

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

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

**Untersuchung zum Einfluss des Rezeptors für
Advanced Glycation Endproducts (RAGE)
auf die Entstehung der Aortenklappenstenose bei Mäusen
unter einer Hochfetternährung**

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

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

von Yuliana Yakobus
geboren am 18.07.1977 in Pekanbaru

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Simm

Gutachter : 1. Prof. Dr. rer. nat. A. Simm
2. PD Dr. med. B. Niemann
3. PD Dr. rer. nat. V. Adams

Eröffnung des Verfahrens: 09.09.2014

Datum der Verteidigung: 18.02.2015 in Halle (Saale)

Referat

Die durch die Maillard-Reaktion entstehenden Advanced Glycation Endproducts (AGEs) stehen im Verdacht zur Entstehung der Aortenklappenstenose beizutragen. Eine Hochfetterernährung steht unter dem Verdacht, zu einer Akkumulation von AGEs beizutragen. Ob dies allerdings im gesunden Organismus das Herz- und Kreislaufsystem negativ beeinflusst, und die Entstehung von Erkrankungen wie z.B. der Aortenklappenstenose forcieren kann, wurde bisher kaum untersucht. Ziel der Arbeit war es daher, die Effekte einer fettreichen Ernährung auf das Herz eines gesunden Organismus zu untersuchen. Hierzu wurden Fütterungsstudien im Tiermodell Maus durchgeführt. Ob mögliche Wirkungen der AGE Akkumulation in Abhängigkeit von RAGE, dem Rezeptor für AGEs, ablaufen, sollte anhand der Verwendung einer RAGE Knockout Mauslinie geklärt werden. Die Versuchstiere waren sechs Wochen alte männliche Wildtypmäuse (n=14) und sechs Wochen alte männliche RAGE knockout Mäuse (n=14). Für den Versuch wurden die Tiere zufällig in je zwei Gruppen eingeteilt, die jeweils eine Normaldiät oder eine Hochfettdiät erhielten. Im Verlauf des Experiments wurde die Gewichtszunahme der Tiere wöchentlich gemessen und eine echokardiographische Untersuchung der Aortenklappen mit dem CW-Doppler nach 2, 4 und 7 Monaten durchgeführt. Am Ende des Experiments wurden Blutproben zur Untersuchung des Lipidstoffwechsels und die Herzen zur morphologischen, histologischen und immunohistochemischen Untersuchung entnommen. Diese Arbeit konnte zeigen, dass eine Hochfetterernährung über 7 Monate in einem Mausmodell zur Gewichtszunahme und zur Entstehung von morphologischen, histologischen und immunohistochemischen Veränderungen am Herzen und der Aortenklappe führt, die denen einer Aortenklappenstenose entsprechen. Das nicht Vorhandensein des AGE Rezeptors RAGE führte bei RAGE KO Mäusen unter einer Hochfettdiät zwar auch zur Gewichtszunahme, allerdings waren sie gegen die Entwicklung von Aortenklappen- und kardialen Veränderungen weitestgehend geschützt. Dies ist möglicherweise auf ein besseres HDL/LDL Verhältnis bei diesen Tieren zurückzuführen, allerdings könnte auch der Mangel an RAGE Rezeptoren zur Reduktion von Entzündungsreaktionen geführt haben.

Yakobus, Yuliana: Untersuchung zum Einfluss des Rezeptors für Advanced Glycation End-products (RAGE) auf die Entstehung der Aortenklappenstenose bei Mäusen unter einer Hochfetterernährung. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 57 Seiten, 2014

Inhaltsverzeichnis

REFERAT	I
INHALTSVERZEICHNIS.....	II
ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE	IV
1. EINLEITUNG.....	1
1.1. ADVANCED GLYCATION ENDPRODUCTS (AGEs)	1
1.2. DIE WIRKUNGEN VON AGEs	2
1.3. DIE PATHOPHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG DER AGEs	3
1.4. RAGE - DER REZEPTOR FÜR ADVANCED GLYCATION ENDPRODUCTS	4
1.5. DIE ÄTIOLOGIE UND PATHOLOGIE DER AORTENKLAPPENSTENOSE	5
1.6. DAS KLINISCHE BILD DER AORTENKLAPPENSTENOSE.....	8
1.7. DIE DIAGNOSTIK DER AORTENKLAPPENSTENOSE	9
1.8. THERAPIE DER AORTENKLAPPENSTENOSE	10
2. ZIELSTELLUNG	13
3. MATERIAL UND METHODEN	14
3.1. CHEMIKALIEN	14
3.2. PUFFER UND LÖSUNGEN.....	15
3.3. GERÄTE UND ZUBEHÖR	16
3.4. TIERE UND ERNÄHRUNG	16
3.6. GEWINNUNG VON SERUM- UND ORGANPROBEN	17
3.7. MORPHOLOGISCHE ANALYSE DER AORTENKLAPPE UND DES HERZENS	18
3.8. HISTOLOGISCHE UND IMMUNOHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN	18
3.9. BESTIMMUNG VON CHOLESTERIN, TRIGLYZERIDEN, HDL UND LDL AUS DEM PLASMA	21
3.10. STATISTISCHE ANALYSEN	21
4. ERGEBNISSE.....	22
4.1. CHARAKTERISIERUNG DER TIERE	22
4.2. ECHOKARDIOGRAPHISCHE ERGEBNISSE	24
4.3. ERGEBNISSE DER MORPHOLOGISCHEN ANALYSEN DER AORTENKLAPPEN UND DER HERZEN... 26	
4.4. ERGEBNISSE DER HISTOLOGISCHEN UND IMMUNOHISTOCHEMISCHEN UNTERSUCHUNGEN	28
4.5. ERGEBNISSE DER BIOCHEMISCHEN ANALYSEN	31
5. DISKUSSION	34
5.1. STUDIENLIMITATIONEN	37
5.2. AUSBLICK.....	37
6. ZUSAMMENFASSUNG	40
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	42

8. THESEN	51
9. ANHANG	52
TABELLARISCHER LEBENSLAUF	VI
SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	VII
ERKLÄRUNG ÜBER FRÜHERE PROMOTIONSVERSUCHE	VII
DANKSAGUNG	VIII

Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
AGE	Advanced Glycation Endproduct
CEL	Carboxyethyllysine
CI	Konfidenzintervall
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CML	Carboxymethyllysine
d.h.	das heißt
et al.	und andere
g	Gramm
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
Hb _{A1c}	Hämoglobin _{A1c}
HDL	High Density Lipoprotein
HFD	Hochfettdiät
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
INR	International Normalized Ratio
IL-6	Interleukin-6
KHK	koronare Herzkrankheit
LDL	Low Density Lipoprotein
LV	linker Ventrikel
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
min	Minuten
MJ/kg	Megajoule/Kilogramm
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mmol	Millimol
mmol/l	Millimol pro Liter
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
ND	Normaldiät
NF-κB	Nuclear Factor 'Kappa-Light-Chain-Enhancer' of activated B-Cells
RAGE	Receptor For Advanced Glycation Endproducts
RAGE KO	RAGE Knockout Mäuse, C57BL/6N RAGE -/-

s	Sekunden
SD	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TGF- β	Transforming-Growth-Factor- β
TNF- α	Tumor-Necrosis-Factor-alpha
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
WT	Wildtypmäuse, C57BL/6N
μm	Mikrometer
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Advanced Glycation Endproducts (AGEs)

Bei den „Advanced Glycation Endproducts“ (AGEs) handelt es sich um Glykierungsendprodukte, die während der so genannten Maillardreaktion gebildet werden. Diese Reaktion wurde zum ersten Mal im Jahre 1912 von dem französischen Biochemiker Louis Maillard beschrieben (Maillard 1912). Nach ihm wurde die nicht-enzymatische Reaktion von Zuckern und Eiweißmolekülen benannt, welche sich in 3 Phasen einteilen lässt. Durch das Erhitzen von Aminosäuren und reduzierenden Kohlehydraten kommt es zu der von Maillard beschriebenen Bräunungsreaktion. Hierbei entsteht beim Beispiel von Lysin als Aminosäure und Glukose als Zucker in der primären Additionsreaktion zu Beginn ein reversibles Intermediärprodukt, die so genannte Schiff'sche Base. Diese entwickelt sich über ein Amadori-Produkt, schließlich zu einem irreversiblen Advanced Glycation Endprodukt (AGE) (John and Lamb 1993; Raj, Choudhury et al. 2000). Im Falle von Hämoglobin und Glukose ist das bekannte Amadoriprodukt Hämoglobin A_{1c}, welches als Marker bei Patienten mit Diabetes Mellitus genommen wird. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften werden AGEs in verschiedene Gruppen eingeteilt, man unterscheidet u.a. zwischen fluoreszierenden wie z.B. Argpyrimidin, nicht-fluoreszierenden wie z.B. Carboxymethyllysin (CML) und quervernetzenden AGEs wie z.B. Pentosidin (Dyer, Blackledge et al. 1991; Reddy, Bichler et al. 1995; Wells-Knecht, Brinkmann et al. 1996). AGEs sind eine heterogene Gruppe von Molekülen, die auch durch die nicht-enzymatische Reaktion von reduzierten Kohlehydraten mit Lipiden und Nukleinsäuren entstehen können (Simm, Navarrete-Santos et al. 2012) (Abb.1). So konnte gezeigt werden, dass bei der Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren CML gebildet werden kann (Fu, Requena et al. 1996). Die Bildung von AGEs kann durch Hyperglykämie (Singh, Barden et al. 2001; Ahmed 2005), oxidativen Stress (Monnier, Sell et al. 1988; Nishikawa, Edelstein et al. 2000) und eine sehr fettreiche Ernährung begünstigt werden. Die Ausscheidung der AGEs erfolgt fast ausschließlich über die Niere, so dass eine Nierendysfunktion zu einer Akkumulation von AGEs beiträgt (Miyata, Wada et al. 1997; Simm, Navarrete-Santos et al. 2012). Während unseres Lebens kommt es zu einer Akkumulation von AGEs, die besonders im Alter, bei Hyperglykämie und verminderter renaler Ausscheidung zum Tragen kommt. Des Weiteren können AGEs exogen durch unsere westliche fett- und zuckerreiche Ernährung und durch das Rauchen aufgenommen werden.

1.2. Die Wirkungen von AGEs

AGEs können im Organismus rezeptorunabhängige und rezeptorabhängige Wirkungen initiieren. Rezeptorunabhängig wirken AGEs z.B. über die Modifikation von Membranproteinen und Enzymen. Sie bewirken hier Strukturänderungen welche zur Funktionsmodifikation bis hin zum Funktionsverlust führen können. Ein Ergebnis von Glykierungsvorgängen kann auch die Bildung von so genannten intermolekularen oder intramolekularen Crosslinks sein. Hier sind vor allem Proteine mit einer langsamen *Turnover-Rate*, wie z.B. Kollagen betroffen. Die intermolekularen Kollagen-Crosslinks können zu einer zunehmenden vaskulären und myokardialen Steifigkeit und einer verminderten Elastizität führen. Dies kann schließlich wie im Beispiel der diastolischen Herzinsuffizienz in einer kardiovaskulären Dysfunktion münden (Cheng, Wang et al. 2007; Goh and Cooper 2008).

