*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(7): p. 1117-28.
 22. Bulteau, A.L., et al., *Proteasome inhibition in glyoxal-treated fibroblasts and resistance of glycated glucose-6-phosphate dehydrogenase to 20 S proteasome degradation in vitro*. J Biol Chem, 2001. **276**(49): p. 45662-8.
 23. Castellani, R.J., et al., *Hydroxynonenal adducts indicate a role for lipid peroxidation in neocortical and brainstem Lewy bodies in humans*. Neurosci Lett, 2002. **319**(1): p. 25-8.
 24. Cebers, G., et al., *Increased ambient glutamate concentration alters the expression of NMDA receptor subunits in cerebellar granule neurons*. Neurochem Int, 2001. **39**(2): p. 151-60.

25. Cerami, C., et al., *Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(25): p. 13915-20.
26. Cervantes-Laurean, D., E.L. Jacobson, and M.K. Jacobson, *Glycation and glycooxidation of histones by ADP-ribose*. J Biol Chem, 1996. **271**(18): p. 10461-9.
27. Chirgwin, J.M., et al., *Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease*. Biochemistry, 1979. **18**(24): p. 5294-9.
28. Conconi, M., et al., *Age-related decline of rat liver multicatalytic proteinase activity and protection from oxidative inactivation by heat-shock protein 90*. Arch Biochem Biophys, 1996. **331**(2): p. 232-40.
29. Corman, B., et al., *Aminoguanidine prevents age-related arterial stiffening and cardiac hypertrophy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(3): p. 1301-6.
30. Cutler, R., *Evolution of human longevity and the genetic complexity governing aging rate*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**: p. 4664-4668.
31. Dagher, S.F., J.L. Wang, and R.J. Patterson, *Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(4): p. 1213-7.
32. Daoud, S., et al., *Advanced glycation endproducts: activators of cardiac remodeling in primary fibroblasts from adult rat hearts*. Mol Med, 2001. **7**(8): p. 543-51.
33. de Winther, M., et al., *Macrophage Scavenger Receptor Class A : A Multifunctional Receptor in Atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**: p. 290-297.
34. DeGroot, J., et al., *Accumulation of advanced glycation end products decreases collagen turnover by bovine chondrocytes*. Exp Cell Res, 2001. **266**(2): p. 303-10.
35. Dei, R., et al., *Lipid peroxidation and advanced glycation end products in the brain in normal aging and in Alzheimer's disease*. Acta Neuropathol (Berl), 2002. **104**(2): p. 113-22.
36. Edelstein, D. and M. Brownlee, *Mechanistic studies of advanced glycosylation end product inhibition by aminoguanidine*. Diabetes, 1992. **41**(1): p. 26-9.
37. Fehrenbach, H., et al., *Up-regulated expression of the receptor for advanced glycation end products in cultured rat hepatic stellate cells during transdifferentiation to myofibroblasts*. Hepatology, 2001. **34**(5): p. 943-52.

38. Finkel, T. and N. Holbrook, *Oxidants, oxidative stress and the biology of aging*. Nature, 2000. **408**: p. 239-245.
39. Friguet, B., et al., *Protein degradation by the proteasome and its implications in aging*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **908**: p. 143-54.
40. Goova, M.T., et al., *Blockade of receptor for advanced glycation end-products restores effective wound healing in diabetic mice*. Am J Pathol, 2001. **159**(2): p. 513-25.
41. Halle, J.P., et al., *Copy number, epigenetic state and expression of the rRNA genes in young and senescent rat embryo fibroblasts*. Eur J Cell Biol, 1997. **74**(3): p. 281-8.
42. Hangaishi, M., et al., *Increased aggregation of human platelets produced by advanced glycation end products in vitro*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **248**(2): p. 285-92.
43. Harman, D., *Aging : a theory based on free radical and radiation chemistry*. J. Gerontol., 1957. **2**: p. 298-300.
44. Harman, D., *Free radical theorie of aging : history*. EXS, 1992. **62**: p. 1-10.
45. Hayflick, L., *The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains*. Exp Cell Res, 1965. **37**: p. 614-636.
46. He, C.J., et al., *Presence of diabetic complications in type 1 diabetic patients correlates with low expression of mononuclear cell AGE-receptor-1 and elevated serum AGE*. Mol Med, 2001. **7**(3): p. 159-68.
47. He, C.J., et al., *Differential expression of renal AGE-receptor genes in NOD mice: possible role in nonobese diabetic renal disease*. Kidney Int, 2000. **58**(5): p. 1931-40.
48. Heidland, A., K. Sebekova, and R. Schinzel, *Advanced glycation end products and the progressive course of renal disease*. Am J Kidney Dis, 2001. **38**(4 Suppl 1): p. S100-6.
49. Hirai, M. and N. Shimizu, *Purification of two distinct proteins of approximate Mr 80,000 from human epithelial cells and identification as proper substrates for protein kinase C*. Biochem J, 1990. **270**(3): p. 583-9.
50. Hofmann, M.A., et al., *RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides*. Cell, 1999. **97**(7): p. 889-