Die rezeptorabhängigen Wirkungen von AGEs werden über ihre Bindung an Rezeptorproteine vermittelt. Der am besten untersuchte Rezeptor ist der so genannte Rezeptor für Advanced Glycation Endproducts (RAGE). Allerdings sind AGEs auch in der Lage, an andere Proteine wie z.B. Galektin-3 (AGE-Rezeptor 3) oder CD36 zu binden (Casselmann, Reimann et al. 2004).

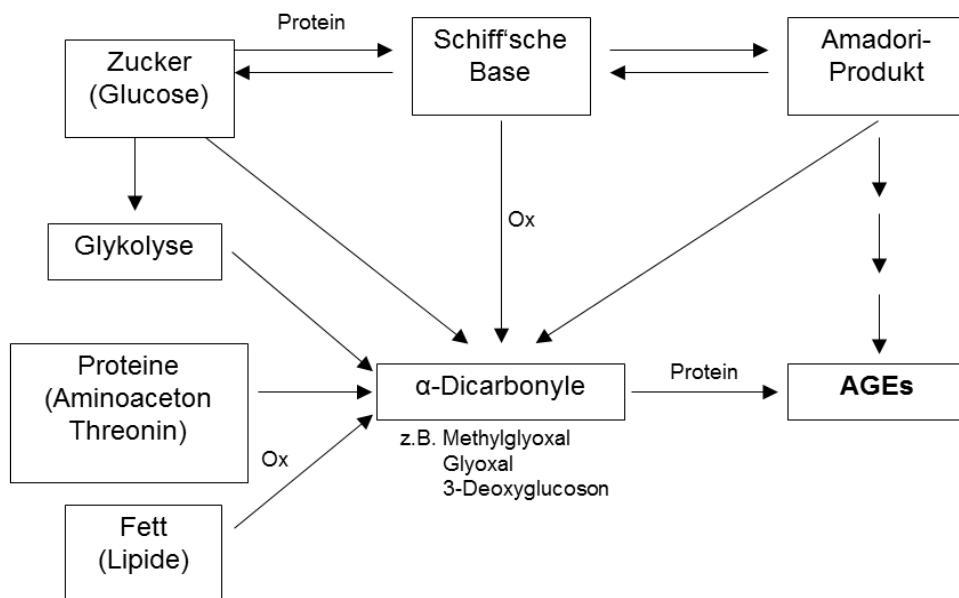


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Bildung von AGEs, adaptiert nach J. Uribarri und K. R. Tuttle (Uribarri and Tuttle 2006)

1.3. Die pathophysiologische Bedeutung der AGEs

Advanced Glycation Endproducts werden mit der Entstehung von zahlreichen alters- und diabetesassoziierten Erkrankungen wie Katarakt, Nephropathie, Neuropathie, Arthritis, Arteriosklerose und Morbus Alzheimer in Verbindung gebracht. Die AGE-Modifizierung von Crystallin, dem dominanten Protein in der Linse, führt zur Bildung von gelb-braunen Pigmenten, die die Transparenz der Linse bis hin zur Blindheit (Katarakt) verändern können (Ulrich and Cerami 2001). Immunohistologische Studien konnten zeigen, dass AGEs in Amyloid Plaques bei der Alzheimererkrankung abgelagert werden (Smith, Monnier et al. 1995; Dukic-Stefanovic, Schinzel et al. 2001). Da die Niere eine wichtige Rolle bei der Eliminierung von AGEs einnimmt, zeigten Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion erhöhte Plasma AGE Werte. AGEs spielen auch eine Rolle bei der Entstehung der Arthritis. Patienten mit rheumatischer Arthritis haben ebenfalls erhöhte Plasma AGE Werte (Takahashi, Suzuki et al. 1997). Dass dies eine pathophysiologische Bedeutung haben kann, zeigen Versuche mit sRAGE, dem löslichen extrazellulären Teil des RAGE Rezeptors, der als kompetitiver Inhibitor für RAGE wirken soll. So führte eine Behandlung mit sRAGE im Mausmodell zu einer Senkung der Inflammation bei rheumatischer Arthritis (Pullerits, Bokarewa et al. 2005). Besonders im Herz-Kreislaufsystem hat die Akkumulation von AGEs einen großen Einfluss. AGEs schädigen das kardiovaskuläre System durch die Bildung von Crosslinks zwischen Kollagenen oder durch die Modifizierung von zirkulierenden Proteinen wie LDL sowie durch die RAGE-vermittelte ROS-Produktion (Zieman and Kass 2004; Zieman, Melenovsky et al. 2005; Hofmann, Adam et al. 2013). In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass die strukturellen Veränderungen durch die Glykierungsendprodukte zu einer Versteifung von Gefäßen und des Myokards führen (Lakatta 2002). Die Modifizierung von LDL und VLDL unterstützt die Bildung von frühen arteriosklerotischen Läsionen. Modifiziertes LDL kann von LDL-Rezeptoren nicht mehr erkannt werden, es wird stattdessen von Makrophagen aufgenommen und trägt somit zur Bildung von Schaumzellen in der arteriellen Intima als frühe Läsion der Arteriosklerose bei (Hoff, Whitaker et al. 1992; Sobal, Sinzinger et al. 1999). AGE-Ablagerungen wurden auch in arteriosklerotischen Plaques nachgewiesen (Sakata, Meng et al. 1995). In einem Kaninchenmodell führte die Gabe von exogenen AGEs zu einer Induktion von arteriosklerotischen Veränderungen der Gefäßwand (Vlassara, Fuh et al. 1995).

1.4. RAGE - der Rezeptor für Advanced Glycation Endproducts

Der Rezeptor für Advanced Glycation Endproducts, RAGE-Rezeptor, ist ein Mitglied der Immunglobulin Superfamilie von Zelloberflächenmolekülen. Er wurde ursprünglich im Lungengewebe von Rindern als ein AGE-Bindungsprotein identifiziert (Yonekura, Yamamoto et al. 2005). Heute ist bekannt, dass es sich bei RAGE um einen Multiliganden-Rezeptor handelt. Weitere mögliche Liganden neben AGEs sind z.B. S100/Calgranuline und Amphoterin (HMGB1) (Bierhaus, Humpert et al. 2005; Yonekura, Yamamoto et al. 2005). Der RAGE Rezeptor ist auf Chromosom 6 nahe dem HLA Locus lokalisiert. Neben RAGE sind weitere Isoformen, wie die lösliche Isoform, soluble RAGE (sRAGE), welche lediglich aus der extrazellulären Domäne besteht, bekannt. Gebildet wird sRAGE über alternatives Splicing des RAGE-Gens oder durch Abspaltung der membrangebundenen RAGE-Domäne (Yonekura, Yamamoto et al. 2003). Auch sRAGE ist in der Lage AGEs zu binden und konkurriert somit mit RAGE um den Bindungspartner. Deshalb wird sRAGE eine Rolle als kompetitiver Inhibitor der Liganden-RAGE-Interaktion zugeschrieben und damit die Hemmung der RAGE vermittelten Signalwege. Bucciarelli et al. konnten durch die Verabreichung von sRAGE in diabetischen Apo-E-Mäusen eine Verminderung von arteriosklerotischen Veränderungen beobachten (Bucciarelli, Wendt et al. 2002). Abbildung 2 zeigt die bisher bekannten über RAGE vermittelten Signaltransduktionswege (Ott, Jacobs et al. 2014). Die Bindung von AGEs an RAGE führt auf zellulärer Ebene einerseits zu einer Aktivierung des pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- κ B und andererseits zur Expression seiner Zielgene, wie IL-6 und TNF- α (Bierhaus, Schiekofer et al. 2001). Außerdem kommt es durch die AGE-RAGE-Interaktion zu einer vermehrten Bildung von ROS (Yan, Schmidt et al. 1994), vermutlich über die Aktivierung der NADPH Oxidase (Wautier, Chappey et al. 2001). Des Weiteren wurde die Aktivierung zahlreicher Signaltransduktionswege nach der Bindung von AGEs an RAGE gezeigt (Huang, Guh et al. 2001; Yeh, Sturgis et al. 2001; Li, Wang et al. 2004). Die meisten dieser Signalwege führen wiederum zur Aktivierung von NF- κ B. Neben der gesteigerten ROS Produktion führt eine Bindung von AGEs an RAGE auch zu verminderten zellulären Abwehr (Bierhaus, Chevion et al. 1997). Auch scheint der Rezeptor RAGE eine ursächliche Rolle bei der Entstehung von renalen Defekten zu spielen. Es konnte in RAGE defizienten Mäusen eine geringere Ausprägung der diabetischen Nephropathie beobachtet werden, wohingegen die Überexpression von RAGE im diabetischen Mausmodell zu einer verstärkten renalen Schädigung führte (Yamamoto, Kato et al. 2001; Yamamoto, Doi et al. 2005; Myint, Yamamoto et al. 2006).

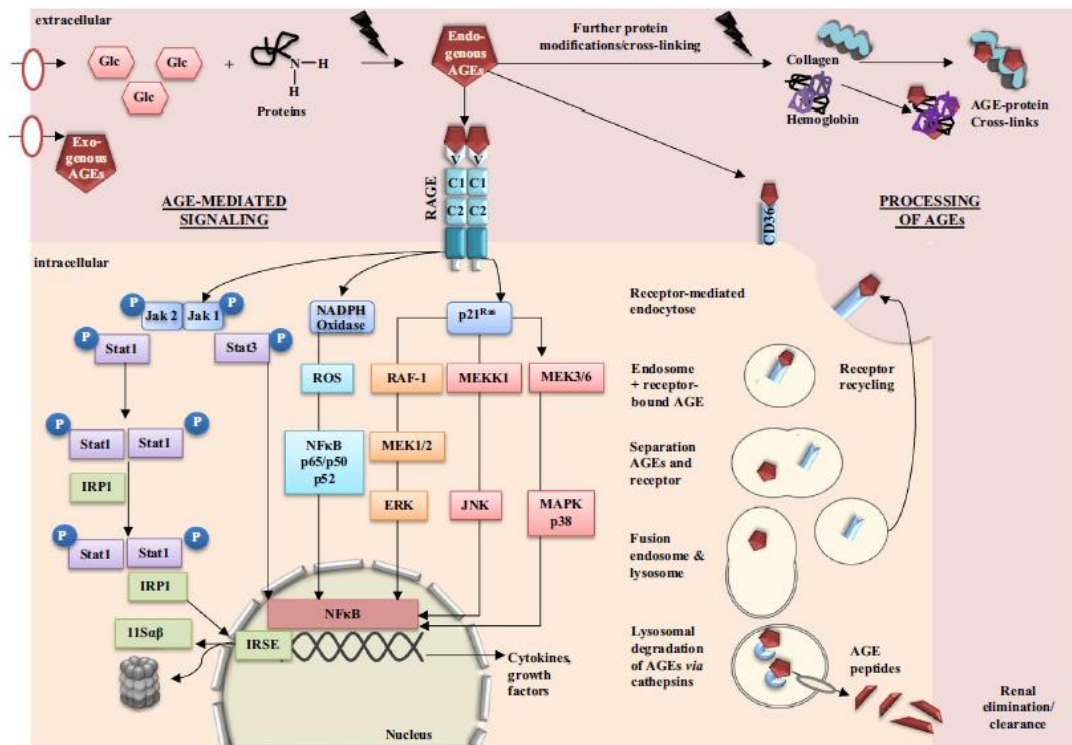


Abbildung 2: RAGE Signaltransduktion, entnommen aus Ott et al. (Ott, Jacobs et al. 2014)

Des Weiteren scheinen AGEs durch die Bindung an RAGE über die Expression von VEGF und die Aktivierung inflammatorischer Zellen zur Entstehung einer Glomerulosklerose beizutragen (Wendt, Tanji et al. 2003). Bei erhöhten AGE Spiegel, wie sie im Alter, bei Diabetes und Niereninsuffizienz zu verzeichnen sind, ist auch die Expression von RAGE hochreguliert. Die Aktivierung von RAGE beeinflusst die myokardiale Calcium Homeostase, trägt zur interstitiellen Fibrose bei, erhöht den oxidativen Stress und verstärkt proinflammatorische Prozesse (Constien, Forde et al. 2001; Tikellis, Thomas et al. 2008). Die Hemmung der AGE-RAGE Interaktion in Tiermodellen führte zu einer Stabilisierung der Arteriosklerose und zu einer Prävention von kardialen Schädigungen hervorgerufen durch eine Fastfood Ernährung (Drolet, Roussel et al. 2006; Tikellis, Thomas et al. 2008; Brodeur, Bouvet et al. 2014).

1.5. Die Ätiologie und Pathologie der Aortenklappenstenose

Die Aortenklappe ist eine Semilunarklappe. Sie bildet sich beim Menschen gemeinsam mit der Pulmonalklappe in der 5. bis 7. Woche der Embryonalentwicklung. Die Bezeichnung als Semilunarklappe resultiert aus dem Aussehen der einzelnen Klappentaschen. In der Regel ist die Klappe trikuspid, das bedeutet, sie hat 3 Taschen. Man unterscheidet die rechtskoronare, die linkskoronare und die akoronare Tasche.

Die Aortenwand buchtet sich kurz oberhalb der Anheftungsstellen der Klappentaschen zum Sinus aortae valsalvae aus. Hier entspringen oberhalb der Anheftungsstellen der rechtskoronaren und linkskoronaren Tasche jeweils die rechte und linke Koronararterie. Die den Sinus entsprechende von außen sichtbare Erweiterung der Aorta bezeichnet man als Bulbus aortae. An diesen schließt sich die Aorta ascendens an. In der Abbildung 3 sind die vier Herzklappen und die anatomischen Verhältnisse beim Menschen dargestellt.

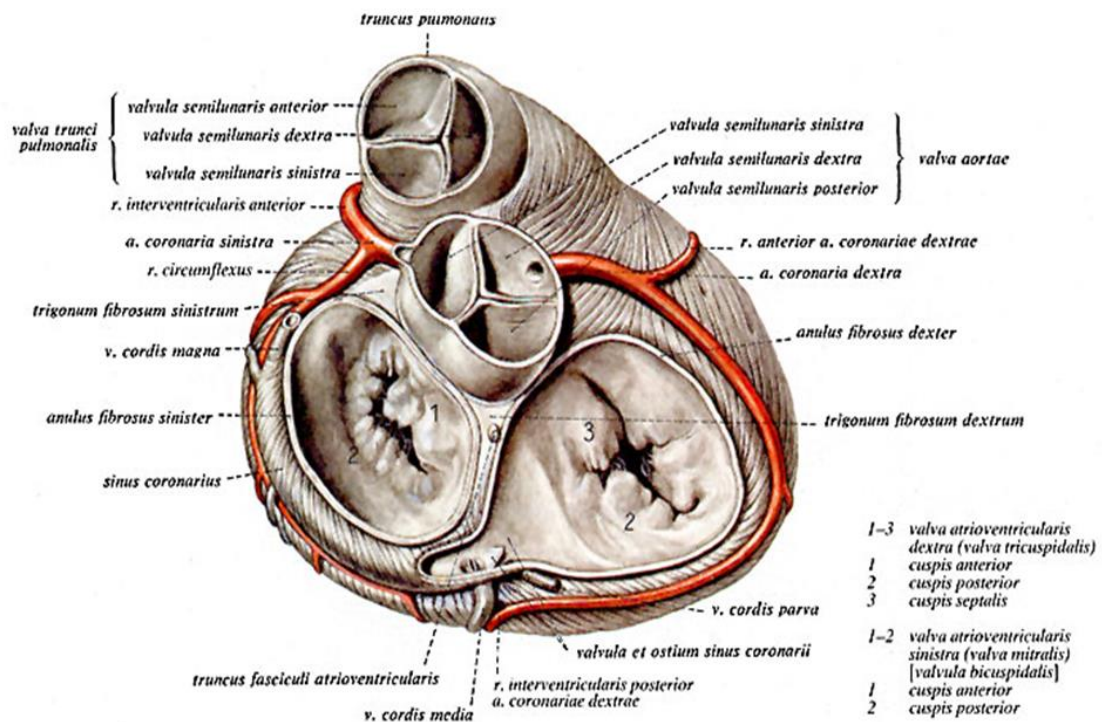


Abbildung 3: Darstellung des Klappenapparates des Herzens in der Ansicht von oben nach Entfernung der Vorhöfe, des Truncus pulmonalis und der Aorta, entnommen aus Sobotta – Atlas der Anatomie des Menschen (Paulsen und Waschke 2010)

Die senile Aortenklappenstenose, oft auch als nicht-rheumatische Aortenklappenstenose oder kalzifizierende Aortenklappenstenose bezeichnet, stellt heute die häufigste Erkrankung der Herzklappen in den industrialisierten Ländern dar. Vor 1950 zählten rheumatische Aortenklappen-Erkrankungen infolge von rheumatischem Fieber durch Streptokokken-infektionen zu den häufigsten Ursachen von Klappenerkrankungen. Mit der Einführung des Penizillins sank die Anzahl dieser Erkrankungen drastisch (Rahimtoola and Frye 2000). Heutzutage ist die kalzifizierende Aortenklappen-Erkrankung die Hauptursache der Aortenklappenstenose. Im Jahr 2011

starben 8.167 Einwohner in Deutschland auf Grund einer kalzifizierenden Aortenklappenstenose in einem durchschnittlichen Alter von 84 Jahren (Bundesamt 2012). Die Häufigkeit der Aortenklappenstenose ist zunehmend, was sich durch das höhere Durchschnittsalter und die gestiegene Lebenserwartung der Bevölkerung erklärt (Christen, Lerch et al. 2000). Außerdem besteht eine enge Korrelation zwischen Aortenklappenstenose und Geschlecht, Nikotinabusus, Hypercholesterinämie, Hypertonus und Diabetes mellitus Typ 2 (Towler 2013). Insbesondere bei Diabetikern kommt es zu einer Verstärkung der linksventrikulären Dysfunktion und Progression der Aortenklappenstenose auf Grund der vermehrten intramyokardialen Ablagerung von AGEs und der daraus resultierenden Veränderungen der myokardialen Funktion sowie Zunahme der Gewebssteifigkeit (Falcao-Pires, Hamdani et al. 2011).

Seit der Beschreibung der Histologie der Aortenklappensklerose durch die Gruppe von Otto 1994 wird immer offensichtlicher, dass bei der Aortenklappenstenose nicht nur von einem rein zeitabhängigen degenerativen Prozess auszugehen ist, sondern es sich vielmehr um einen "aktiven" Vorgang mit analogen Veränderungen wie bei der Arteriosklerose handelt (Otto, Kuusisto et al. 1994) (Abb. 4). Es kommt zur Ablagerung von Lipoproteinen, einer chronischen Inflammation und einer aktiven Taschenklappenkalzifikation (Freeman, Crittenden et al. 2004). Die inflammatorischen Komponenten, die sich in einer sklerosierten Taschenklappe finden, sind denen atheromatöser Plaques sehr ähnlich (Freeman, Crittenden et al. 2004). Auch zirkulierende AGEs wie CML scheinen ein Kalzifizieren der Gefäße und damit eventuell auch der Herzklappen zu induzieren (Wang, Jiang et al. 2012). Pathophysiologisch führt eine Aortenklappenstenose zu einer Behinderung des Blutauswurfs aus dem linken Ventrikel. Durch die Entstehung eines systolischen Druckgradienten zwischen linkem Ventrikel und der Aorta jenseits der Aortenklappe wird die Stenose zunächst funktionell ausgeglichen und die Blutversorgung des Körpers aufrechterhalten. Diese langjährige Druckbelastung führt zur konzentrischen links-ventrikulären Hypertrophie (Dweck, Boon et al. 2012). Bedingt durch eine hohe Wandspannung im linken Ventrikel, einen relativen Arteriolen- und Kapillarmangel bei ausgeprägter Hypertrophie und durch die Abnahme der Koronarperfusion bei einem erhöhten linksventrikulären Füllungsdruck gelangen zu wenig Sauerstoff und Nährstoffe zu den Myozyten (Carabello 2013). Durch die Hypertrophie des Herzmuskels und die Zunahme der Wandspannung, sowie parakrine und endokrine Auswirkungen des Endothelin- und Angiotensinsystems kommt es lokal zu einer vermehrten Ablagerung von Kollagen im Bindegewebe des Herzmuskels (Freeman and Otto 2005).