901.

51. Hong, S.B., et al., *Effect of advanced glycation end products on lens epithelial cells in vitro*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **275**(1): p. 53-9.
52. Hori, O., et al., *The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphoterin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphoterin in the developing nervous system*. J Biol Chem, 1995. **270**(43): p. 25752-61.
53. Huang, J.S., et al., *Role of receptor for advanced glycation end-product (RAGE) and the JAK/STAT-signaling pathway in AGE-induced collagen production in NRK- 49F cells*. J Cell Biochem, 2001. **81**(1): p. 102-13.
54. Huttunen, H.J., et al., *Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation*. J Biol Chem, 2000. **275**(51): p. 40096-105.
55. Hypothesis, C., *Glucose as mediator of aging*. J Am Geriatr Soc, 1985. **33**: p. 626-634.
56. Ino Husedzinovic, S.B., Dinko Tonkovic, Sinisa Sostaric, *Measuring Cardiac Output during Dobutamine Infusion after Off-pump Coronary Artery Bypass : Comparison of Transesophageal Echo-Doppler and Thermodilution*. Croatian Medical Journal, 2002. **43**(6): p. 680-684.
57. Inohara, H., S. Akahani, and A. Raz, *Galectin-3 stimulates cell proliferation*. Exp Cell Res, 1998. **245**(2): p. 294-302.
58. Iwashima, Y., et al., *Advanced glycation end products-induced gene expression of scavenger receptors in cultured human monocyte-derived macrophages*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **277**(2): p. 368-80.
59. Jinnouchi, Y., et al., *Glycolaldehyde-modified low density lipoprotein leads macrophages to foam cells via the macrophage scavenger receptor*. J Biochem (Tokyo), 1998. **123**(6): p. 1208-17.
60. Kass, D., *Getting better without AGE : New insight into the diabetic heart*. Circ Res, 2003. **92**: p. 704-709.
61. Katsuoka, F., et al., *Type II alveolar epithelial cells in lung express receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **238**(2): p. 512-6.

62. Kee, C., et al., *Identification of p90, Prominent Tyrosine-phosphorylated Protein in Fibroblast Growth Factor-stimulated Cells, as 80 K-H*. Am.Soc. for Bioch.Mol.Biol., 1996. **271**(10): p. 5832-5838.
63. Kirigiti, P., et al., *Agonist-mediated down-regulation of rat beta1-adrenergic receptor transcripts: role of potential post-transcriptional degradation factors*. Mol Pharmacol, 2001. **60**(6): p. 1308-24.
64. Kislinger, T., et al., *N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression*. J Biol Chem, 1999. **274**(44): p. 31740-9.
65. Kislinger, T., et al., *Receptor for advanced glycation end products mediates inflammation and enhanced expression of tissue factor in vasculature of diabetic apolipoprotein E-null mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(6): p. 905-10.
66. Koenig, R., et al., *Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus*. N Engl J Med, 1976. **295**: p. 417-420.
67. Kouda, K., et al., *The relationship of oxidative DNA damage marker 8-hydroxydeoxyguanosine and glycoxidative damage marker pentosidine*. Clin Biochem, 2001. **34**(3): p. 247-50.
68. Krieger, M., *The other side of scavenger receptors : pattern recognition for host defense*. Curr Opin Lipidol, 1997. **8**: p. 275-280.
69. Kume, S., et al., *Immunohistochemical and ultrastructural detection of advanced glycation end products in atherosclerotic lesions of human aorta with a novel specific monoclonal antibody*. Am J Pathol, 1995. **147**(3): p. 654-67.
70. Kuwabara, I. and F.T. Liu, *Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin*. J Immunol, 1996. **156**(10): p. 3939-44.
71. Lander, H.M., et al., *Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress*. J Biol Chem, 1997. **272**(28): p. 17810-4.
72. Li, Y., C. McTiernan, and A. Feldman, *Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling*. Cardiovasc Res, 2000. **46**: p. 214-224.