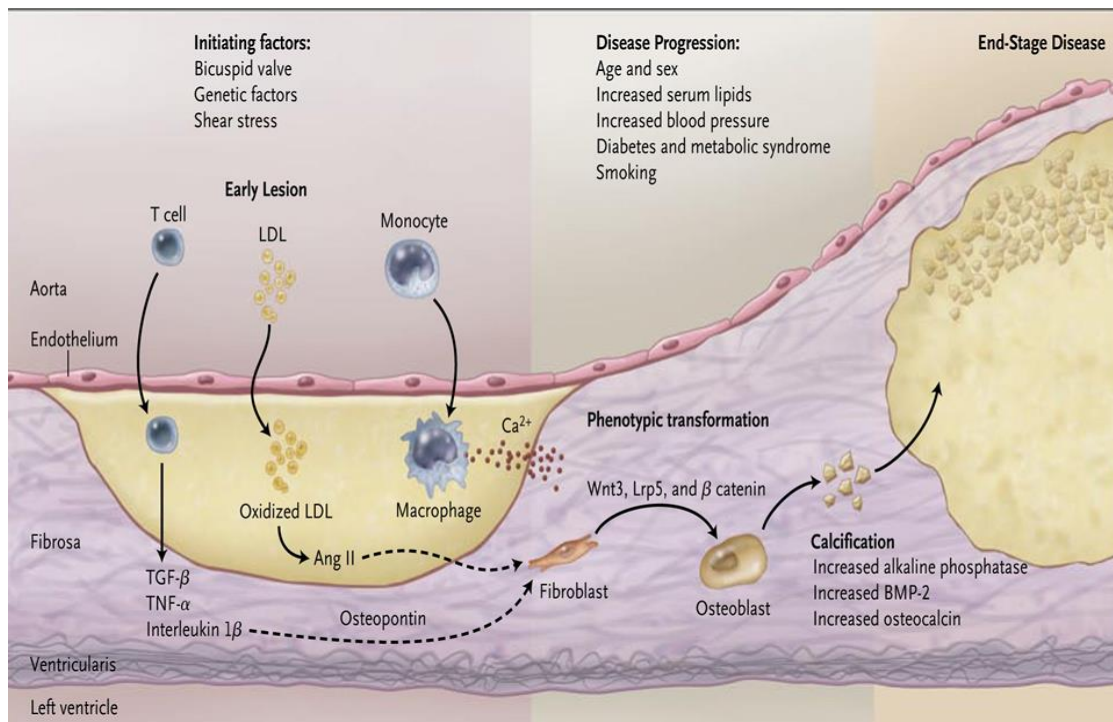


Abbildung 4: Darstellung der pathophysiologischen Prozesse in Aortenklappen-Taschen nach Otto et al. (Otto 2008)

Die Dehnbarkeit des Herzmuskels sinkt und eine diastolische Füllungsbehinderung entsteht. Badenhorst et al. zeigten außerdem, dass nicht nur die vermehrte Ablagerung von Kollagen sondern auch die veränderte Qualität des Kollagens, z.B. durch Quervernetzung (Crosslinking), für die kardiale Gewebsversteifung entscheidend ist (Badenhorst, Maseko et al. 2003).

1.6. Das klinische Bild der Aortenklappenstenose

Eine schwere Aortenklappenstenose kann über lange Zeit symptomlos oder symptomarm verlaufen. Die drei Hauptsymptome der Aortenklappenstenose sind eine Dyspnoe, Synkopen und Angina pectoris (Rahimtoola and Frye 2000; Carabello 2013). Wenn Symptome aufgetreten sind, reduziert sich die verbleibende Lebenserwartung ohne chirurgische Intervention bei Angina auf fünf, bei einer Synkope auf drei und bei Herzinsuffizienz auf zwei Jahre (Christen, Lerch et al. 2000). Eine schwerwiegende Komplikation der Aortenklappenstenose ist der plötzliche Herztod (Freeman, Crittenden et al. 2004). Dyspnoe, oft bei körperlicher Belastung, ist das häufigste Symptom der Aortenklappenstenose. Die Ursache liegt in einer diastolischen und/oder systolischen Dysfunktion des linken Ventrikels. Kommt Vorhofflimmern hinzu, kann das die Symptomatik akut verschlimmern, weil die Vorhofkontraktion wegfällt und die Herzfrequenz erhöht ist. Die Synkope kann im Rahmen der Aortenklappenstenose

verschiedene Ursachen haben. Sie tritt als Ausdruck einer zerebralen Perfusionsminderung oft während oder nach Belastungen auf, da es bei Anstrengung durch eine periphere Vasodilatation zu einem Abfall des arteriellen Blutdrucks kommt (Carabello 2013). Eine weitere Ursache von Synkopen sind Arrhythmien wie z.B. eine ventrikuläre oder seltener eine supraventrikuläre Tachykardie. Eine vorübergehende Bradykardie bei oder unmittelbar nach Anstrengung kann ebenfalls eine Synkope auslösen. Belastungsangina wird bei etwa 60% der Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose beobachtet. Bei den Patienten mit unauffälligen Koronargefäßen wird die Myokardischämie zum einen durch den Anstieg des Sauerstoffbedarfs und zum anderen durch die verminderte Perfusion bedingt (Gould and Carabello 2003). Die verminderte Perfusion ergibt sich infolge der verlängerten Kontraktion und der Relaxationsstörung sowie der aus diesem Grund prolongierten Kompression der intramyokardialen Arterien. Überdies ist die Kapazitätsreserve der Koronararterien im hypertrophen Myokard reduziert (Gould and Carabello 2003).

1.7. Die Diagnostik der Aortenklappenstenose

Bei der klinischen Untersuchung hängen die Qualität des arteriellen Pulses, die Intensität der Aortenanteils des zweiten Herztons und der zeitliche Zusammenhang des Systolikums vom Schweregrad der Aortenklappenstenose ab. Der arterielle Puls zeigt typischerweise eine geringe Amplitude mit langsamem Anstieg (Pulsus parvus et tardus) (Christen, Lerch et al. 2000). Bei älteren Patienten wird der Aortenanteil des zweiten Herztons leiser und kann bei schwerer Aortenklappenstenose manchmal gar nicht mehr wahrgenommen werden. Das Systolikum der Aortenklappenstenose ist meist im 2. Interkostalraum rechts parasternal am besten zu hören und leitet in Richtung der Karotiden fort. Im Elektrokardiogramm zeigt sich typischerweise bei etwa 85% der Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose eine linksventrikuläre Hypertrophie, oft kombiniert mit ST-Senkung und negativer T-Welle in den linkspräkordialen Ableitungen. Manchmal lassen sich Hinweise auf eine Hypertrophie des linken Vorhofs finden (Christen, Lerch et al. 2000). Auf dem Röntgenbild des Thorax stellt sich eine Erweiterung des linken Ventrikels dar und ggf. Kalzifikationen im Bereich der Aortenklappe sowie poststenotische Dilatation/ Elongation des Aorta ascendens (Szamosi and Wassberg 1983). Die echokardiographische Untersuchung ist der Goldstandard zur Diagnosefindung. Hier lassen sich der Druckgradient, die Flussgeschwindigkeit und die Klappenöffnungsfläche der Aortenklappe bestimmen (Miller, Weiss et al. 2011). Die Erfassung der Aortenwurzeldimension, des Kalzifizierungsgrades der Aortenklappe und der Restmobilität der Taschen ist ebenfalls möglich (Lee, Zhao et al. 2005). Häodynamische Messungen mittels Herzkatheter

haben in den letzten Jahrzehnten auf Grund der Weiterentwicklung der Echokardiographie an Bedeutung verloren. Trotzdem besteht nach wie vor in Fällen, in denen Zweifel an der Messung des Druckgradienten mittels Echokardiographie bestehen, die Indikation für eine simultane Messung mittels Herzkatheter (Freeman, Crittenden et al. 2004).

1.8. Therapie der Aortenklappenstenose

Patienten mit einer hochgradigen Aortenklappenstenose haben eine sehr schlechte Prognose, wenn sie nicht chirurgisch durch einen Aortenklappenersatz behandelt werden (Roberts, Vowels et al. 2013). Die chirurgische Therapie stellt nach wie vor den Goldstandard der Behandlung der hochgradigen Aortenklappenstenose dar (Vahanian, Alfieri et al. 2013). Für diese Therapie zeigen die europäischen Behandlungsdaten eine perioperative Mortalität von 1 bis 3% bei Patienten unter 70 Jahren. Bei älteren Patienten beträgt die perioperative Mortalität 4 bis 8% (Walther, Blumenstein et al. 2012; Vahanian, Alfieri et al. 2013). Als Aortenklappenersatz kommen bei älteren Patienten über 60 Jahre sowie bei Patienten mit schlechter Compliance zumeist biologische Prothesen aus Schweine- oder Rinderperikard in Frage. Diese biologischen Prothesen haben eine begrenzte Funktionsfähigkeit von etwa 15 Jahren (Minakata, Tanaka et al. 2014), hiernach kommt es durch Verkalkungen der Prothese wiederum zur Entwicklung einer Aortenklappenstenose. Für biologische Prothesen ist keine lebenslange Antikoagulation mit einem Vitamin K Antagonisten notwendig. Mechanische Prothesen stehen für einen Aortenklappenersatz bei Patienten unter 60 Jahren zur Verfügung. Die mechanischen Prothesen halten lebenslang, allerdings ist auch eine lebenslange Therapie mit einem Vitamin K Antagonisten notwendig. Es wird eine Ziel-*International Normalized Ratio* (INR) von 2.5-3.5 angestrebt (Butchart, Gohlke-Barwolf et al. 2005). Patienten mit mechanischen Klappenprothesen sind vor allem durch das erhöhte Blutungs- und Thrombembolierisiko gefährdet (Christen, Lerch et al. 2000). Generell ist bei allen Patienten nach einem Klappenersatz bei folgenden Interventionen eine Endokarditisprophylaxe entsprechend der Richtlinien der Paul-Ehrlicher-Gesellschaft durchzuführen (Thanavaro and Nixon 2014). In den letzten Jahren wurden minimal-invasive Verfahren zur Implantation der Aortenklappe entwickelt, die mittlerweile als Routineverfahren bei Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose, die aufgrund ihres Alters oder ihrer Begleiterkrankungen ein erhöhtes operatives Risiko haben, eingesetzt werden (Rayner, Coffey et al. 2014). Diese Katheter gestützten Aortenklappen Implantation (TAVI, *transcatheter aortic valve implantation*) können über die Leistenarterien, die Aorta ascendens, die Arteria subclavia oder über die Spitze des linken Ventrikels durchgeführt werden. Die am

häufigsten verwendeten TAVI Prothesen sind die Edwards SAPIEN Klappe und die CoreValve (Gotzmann, Czauderna et al. 2014). Es handelt sich hierbei um biologische Prothesen. Bisher gibt es allerdings sehr wenige Daten zu den Langzeitergebnissen nach TAVI. Allerdings konnte gezeigt werden, dass nach 2 Jahren Patienten mit einer TAVI eine geringere Mortalität hatten als Patienten unter konservativer Therapie (43% vs. 68%, $p < 0,001$) (Makkar, Fontana et al. 2012).

Es gibt eine Reihe von Parallelen zwischen arteriosklerotischen Gefäßläsionen und den pathologischen Veränderungen in sklerotischen beziehungsweise stenotischen Aortenklappen-taschen. Beide Erkrankungen zeichnen sich durch Ähnlichkeiten in den pathophysiologischen Prozessen aus. Schon 1994 konnte Otto et al. zeigen, dass die initialen pathologischen Veränderungen bei der Aortenklappenstenose ebenso wie bei der Arteriosklerose, durch eine Kontinuitätsunterbrechung der Basalmembran, starke Lipidablagerung und einen chronischen, T-Zell und Makrophagen vermittelten Immunprozess gekennzeichnet sind (Otto, Kuusisto et al. 1994). Die Akkumulation von Lipoproteinen spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese der kalzifizierenden Aortenklappen Erkrankung. Oxidiertes LDL (Olsson, Thyberg et al. 1999), Lipoprotein, Apolipoprotein B und Apo-lipoprotein E (O'Brien, Reichenbach et al. 1996) wurden in humanen stenotischen Aortenklappen nachgewiesen. Ein räumlicher Zusammenhang zwischen den oxidierten Lipiden und den Immunzellen wurde beschrieben (Olsson, Thyberg et al. 1999). Native Aortenklappen enthalten keine mineralisierten Bestandteile. Bereits im Stadium der Aortenklappensklerose entstehen kalzifizierende Nukleationsherde, die mit Entzündungszellen und Lipoproteinen kolokalisiert sind (Freeman and Otto 2005).

In Aortenklappentaschen eingewanderte Makrophagen setzen Osteopontin frei und es besteht eine Korrelation zwischen dem Grad der Expression von Osteopontin Messenger-RNA und dem Ausmaß der Kalzifizierung (O'Brien, Kuusisto et al. 1995; Mohler, Adam et al. 1997). O'Brien et al. zeigten, dass Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) Makrophagen assoziiert und extrazellulär in sklerotischen sowie stenotischen humanen Aortenklappen vorhanden ist (O'Brien, Shavelle et al. 2002). Der Angiotensin-II-Rezeptor Typ-1 wurde als weiteres Element des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems in stenotischen Aortenklappen nachgewiesen und von Fibroblasten in den pathologischen Läsionen exprimiert (O'Brien 2006). Diese experimentellen Daten führten dazu, dass man sich von der Therapie mit Statinen und ACE-Hemmern positive Effekte bei der medikamentösen Behandlung der Aortenklappen-stenose versprach. Bisher konnten allerdings drei große Studien keinen Effekt der Statin-Therapie auf die Progression der Aortenklappenstenose zeigen (Cowell, Newby et al. 2005; Rossebo, Pedersen et al. 2008; Chan, Teo et al. 2010).

Allerdings war möglicherweise der Erkrankungsprozess für einen medikamentösen Erfolg bereits zu fortgeschritten (Rayner, Coffey et al. 2014). Die Therapie mit ACE-Hemmern reduziert die linksventrikuläre Hypertrophie (Chockalingam, Venkatesan et al. 2004) und hatte einen positiven Effekt in Tiermodellen (Turcani and Rupp 2000), die Daten großer klinischer Studien hierzu stehen noch aus.

2. Zielstellung

Einer senilen Aortenklappenstenose bei älteren Menschen liegt meist eine primär degenerative, kalzifizierende Aortenklappen Erkrankung zugrunde. Bis heute gibt es keine effektive Therapie zur Vermeidung bzw. Verzögerung der Aortenklappen Verkalkung. Die Aortenklappenstenose stellt eine Erkrankung des höheren Lebensalters dar. AGEs als Endprodukte der Maillard Reaktion akkumulieren im Alter und sind als Biomarker des Alterns mit degenerativen Erkrankungen assoziiert. Des Weiteren ist bekannt, dass Advanced Glycation Endprodukte über die Nahrung aufgenommen werden und zu Schädigungen im Organismus beitragen können. Ziel dieser Arbeit war es, die Verbindung zwischen fettreicher Ernährung, AGE-Akkumulation und Aortenklappen Veränderungen darzustellen.

Eine sehr fettreiche Ernährung führt bei Mäusen zu einer starken Gewichtszunahme und Entwicklung von Herzveränderungen und Herzerkrankungen (Drolet, Couet et al. 2008; Matsumoto, Adams et al. 2010; Leuner, Max et al. 2012). Diese Veränderungen kommen unter anderem durch die Aktivierung von RAGE durch AGEs zustande. Daraus ergeben sich folgende Hypothesen dieser Arbeit:

1. Mäuse sollten unter einer fettreichen Ernährung schneller Aortenklappen Veränderungen im Sinne von Aortenklappensklerose und Aortenklappentaschenverkalkung entwickeln.
2. Bei RAGE Knockout Mäusen sollte sich das Fehlen von RAGE kardioprotektiv auswirken und sie trotz fettreicher Ernährung vor der Entwicklung einer Aortenklappenstenose schützen bzw. sollte die Entwicklung einer Aortenklappenstenose verzögert werden.

3. Material und Methoden

3.1. Chemikalien

Die folgenden Chemikalien wurden von mir für die Untersuchungen verwendet.

AgNO₃ (Silbernitrat); AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Al₂(SO₄)₃ (Aluminiumsulfat); AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Citronensäure (wasserfrei); Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH

Entellan; Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland

Eosin G-Lösung; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Essigsäure; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Ethanol, 96%; Sigma-Aldrich® GmbH, Steinheim, Deutschland

H₂O₂ (Wasserstoffperoxid 30%); Universitätsapotheker, Halle

Hämalaunlösung; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

HCl (Chlorwasserstoff); Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Heparin; Rotex Medica, Trittau, Deutschland

Isopropanol; Sigma-Aldrich® GmbH, Steinheim, Deutschland

Kaliumchlorid; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Kernechtrot; Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz

KH₂PO₄ (Kaliumdihydrogenphosphat); Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Ketavet; Pfizer, Berlin, Deutschland

Methanol; Sigma-Aldrich® GmbH, Steinheim, Deutschland

NaCl (Natriumchlorid); AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

C₆H₅Na₃O₇ (Na-Citrat); Fluka Bio Chemika, Steinheim, Deutschland

Na_2HPO_4 (Dinatriumhydrogenphosphat); Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (Natriumthiosulfat); AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Pikrinsäure Lösung 1,3% gesättigt; Sigma-Aldrich® GmbH, Steinheim, Deutschland

Reinstwasser; Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland

Rompun 2%; Bayer, Leverkusen, Deutschland

Siriusrot F3B (Direct Red 80); Sigma-Aldrich® GmbH, Steinheim, Deutschland

Tween®20; Sigma-Aldrich® GmbH, Steinheim, Deutschland

Xylol; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

3.2. Puffer und Lösungen

Die folgenden Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit Reinstwasser aus einer MilliQ® Reinstwasseranlage hergestellt.

Kernechtrotfärbung

0,1 g Kernechtrot
5 g Aluminiumsulfat
ad 100 ml dd H_2O

5% Natriumthiosulfatlösung

5 g Natriumthiosulfat
ad 100 ml dd H_2O

10x PBS, pH 7,4

80 g/l NaCl
2 g/l KCl
14,41 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
2 g/l KH_2PO_4
ad 1 l dd H_2O

Pikro-Siriusrot-Lösung

0,1 g Siriusrot
100 ml gesättigte Pikrinsäurelösung 1,3%

Verdünnte Essigsäure

10 ml Eisessig
ad 22 ml dd H_2O

5%ige Silbernitratlösung

5g AgNO_3
ad 100 ml dd H_2O

3.3. Geräte und Zubehör

Die folgenden Geräte wurden im Rahmen der Arbeit verwendet.

Biofuge fresco; Heraeus Instruments GmbH, Gera, Deutschland

Eppendorf Concentrator 5301; Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland

Feinwaage Sartorius BP210S; Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Feinwaage Sartorius portable; Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Feinwaage Sartorius TE1502S; Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Microprocessor pH-Meter; WTW, Weilheim, Deutschland

Pipetten; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Reinstwasseranlage Milli-Q®; Biocel Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland

Thermomixer comfort; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Vortex-Genie 2; Scientific Industries, Bohemia, USA

3.4. Tiere und Ernährung

Die Versuchstiere waren sechs Wochen alte männliche C57BL/6N Wildtypmäuse (WT, n=14) und sechs Wochen alte männliche C57BL/6N RAGE -/- (RAGE knockout, RAGE-KO) Mäuse (n=14). Die Wildtypmäuse wurden über die Charles River GmbH (Sulzfeld, Deutschland) bezogen, die RAGE-KO Mäuse stammen ursprünglich aus der Zucht von Prof. Bierhaus (Med. Fakultät der Universität Heidelberg, Deutschland) (Constien, Forde et al. 2001; Liliensiek, Weigand et al. 2004). Die Haltung der Tiere erfolgte unter Standardbedingung mit 25°C Lufttemperatur, 60% Luftfeuchte und einem künstlich erzeugten 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus. Für den Versuch wurden die C57BL/6N und RAGE-/-Tiere zufällig in je zwei Gruppen eingeteilt, die jeweils eine Normaldiät (ND; EF R/M control, SSNIFF, Soest, Deutschland) oder eine Hochfettdiät (HFD; EF R/M D12492, SSNIFF, Soest, Deutschland) erhielten (Tab.1). Die Komponenten der Hochfettdiät waren nach Angaben des Herstellers zu 31,5% Schweineschmalz, 3,1% Sojabohnen Öl, 8,5% Saccharose und 15,6% Maltodextrin. Die Komponenten der Normaldiät waren 19,6% Maltodextrin, 10% Dextrose, 30% Maisstärke und 4% Sojabohnen Öl. Über die Versuchsdauer von 32 Wochen waren die

Tiere in Gruppen von zwei bis vier Mäusen pro Käfig untergebracht. Sie hatten freien Zugang zu Wasser und Futter. Zur Kontrolle der Gewichtszunahme wurde einmal pro Woche das Gewicht der Tiere erfasst. Die Tiere wurden entsprechend den lokalen Tierschutzrichtlinien der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg versorgt und untergebracht.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Ernährung

	Energiegehalt (MJ/kg)	Proteine (%)	Kohlenhydrate (%)	Fett (%)
Normaldiät	18	23	66	11
Hochfettdiät	25.2	19	21	60

3.5. Echokardiographische Untersuchung

Die Tiere wurden echokardiographisch zu Beginn des Experiments und nach 2, 4 und 7 Monaten untersucht. Mittels 200 mg/kg Ketamin (Ketavet, Pfizer, Berlin, Deutschland) und 10 mg/kg Xylazin (Rompun 2% Bayer Health Care, Leverkusen, Deutschland) intraperitoneal erfolgte zunächst die Betäubung der Tiere. Die abdominalen Haare wurden mit einem elektrischen Rasierer (Phillips) entfernt um die Dopplerankopplung zu optimieren. Die Untersuchung wurde mit dem Gerät Vivid-i (GE Healthcare, UK) und einer 11,5 MHz Sonde durchgeführt. Gemessen wurde die Flussgeschwindigkeit über der Aortenklappe mit dem Continuous Wave Doppler (CW-Doppler), es erfolgte eine Mittelung von 5 Herzschlägen. Alle echokardiographischen Untersuchungen wurden von mir durchgeführt. Entsprechend der Daten von Drolet et al. und Matsumoto et al. wurde eine systolische transvalvuläre Geschwindigkeit über der Aortenklappe von unter 90 cm/s als für Mäuse normal eingestuft (Drolet, Roussel et al. 2006; Matsumoto, Adams et al. 2010).