73. Li, Y.M., et al., *Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation endproduct receptors: relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80K-H membrane proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(20): p. 11047-52.
74. Li, Y.M., et al., *Prevention of cardiovascular and renal pathology of aging by the advanced glycation inhibitor aminoguanidine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(9): p. 3902-7.
75. Lithner, F., et al., *Clinical characteristics in diabetic stroke patients*. Diabete Metab, 1988. **14**: p. 15-19.
76. Lyons, T.J., et al., *Role of glycation in modification of lens crystallins in diabetic and nondiabetic senile cataracts*. Diabetes, 1991. **40**(8): p. 1010-5.
77. Ma, L., R. Carter, and A. Morton, *RAGE is expressed in pyramidal cells of the hippocampus following moderate hypoxic-ischemic brain injury in rats*. Brain Res, 2003. **966**: p. 167-174.
78. Maillard, L. and M. Gaultier, *Action des acides amines sur les sucres : formation des melanoidines par voie methodique*. C R Seances Acad Sci III, 1912. **154**: p. 66-68.
79. Makita, Z., et al., *Reactive glycosylation endproducts in diabetic uraemia and treatment of renal failure*. Lancet, 1994. **343**(8912): p. 1519-22.
80. Mazurek, N., et al., *Phosphorylation of the beta-galactoside-binding protein galectin-3 modulates binding to its ligands*. J Biol Chem, 2000. **275**(46): p. 36311-5.
81. McCord, J. and I. Fridovich, *Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyperin (hemocuperin)*. J Biol Chem, 1969. **244**: p. 6049-6055.
82. Mizutani, K., et al., *Inhibitor for advanced glycation end products formation attenuates hypertension and oxidative damage in genetic hypertensive rats*. J Hypertens, 2002. **20**(8): p. 1607-14.
83. Mori, T., et al., *Localization of advanced glycation end products of Maillard reaction in bovine tissues and their endocytosis by macrophage scavenger receptors*. Exp Mol Pathol, 1995. **63**(2): p. 135-52.
84. Mott, J.D., et al., *Nonenzymatic glycation of type IV collagen and matrix metalloproteinase susceptibility*. Kidney Int, 1997. **52**(5): p. 1302-12.
85. Murata, T., et al., *The relationship between accumulation of advanced glycation*

- end products and expression of vascular endothelial growth factor in human diabetic retinas*. Diabetologia, 1997. **40**(7): p. 764-9.
86. Nachtigal, M., et al., *Galectin-3 expression in human atherosclerotic lesions*. Am J Pathol, 1998. **152**(5): p. 1199-208.
87. Nawroth, P.P., et al., [*Non-enzymatic glycation and oxidative stress in chronic illnesses and diabetes mellitus*]. Med Klin, 1999. **94**(1): p. 29-38.
88. Neeper, M., et al., *Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins*. J Biol Chem, 1992. **267**(21): p. 14998-5004.
89. Nicholl, I.D. and R. Bucala, *Advanced glycation endproducts and cigarette smoking*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 1998. **44**(7): p. 1025-33.
90. O'Brian, J. and P. Morrissey, *Nutritional and toxicological aspects of the maillard browning reaction in foods*. Crit Rev Food Sci Nutr, 1989. **28**: p. 211-248.
91. Ochieng, J., et al., *Galectin-3 regulates the adhesive interaction between breast carcinoma cells and elastin*. J Cell Biochem, 1999. **75**(3): p. 505-14.
92. Oldfield, M.D., et al., *Advanced glycation end products cause epithelial-myofibroblast transdifferentiation via the receptor for advanced glycation end products (RAGE)*. J Clin Invest, 2001. **108**(12): p. 1853-63.
93. Openo, K.P., et al., *Galectin-3 expression and subcellular localization in senescent human fibroblasts*. Exp Cell Res, 2000. **255**(2): p. 278-90.
94. Park, L., et al., *Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts*. Nat Med, 1998. **4**(9): p. 1025-31.
95. Perillo, N.L., M.E. Marcus, and L.G. Baum, *Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death*. J Mol Med, 1998. **76**(6): p. 402-12.
96. Petropoulos, I., et al., *Increase of oxidatively modified protein is associated with a decrease of proteasome activity and content in aging epidermal cells*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2000. **55**(5): p. B220-7.
97. Pirart, J., *Diabetes mellitus and its degenerative complications: prospective study of 4400 patients observed between 1947 and 1973*. Diabetes Care, 1978. **188**: p. 252-63.