3.6. Gewinnung von Serum- und Organproben

Am Ende des Experiments wurden die Tiere erneut mittels Ketamin und Xylazin betäubt, danach erfolgte Tötung durch zervikale Dislokation und anschließende sofortige Öffnung des Brust- und Bauchraumes. Die Blutentnahme erfolgte nach Durchtrennung der Aorta oberhalb des Herzens aus dem Bauchraum in ein Eppendorfgefäß. Nach zwei Stunden bei Raumtemperatur wurde durch Zentrifugation (10min; 12000rpm) aus dem entnommenen Blut Serum gewonnen. Nach der Blutgewinnung wurde das Herz entnommen, zur Spülung wurden 50 µl Heparin in dem

Herz-Apex gespritzt. Die Entnahme des Herzens erfolgte mit einem Teil der Aorta ascendens und der Aortenklappe. Die Präparate wurden in 4% Formaldehyd für 24 fixiert. 24 Stunden vor Einbettung in Paraffin wurde das Herz in 70% Ethanol bei Raumtemperatur gelagert. Die gewonnenen Serumproben wurden bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

3.7. Morphologische Analyse der Aortenklappe und des Herzens

Nach erfolgreicher Einbettung, die in Kooperation mit dem Institut für Anatomie erfolgte, wurden 4 µm dicke Aortenklappe- sowie Ventrikel-Präparate mit Hilfe eines Mikrotoms geschnitten und auf einem Objektträger fixiert. Die Präparate wurden zunächst über Nacht bei 60°C zur Verflüssigung des Paraffins gelagert. Die Entparaffinierung erfolgte mittels absteigender Alkoholreihe (2 mal 2 min in Isopropanol, 2 min in 96% Ethanol, 2 min in 90% Ethanol, 2 min in 80% Ethanol, 2 min in 70% Ethanol und 2 min in 50% Ethanol). Mikrotomschnitte auf denen alle drei Taschen der Aortenklappe zu sehen waren wurden zur generellen morphologischen Beurteilung mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Dazu wurden die Schnitte für 3 min mit Hämalaunlösung nach Mayer gefärbt, kurz mit Aqua dest gespült, für 15 min unter fließendem Leitungswasser gebläut, nochmals für 2 min mit Aqua dest gespült, dann für 3 min mit Eosin G-Lösung inkubiert, kurz mit Leitungswasser gespült, über die aufsteigende Alkoholreihe entwässert (2 min 50% Ethanol, 2 min 70% Ethanol, 2 min 80% Ethanol, 2 min 90% Ethanol, 2 min 96% Ethanol und 2 mal 2 min Isopropanol) in einem Zwischenschritt mit Xylol abgeschlossen und dann mit Entellan eingedeckt. Ein unabhängiger Untersucher, der über die Behandlung nicht informiert war, nahm dann die Messungen mit Hilfe der Imaging Software (Bio zero analyzer, Keyence GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland) vor. Bei Ventrikel-Präparaten wurden die linksventrikuläre Fläche, die linksventrikuläre Wanddicke, die linksventrikuläre Septumdicke und die rechtsventrikuläre Wanddicke gemessen. Bei Aortenklappen Präparaten wurden die Aortenklappen Fläche und die Dicke der Aortenklappen Taschen, entsprechend der Vorgaben von Aikawa et al. (Aikawa, Nahrendorf et al. 2007) und Matsumoto et al. (Matsumoto, Adams et al. 2010), gemessen.

3.8. Histologische und immunohistochemische Färbungen

Kollagen-Färbung

Die Sirius Red Färbung (Colvee and Hurlle 1981) für Kollagen wurde durchgeführt, um fibrotische Veränderungen im Bereich des linken Ventrikels zu untersuchen. Nach der Entparaffinierung wurden die Ventrikel-Präparate dreimal mit Aqua dest gespült. Die

Präparate wurden mit Pikro-Siriusrot-Lösung für 60 Minuten inkubiert. Danach wurden die Präparate mittels verdünnter Essigsäure zweimal gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Entwässerung durch die aufsteigende Alkoholreihe (2 min 50% Ethanol, 2 min 70% Ethanol, 2 min 80% Ethanol, 2 min 90% Ethanol, 2 min 96% Ethanol und 2 mal 2 min Isopropanol). Abschließend wurden die Präparate mittels Xylol abgeschlossen und dann mit Entellan eingedeckt. Bei diesem Verfahren färbt sich Kollagen rot.

Von Kossa Färbung

Die von Kossa Färbung (Otto, Kuusisto et al. 1994) wurde vorgenommen, um die Mineralisation der Klappen zu untersuchen. Solide Kalziumsalze werden durch die von Kossa Färbung dargestellt. Nach der Entparaffinierung wurden die Aortenklappen Präparate dreimal mit Aqua dest gespült. Die Präparate wurden mit 5%iger Silbernitratlösung für 60 min unter ultraviolettem Licht inkubiert. Nacheinander wurden die Präparate für 5 Minuten mit 5%iger Natriumthiosulfat-Lösung und für 5 Minuten mit Kernechtrotfärbung bei Raumtemperatur inkubiert. Nach jedem Färbevorgang wurden die Präparate mit Aqua dest gespült. Im Anschluss erfolgte die Entwässerung durch die Alkoholreihe. Abschließend wurden die Präparate mittels Xylol abgeschlossen und dann mit Entellan eingedeckt. Bei diesem Verfahren färben sich mineralisierte Areale schwarz und die Kerne rot.

Es wurden alle Schnitffärbungen gleichzeitig durchgeführt. Alle Schnitte der unterschiedlichen Experimentgruppen wurden mit derselben Lichtintensität und einer digitalen Imaging Software aufgenommen. Die Analyse der Präparate wurde von 2 unabhängigen und über die Behandlung nicht informierten Untersuchern vorgenommen. Die Färbung wurde nach einem Punktesystem (Pathologie Score) beurteilt, der wie folgt definiert war: 0- keine Färbung, 1- leicht positive Färbung, 2- positive Färbung, 3- stark positive Färbung.

RAGE-Immunohistochemie

Nach der Entparaffinierung wurden die Aortenklappe-Präparate dreimal mit Waschpuffer (1-fach PBS, 0,1% Tween®20) gespült. Zur Demaskierung der Proteine erfolgte das Kochen der Präparate in Citratpuffer (2mM Zitronensäure, 8mM Na-Citrat) für 20 Minuten und anschließendem zweimaligem Waschen. Mittels H₂O₂ (3% in Methanol) wurden endogene Peroxidasen abgeblockt und nach 3-maligem Waschen unspezifische Ladungen mittels Serum blockiert. Nach erfolgreicher Blockierung wurden die Präparate mit 1:10 α-RAGE Antikörper (H-300, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, Kalifornien, USA) als primären Antikörper über Nacht bei 4°C

inkubiert. Am zweiten Tag wurde zunächst überschüssiger primärer Antikörper mittels dreimaligen Waschens in Waschpuffer entfernt. Im Anschluss erfolgte die Behandlung mit 1:25 Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper (AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG, Dianova, Hamburg, Deutschland) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Färbung der Präparate. Dazu wurde ein Diaminobenzidinetetrahydrochlorid-Substrat (DAB, DAKO, Kalifornien, USA) verwendet, welches nach Oxidation durch die Peroxidase des Antikörpers an Stelle des Zielantigens ein braunes Endprodukt bildet. Zum Abstoppen der Reaktion wurde das DAB-Substrat abgegossen und der Objektträger für 5 min unter fließendem Wasser gewässert. Die Kernfärbung im Anschluss wurde mittels Mayer's Hämalaunlösung durchgeführt. Dazu wurde für 20 Sekunden Hämalaunlösung auf die Präparate gegeben und anschließend der Schnitt für 10 Minuten in Leitungswasser gewässert. Abschließend wurden die Präparate mittels Eindeckmedium (Glycergel Mounting Medium, DAKO, Kalifornien, USA) luftdicht abgeschlossen.

AGE-Immunohistochemie

Nach der Entparaffinierung wurden die Aortenklappe-Präparate dreimal mit Waschpuffer (1-fach PBS, 0,1% Tween®20) gespült. Zur Demaskierung der Proteine erfolgte das Kochen der Präparate in Citratpuffer (2mM Zitronensäure, 8mM Na-Citrat) für 20 Minuten und anschließendem zweimaligem Waschen. Mittels H₂O₂ (3% in Methanol) wurden endogene Peroxidasen abgeblockt und nach 3-maligem Waschen unspezifische Ladungen mittels Serum blockiert. Nach erfolgreicher Blockierung wurden die Präparate mit einem selbsthergestellten primären CML-Antikörper in der Konzentration 1:25 (CML antibody raised in rabbits, (Nass, Vogel et al. 2010)) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am zweiten Tag wurde zunächst überschüssiger primärer Antikörper mittels dreimaligen Waschens in Waschpuffer entfernt. Im Anschluss erfolgte die Behandlung mit einem Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper (AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG, Dianova, Hamburg, Deutschland) in der Konzentration 1:10 für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Färbung der Präparate. Dazu wurde ein Diaminobenzidinetetrahydrochlorid-Substrat (DAB, DAKO, Kalifornien, USA) verwendet, welches nach Oxidation durch die Peroxidase des Antikörpers an Stelle des Zielantigens ein braunes Endprodukt bildet. Zum Abstoppen der Reaktion wurde das DAB-Substrat abgegossen und der Objektträger für 5 min unter fließendem Wasser gewässert. Die Kernfärbung im Anschluss wurde mittels Meyer's Hämalaun-Lösung durchgeführt. Dazu wurde für 20 Sekunden Hämalaun-Lösung auf die

Präparate gegeben und anschließend der Schnitt für 10 Minuten in Leitungswasser gewässert. Abschließend wurden die Präparate (Carabello 2013) abgeschlossen.

Es wurden alle Schnittfärbungen gleichzeitig durchgeführt. Die Analyse der Präparate erfolgte mittels Fluoreszenz Mikroskopie (Axiovert microscope equipped with RT Spot Kamera, Zeiss) und wurde von 2 unabhängigen und über die Behandlung nicht informierten Untersuchern vorgenommen. Die Färbung wurde nach einem Punktesystem (Pathologie Score) beurteilt, der wie folgt definiert war: 0- keine Färbung, 1- leicht positive Färbung, 2- positive Färbung, 3- stark positive Färbung.