98. Pricci, F., et al., *Role of galectin-3 as a receptor for advanced glycosylation end products*. *Kidney Int Suppl*, 2000. **77**: p. S31-9.
99. Pugliese, G., et al., *Accelerated diabetic glomerulopathy in galectin-3/AGE receptor 3 knockout mice*. *Faseb J*, 2001. **15**(13): p. 2471-9.
100. Pugliese, G., et al., *The diabetic milieu modulates the advanced glycation end product- receptor complex in the mesangium by inducing or upregulating galectin- 3 expression*. *Diabetes*, 2000. **49**(7): p. 1249-57.
101. Pugliese, G., et al., *The diabetic milieu modulates the advanced glycation end product-receptor complex in the mesangium by inducing or upregulating galectin-3 expression*. *Diabetes*, 2000. **49**(7): p. 1249-57.
102. Pyorala, K., *Diabetes and coronary artery disease: what a coincidence?* *J Cardiovasc Pharmacol*, 1990. **16**: p. S8-14.
103. Rattan, S.I., *Synthesis, modifications, and turnover of proteins during aging*. *Exp Gerontol*, 1996. **31**(1-2): p. 33-47.
104. Ruderman, N. and C. Haudenschild, *Diabetes as an atherogenetic factor*. *Progress in cardiovascular Diseases*, 1984. **26**: p. 273-412.
105. Sakai, K., et al., *Isolation of cDNAs encoding a substrate for protein kinase C: nucleotide sequence and chromosomal mapping of the gene for a human 80K protein*. *Genomics*, 1989. **5**(2): p. 309-15.
106. Sakata, N., et al., *Nonenzymatic glycation and extractability of collagen in human atherosclerotic plaques*. *Atherosclerosis*, 1995. **116**(1): p. 63-75.
107. Sano, H., et al., *Receptors for proteins modified by advanced glycation endproducts (AGE)- their functional role in atherosclerosis*. *Mech Ageing Dev*, 1999. **107**(3): p. 333-46.
108. Sasaki, N., et al., *Immunohistochemical distribution of the receptor for advanced glycation end products in neurons and astrocytes in Alzheimer's disease*. *Brain Res*, 2001. **888**(2): p. 256-262.
109. Schleicher, E., E. Wagner, and A. Nerlich, *Increased Accumulation of the Glycoxidation Product Ne-(carboxymethyl)lysine in Human Tissues in Diabetes and Aging*. *J. Clin. Invest.*, 1997. **99**(3): p. 457-468.
110. Schleicher, E.D., E. Wagner, and A.G. Nerlich, *Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)- (carboxymethyl)lysine in human tissues in*