3.9. Bestimmung von Cholesterin, Triglyzeriden, HDL und LDL aus dem Plasma

Triglyzeride (TG) und Gesamtcholesterin wurden mit einem photometrischen Endpunkt Assay bestimmt (UniCel DxC 800 Analyzer, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland). HDL und LDL Werte wurden mit einem direkten Assay (UniCel DxC 800 Analyzer, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) nach den Vorgaben des Herstellers bestimmt. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

3.10. Statistische Analysen

Kategoriale Variablen wurden als Prozent ausgedrückt. Metrische Variablen wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Die statistische Analyse wurde nach Absprache mit Prof. Dr. Wienke (Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik) mit dem Programm MedCalc[®] 13.02 vorgenommen. Differenzen bezüglich metrischer Variablen zwischen den Gruppen wurden mit dem *t*-Test untersucht, wenn keine Normalverteilung vorlag wurde der Mann-Whitney *U*-Test angewandt. *P*-Werte unter 0.05 wurden für die Hauptfragestellung als confirmatorisch angesehen. Für Nebenfragestellungen wurden *p*-Werte explorativ interpretiert.

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung der Tiere

Die tägliche individuelle Nahrungsaufnahme betrug bei Wildtypmäusen (WT) mit Normaldiät (ND) $3,7 \text{ g} \pm 0,5 \text{ g}$; in WT Tieren unter Hochfett-diät (HFD) $3,09 \text{ g} \pm 0,49 \text{ g}$; in RAGE Knockout Mäusen (RAGE KO) mit ND $3,8 \text{ g} \pm 0,6 \text{ g}$ und in RAGE KO Mäusen mit HFD $3,17 \text{ g} \pm 0,58 \text{ g}$. Entsprechend betrug die tägliche individuelle Energieaufnahme $0,067 \pm 0,009 \text{ MJ}$ in WT Mäusen mit ND, in WT Tieren mit HFD $0,078 \pm 0,012 \text{ MJ}$; in RAGE KO Mäusen mit ND $0,068 \pm 0,01 \text{ MJ}$ und in RAGE KO Tieren mit HFD $0,08 \pm 0,015 \text{ MJ}$. Die RAGE KO und WT Mäuse mit Normaldiät nahmen während des Experiments nicht signifikant an Gewicht zu und waren kleiner als die Tiere der anderen Gruppen (Abb.5).

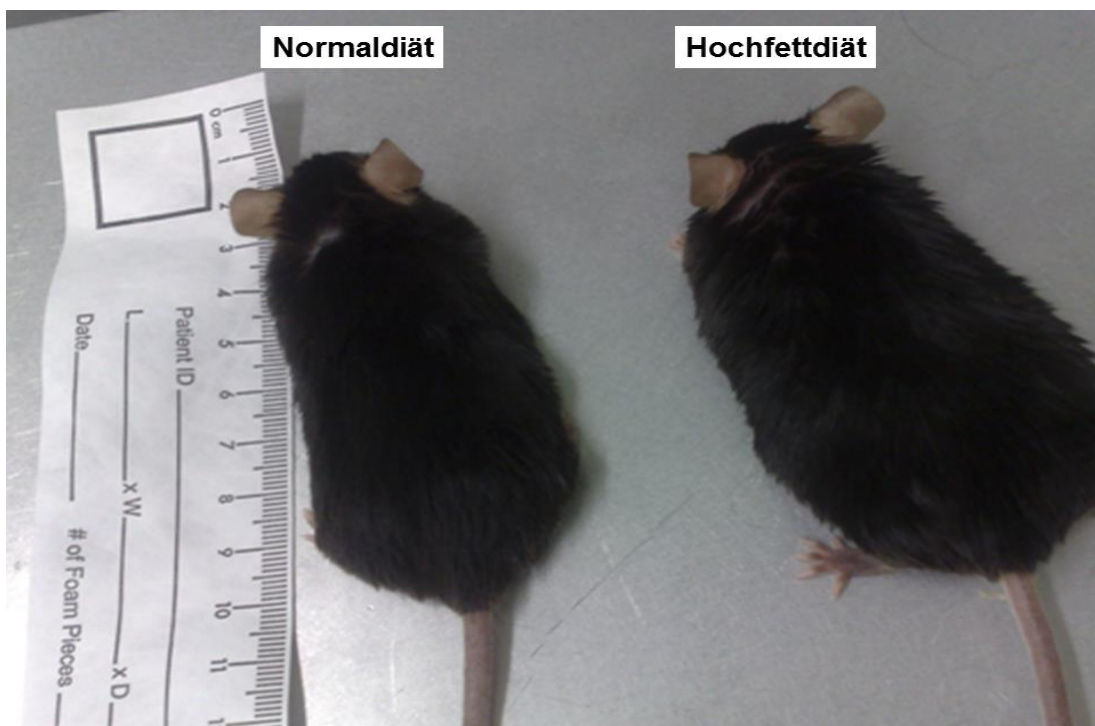


Abbildung 5: Darstellung von jeweils einer Maus mit Normaldiät und Hochfett-diät

Alle Mäuse mit Hochfett-diät, sowohl WT wie auch RAGE KO Tiere, zeigten eine deutliche Gewichtszunahme im Vergleich zu den Gruppen mit Normaldiät (Abb. 6). Das Vorliegen von RAGE führte bei WT Tieren unter Hochfett-diät zu einer forcierten Gewichtszunahme (Abb. 7). Wir konnten keine Unterschiede in der Wasseraufnahme zwischen den Gruppen feststellen. Die Gewichtszunahme bei WT und RAGE KO

Mäusen unter Normaldiät lag im Bereich der normalen alters- und wachstumsentsprechenden Gewichtszunahme, die wir in anderen Studien observiert haben (Leuner, Max et al. 2012; Al-Robaiy, Weber et al. 2013).

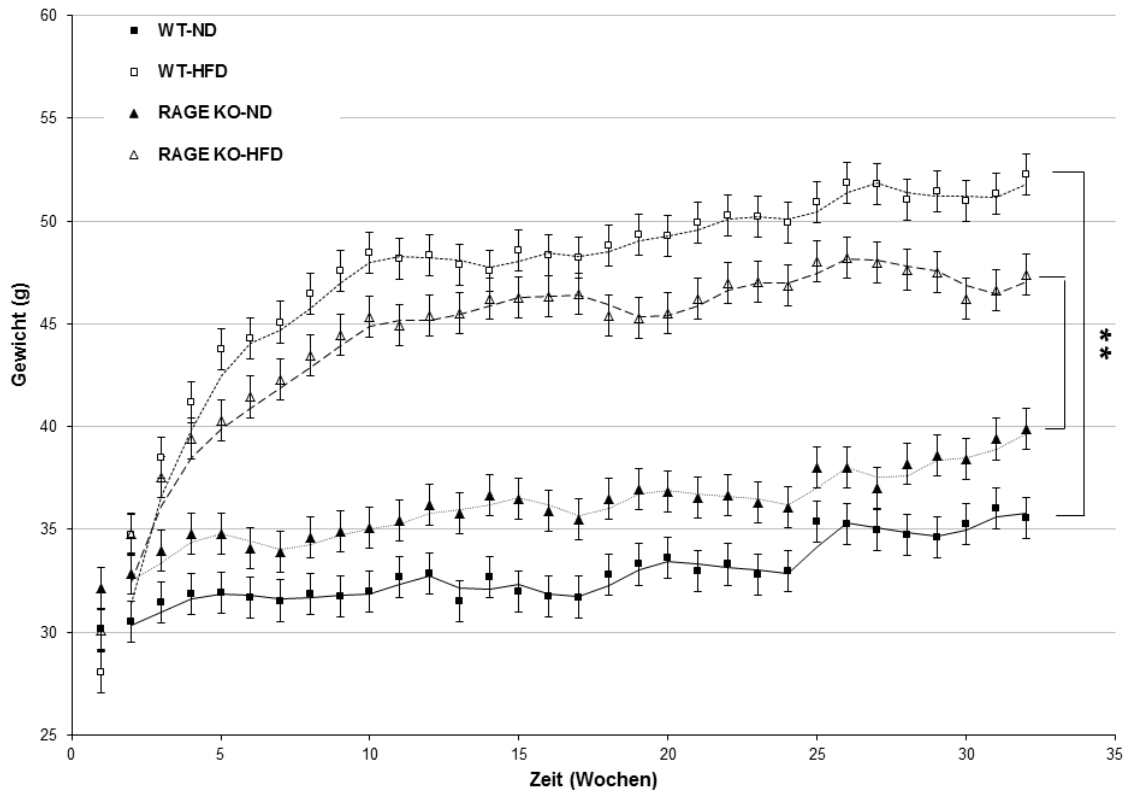


Abbildung 6: Darstellung des Gewichtverlaufes für die einzelnen Gruppen
Das Gewicht ist dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD). WT, Wildtyp C57BL/6 Mäuse; RAGE KO, C57BL/6 RAGE^{-/-} Mäuse; ND, Normaldiät; HFD, Hochfettdiät; ** $p < 0,001$.

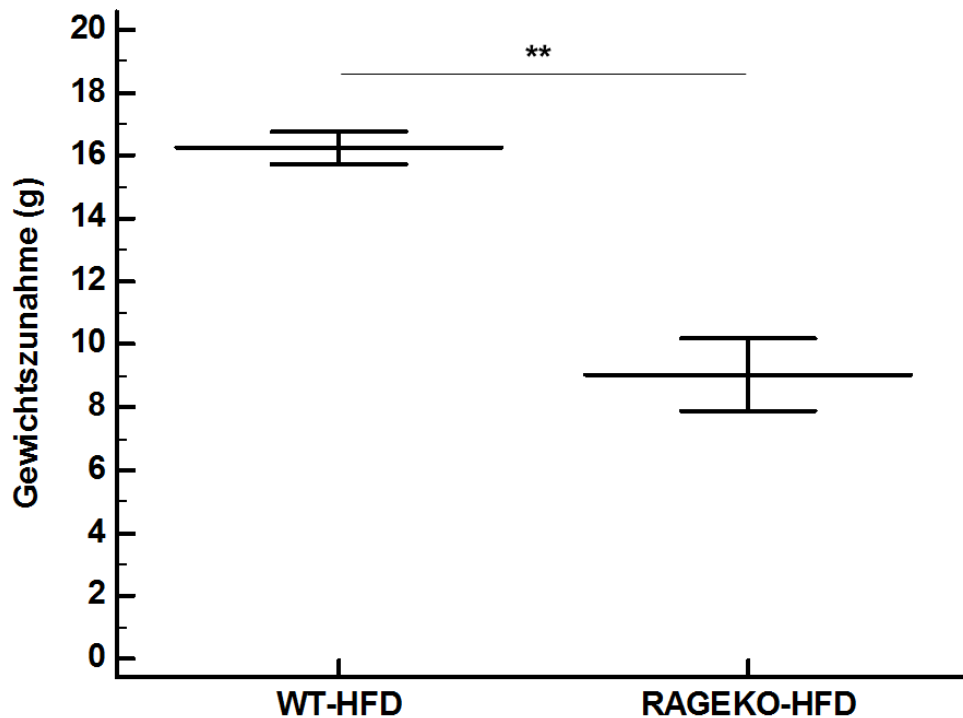


Abbildung 7: Darstellung der Gewichtszunahme für die Tiere mit Hochfetternahrung. Am Ende des Experiments wurde die Gewichtszunahme kalkuliert in dem das Endgewicht der WT Mäuse mit Normaldiät vom Endgewicht der WT Mäuse mit Hochfett-diät bzw. das Endgewicht der RAGE KO Mäuse mit Normaldiät von dem der RAGE KO Mäuse mit Hochfett-diät subtrahiert wurde. Die Werte wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) dargestellt. WT, Wildtyp C57BL/6 Maus; RAGE KO, C57BL/6 RAGE-/- Maus; ND, Normaldiät; HFD, Hochfett-diät; $**p < 0,0001$.