- diabetes and aging*. J Clin Invest, 1997. **99**(3): p. 457-68.
111. Schmidt, A.M., et al., *The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1498**(2-3): p. 99-111.
 112. Sell, D.R., N.R. Kleinman, and V.M. Monnier, *Longitudinal determination of skin collagen glycation and glycoxidation rates predicts early death in C57BL/6NNIA mice*. Faseb J, 2000. **14**(1): p. 145-56.
 113. Sell, D.R., et al., *Longevity and the genetic determination of collagen glycoxidation kinetics in mammalian senescence*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(1): p. 485-90.
 114. Singh, R., et al., *Advanced glycation end-products: a review*. Diabetologia, 2001. **44**(2): p. 129-46.
 115. Smith, M.A., et al., *Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(12): p. 5710-4.
 116. Stern, D.M., et al., *Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and the complications of diabetes*. Ageing Res Rev, 2002. **1**(1): p. 1-15.
 117. Stitt, A.W., et al., *Advanced glycation end-product receptor interactions on microvascular cells occur within caveolin-rich membrane domains*. Faseb J, 2000. **14**(15): p. 2390-2.
 118. Sun, M., et al., *Deposition of advanced glycation end products (AGE) and expression of the receptor for AGE in cardiovascular tissue of the diabetic rat*. Int J Exp Pathol, 1998. **79**(4): p. 207-22.
 119. Tanaka, N., et al., *The receptor for advanced glycation end products is induced by the glycation products themselves and tumor necrosis factor-alpha through nuclear factor-kappa B, and by 17beta-estradiol through Sp-1 in human vascular endothelial cells*. J Biol Chem, 2000. **275**(33): p. 25781-90.
 120. Tanji, N., et al., *Expression of advanced glycation end products and their cellular receptor RAGE in diabetic nephropathy and nondiabetic renal disease*. J Am Soc Nephrol, 2000. **11**(9): p. 1656-66.
 121. Thornalley, P.J., *Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 1998. **44**(7): p. 1013-23.
 122. Throckmorton, D.C., et al., *PDGF and TGF-beta mediate collagen production by*

- mesangial cells exposed to advanced glycosylation end products.* *Kidney Int*, 1995. **48**(1): p. 111-7.
123. Tong, X., H. Kawabata, and H.P. Koeffler, *Iron deficiency can upregulate expression of transferrin receptor at both the mRNA and protein level.* *Br J Haematol*, 2002. **116**(2): p. 458-64.
124. Ulrich, P. and A. Cerami, *Protein glycation, diabetes, and aging.* *Recent Prog Horm Res*, 2001. **56**: p. 1-21.
125. Vasan, S., et al., *An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks in vitro and in vivo.* *Nature*, 1996. **382**(6588): p. 275-8.
126. Verbeke, P., et al., *Accumulation of advanced glycation endproducts in the rat nephron: link with circulating AGEs during aging.* *J Histochem Cytochem*, 1997. **45**(8): p. 1059-68.
127. Verzijl, N., et al., *Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen.* *Biochem J*, 2000. **350 Pt 2**: p. 381-7.
128. Vitek, M.P., et al., *Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(11): p. 4766-70.
129. Vlassara, H., R. Bucala, and L. Striker, *Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging.* *Lab Invest*, 1994. **70**(2): p. 138-51.
130. Vlassara, H., et al., *Exogenous advanced glycosylation end products induce complex vascular dysfunction in normal animals: a model for diabetic and aging complications.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(24): p. 12043-7.
131. Vlassara, H. and M.R. Palace, *Diabetes and advanced glycation endproducts.* *J Intern Med*, 2002. **251**(2): p. 87-101.
132. Vlassara, H., et al., *Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(24): p. 11704-8.
133. Wang, L., et al., *Galectin-1 and galectin-3 in chronic pancreatitis.* *Lab Invest*, 2000. **80**(8): p. 1233-41.
134. Wautier, M.P., et al., *Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE.* *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001. **280**(5): p. E685-94.

135. Weiss, M.F., *Pathogenic role of advanced glycation end-products (AGEs): an overview*. Perit Dial Int, 1999. **19**(Suppl 2): p. S47-52.
136. Whittaker, P., *Unravelling the mysteries of collagen and cicatrix after myocardial infarction*. Cardiovasc Res, 1995. **29**: p. 758-762.
137. Winzen, R., et al., *The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism*. EMBO J, 1999. **18**: p. 4969-4980.
138. Xiang, G., et al., *Advanced glycation end products (AGEs)-induced expression of TGF-beta 1 is suppressed by a protease in the tubule cell line LLC-PK1*. Nephrol Dial Transplant, 2001. **16**(8): p. 1562-9.
139. Yamagishi, S., et al., *Advanced glycation endproducts inhibit prostacyclin production and induce plasminogen activator inhibitor-1 in human microvascular endothelial cells*. Diabetologia, 1998. **41**(12): p. 1435-41.
140. Yamanouchi, J., et al., *Expression of lipoprotein receptors in the aortic walls of diabetic APA hamsters*. Exp Anim, 2002. **51**(1): p. 33-41.
141. Yan, S.D., et al., *Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins*. J Biol Chem, 1994. **269**(13): p. 9889-97.
142. Yang, C.W., et al., *Overexpression of transforming growth factor-beta 1 mRNA is associated with up-regulation of glomerular tenascin and laminin gene expression in nonobese diabetic mice*. J Am Soc Nephrol, 1995. **5**(8): p. 1610-7.
143. Yang, R.Y., D.K. Hsu, and F.T. Liu, *Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(13): p. 6737-42.
144. Yeh, C.H., et al., *Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor-kappaB transcriptional activation and cytokine secretion*. Diabetes, 2001. **50**(6): p. 1495-504.
145. Yokoo, T. and M. Kitamura, *Dual regulation of IL-1 beta- mediated matrix metalloproteinase-9 expression in mesangial cells by NF-kappa B and AP-1*. Am J Physiol, 1996. **270**: p. F123-F130.
146. Yoshii, T., et al., *Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest*. J Biol Chem, 2002. **277**(9): p. 6852-7.
147. Zhao, W., P.S. Devamanoharan, and S.D. Varma, *Fructose-mediated damage to*

- lens alpha-crystallin: prevention by pyruvate.* Biochim Biophys Acta, 2000. **1500**(2): p. 161-8.
148. Zhou, X., et al., *Posttranscriptional destabilization of the bradykinin B1 receptor messenger RNA: cloning and functional characterization of the 3'- untranslated region.* Mol Cell Biol Res Commun, 1999. **1**(1): p. 29-35.
149. Zhu, W., et al., *The role of galectin-3 in endocytosis of advanced glycation end products and modified low density lipoproteins.* Biochem Biophys Res Commun, 2001. **280**(4): p. 1183-8.

6 Thesen

1. Im humanen Herzen werden alle bekannten und untersuchten Rezeptoren für Advanced Glycation Endproducts (AGE-R1, AGE-R2, AGE-R3, ScR-II und RAGE) exprimiert.
2. Von den untersuchten Rezeptoren ändern AGE-R1 und AGE-R2 ihre Expression mit dem Alter nicht.
3. Die mRNA-Expression vom Macrophage Scavenger-Rezeptor-II am menschlichen Herzen steigt signifikant mit dem Alter.
4. Die Expression vom Advanced Glycation Endproduct-Rezeptor-3 (AGE-R3) hat auf mRNA Ebene ein Maximum im mittleren Lebensalter, während die Proteinmenge dieses Rezeptors im hohen Alter am höchsten ist.
5. Die mRNA-Expression vom Rezeptor für AGEs (RAGE) zeigt eine signifikante Reduktion während des Alterns, die Proteinmenge dieses Rezeptors steigt hingegen mit zunehmenden Alter signifikant an.
6. Die Ergebnisse der mRNA- und Proteinexpression der Rezeptoren AGE-R3 und RAGE lassen vermuten, daß diese am menschlichen Herzen nicht ausschließlich auf der Transkriptions-, sondern auch auf post-transkriptioneller Ebene reguliert werden.
7. Eine hohe RAGE Proteinexpression am menschlichen Herzen korreliert mit einer verringerten präoperativen Herzfunktion (gemessen als erniedrigter Herzindex).
8. Ein hohe AGE-R3 Proteinexpression am menschlichen Herzen ist nach ACVB-Operationen mit einer signifikant verlängerten postoperativen Aufenthaltszeit auf der Intensivstation verbunden.
9. Eine erhöhte AGE-R3 Proteinexpression am menschlichen Herzen korreliert signifikant mit einer erhöhten Anzahl an implantierten Bypässen.

Veröffentlichungen

Während der vorgelegten Dissertation entstanden folgende Publikationen, Abstracts bzw. Bücherbeiträge

Vollpublikationen

C.Caßelmann, A.Reimann, I.Friedrich, A.Schubert, R-E.Silber, A.Simm:
Age-dependent Expression of Advanced Glycation Endproduct (AGE)-Receptor Genes in the Human Heart.

Gerontology, 2004. **50 (3)** : 127-134

A.Simm, C.Caßelmann, A.Schubert, S.Hofmann, A.Reimann, R.-E. Silber:
Age associated changes of AGE-receptor expression : RAGE upregulation is associated with human heart dysfunction.

Experimental Gerontology, 2004. **39(3)** : 407-414

Abstracts

RAGE and AGE-R3, AGE receptors with different pathophysiological functions

Andreas Simm, Juliane Wagner, Christian Caßelmann, Reinhard Schinzel, Rolf-Edgar Silber

Signal Transduction: Receptors Mediators and Genes 3-4 (2003) 185

RAGE, a new pleiotropic antagonistic gene?

Andreas Simm, Christian Caßelmann, Juliane Wagner, Amanda Reimann, Sherif Daoud, Rolf-Edgar Silber

Signal Transduction: Receptors Mediators and Genes 3-4 (2002) 140

Is RAGE a possible new example for a pleiotropic antagonism during ageing?

Andreas Simm, Sherif Daoud, Amanda Reimann, Juliane Wagner, Christian Caßelmann, Rolf-Edgar Silber

Tagungsbeitrag im Rahmen der AGE-2003 Tagung, Jena 2003-12-03

Advanced Glycation Endproducts induced cell signalling in rat cardiac fibroblasts

A. Simm, S. Daoud, C. Caßelmann, R.-E. Silber, R. Schinzel

Tagungsbeitrag im Rahmen der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Molekularbiologie und Biochemie, Halle 2002

Buchbeiträge

Simm A., Daoud S., Caßelmann C., Wagner J., Schinzel R., Silber R.E. : *RAGE und Advanced Glycation Endproducts : Physiologische und Pathophysiologische Bedeutung*

Diabetologicum Halle 2003, ISDN-Nr. 3-86010-714-3

Lebenslauf

Persönliche Daten

Christian Andreas Caßelmann

geb. am 08.05.1977 in Kassel

ledig

römisch-katholisch

Schulbildung

1983-1987 Grundschule Espenau

1987-1996 Engelsburggymnasium Kassel

Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Wehr-/Ersatzdienst

1996-1997 Zivildienst beim Arbeiter-Samariter-Bund in Kassel

Ausbildung zum Rettungssanitäter

Studium

1997-2003 Studium der Humanmedizin, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

1999 Physikum

2000 1. Staatsexamen

2002 2. Staatsexamen

2003 3. Staatsexamen

Ausbildung

Seit 01.03.04 Arzt im Praktikum in der Allgemein- und Unfallchirurgie im Klinikum Links der Weser, Bremen.

Seit 01.10.04 Assistenzarzt in der Allgemein- und Unfallchirurgie im Klinikum Links der Weser, Bremen.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß die vorliegende Arbeit selbständig durch mich und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel erstellt wurde. Ich erkläre weiterhin, daß frühere Promotionsversuche mit der gleichen Dissertation nicht erfolgt sind. Die jetzt vorliegende Dissertation wird erstmalig und nur an der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg eingereicht.

Christian Caßelmann

Bremen, den 30.Oktober 2004

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Doz. Dr. A. Simm für die Überlassung des interessanten Themas, sowie für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung. Seine hohe Kompetenz und die Fähigkeit ständig neue Ideen und Problemlösungen zu entwickeln, hat mich sehr motiviert. Da er mir stets als Ansprechpartner zur Verfügung stand, war er mir eine große Hilfe.

Herrn Prof. Dr. R.-E. Silber danke ich für die Möglichkeit, die Dissertation im Labor der Klinik für Herz-Thorax-Chirurgie der MLU Halle-Wittenberg, erstellen zu können.

Herrn A. Schubert danke ich für die Überlassung der Herzohren der Kinder aus dem Labor der Universität Leipzig.

Der MTA Anke Graul danke ich für die gewissenhafte Einarbeitung in den Laborbetrieb und die Einführung in die Methodik der Molekularbiologie. Sie war mir während der gesamten Zeit stets eine große Hilfe.

Ich möchte mich auch bei allen Kollegen im Labor bedanken, die meine Zeit dort zu einem wichtigen Abschnitt in meinem Studienleben gemacht haben. Häufig sind sie mit der Grund gewesen, jeden Morgen mit Freude an die Arbeit zu gehen.

Letztendlich danke ich meiner Familie, die mir mit Ihrer Liebe und Unterstützung die Fertigstellung dieser Dissertation ermöglicht hat.