4.2. Echokardiographische Ergebnisse

Die durchgeführten echokardiographischen Untersuchungen zeigten, dass die Wildtypmäuse mit Hochfetternahrung im Verlauf des Experiments deutliche Veränderungen der Aortenklappe zeigten. Die systolische transvalvuläre Geschwindigkeit nahm bei diesen Tieren über den Versuchszeitraum von 7 Monaten zu ($p=0,03$) und war deutlich gegenüber den Wildtypmäusen mit Normaldiät erhöht ($p < 0,0001$) (Abb. 8 und 9). Das Fehlen von RAGE wirkte sich bei den RAGE KO Mäusen mit Hochfett-diät protektiv aus - diese Tiere entwickelten trotz der Hochfetternahrung keine echokardiographischen Zeichen einer Aortenklappenstenose (Abb. 8).

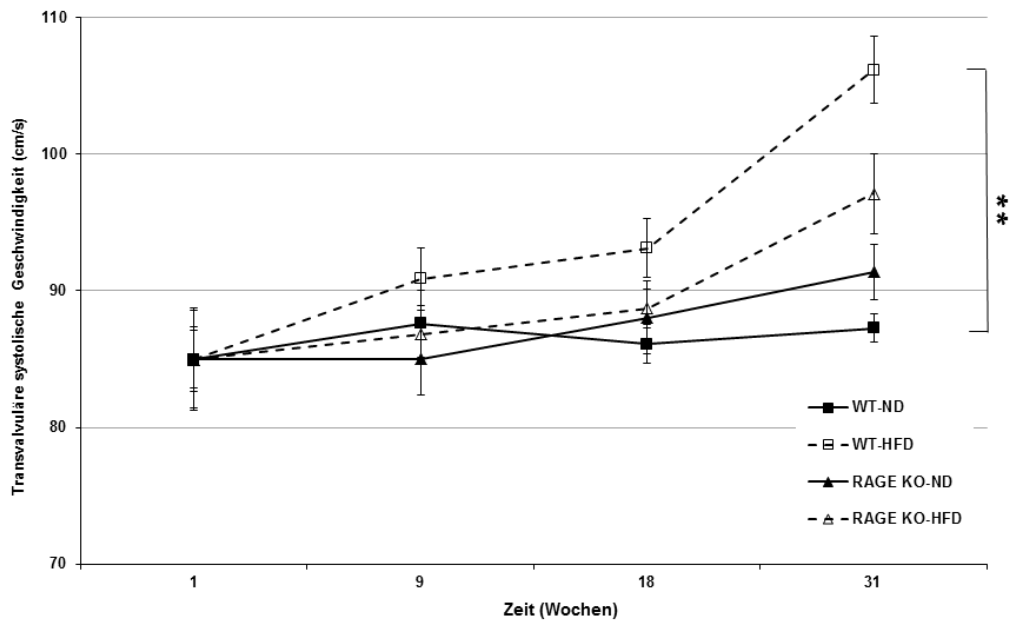


Abbildung 8: Darstellung der transvalvulären systolischen Geschwindigkeit
 Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD). WT, Wildtyp C57BL/6 Mäuse; RAGE KO, C57BL/6 RAGE^{-/-} Mäuse; ND, Normaldiät; HFD, Hochfett-diät; ** $p < 0,0001$.

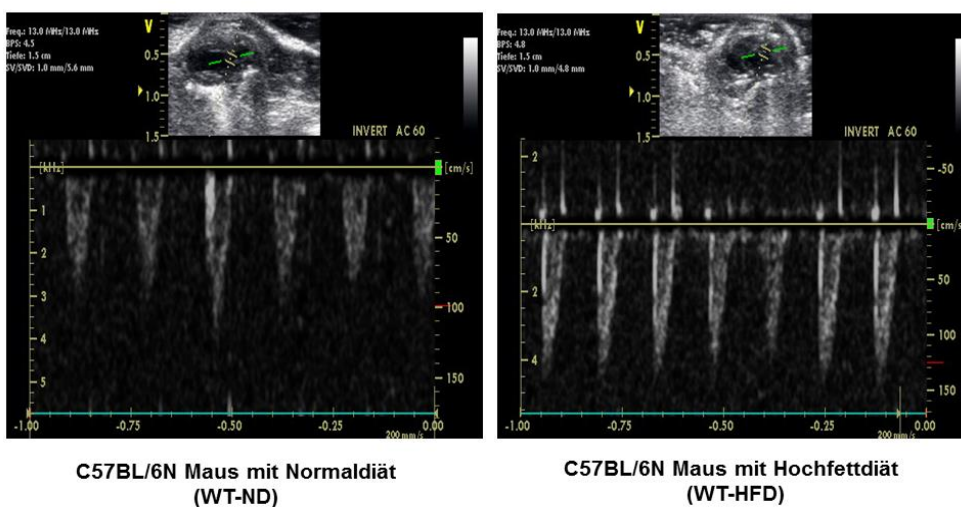


Abbildung 9: Messung der transvalvulären systolischen Geschwindigkeit mit dem CW-Doppler

4.3. Ergebnisse der morphologischen Analysen der Aortenklappen und der Herzen

Die Ergebnisse der Auswertungen der morphologischen Analysen mit Hilfe der Imaging Software sind in Tabelle 2 dargestellt. Bei Ventrikel-Präparaten wurden die linksventrikuläre Fläche, die linksventrikuläre Wanddicke, die linksventrikuläre Septumdicke und die rechtsventrikuläre Wanddicke gemessen (Abb. 10). Bei Aortenklappen Präparaten wurden die Aortenklappenfläche und die Dicke der Aortenklappentaschen gemessen. Nach sieben Monaten Hochfetterernährung zeigte sich bei Wildtypmäusen eine deutliche Zunahme der Wand- und Septumdicke des linken Ventrikels. Auch die Aortenklappentaschen waren bei diesen Tieren im Vergleich mit den anderen Gruppen deutlich verändert (Abb. 11). Die linksventrikuläre Fläche, die Aortenklappen Fläche und der Aortenklappen-Flächen-Index waren bei WT-HFD Tieren im Vergleich mit WT-ND Mäusen deutlich reduziert. Auch bei RAGE-KO Mäusen kam es unter der Hochfetterernährung zu einer Zunahme der Wanddicke des linken Ventrikels und zu einer Zunahme der Taschendicke der Aortenklappe sowie einer Abnahme des Aortenklappen-Flächen-Index. Allerdings waren diese Veränderungen im Vergleich zu den Wildtypmäusen unter Hochfetttdiät weit weniger ausgeprägt (Tab. 2).

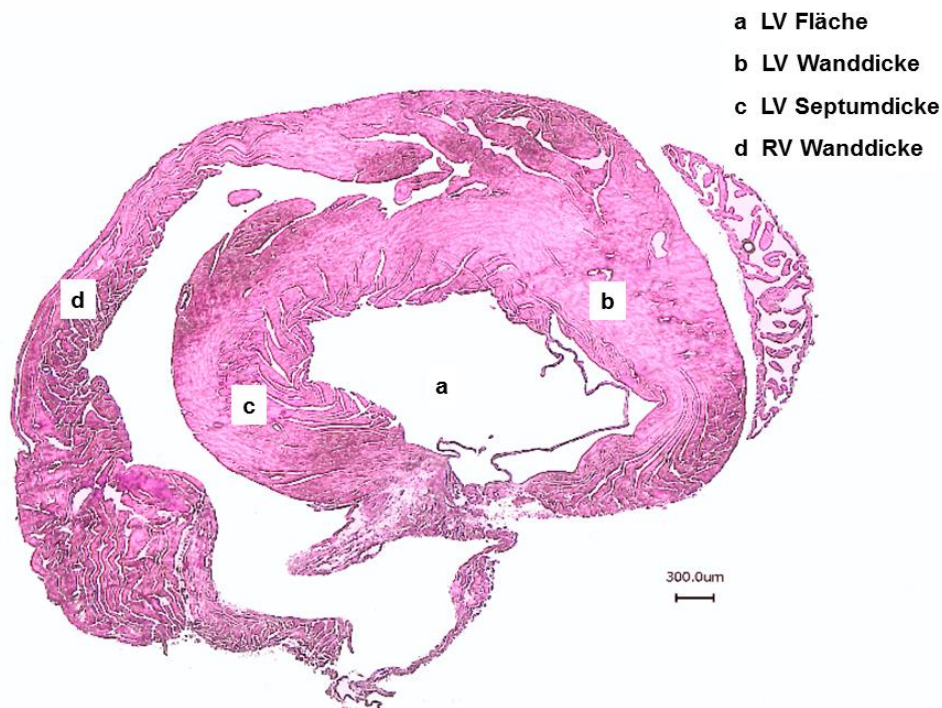


Abbildung 10: Typisches Beispiel für ein Ventrikel-Präparat in Hämatoxylin und Eosin Färbung

Tabelle 2: Ergebnisse der morphologischen Analysen der Aortenklappen und der Herzen

	WT			RAGE KO		
	ND	HFD	p	ND	HFD	p
LV Fläche (mm ²)	2,23 ± 0,25	1,63 ± 0,11	0,0002	2,16 ± 0,39	2,05 ± 0,33	0,5
LV Wanddicke (mm)	1,02 ± 0,05	1,2 ± 0,06	0,0001	1,06 ± 0,11	1,19 ± 0,06	0,03
LV Septumdicke (mm)	0,87 ± 0,05	1,0 ± 0,04	0,0003	0,84 ± 0,06	0,89 ± 0,08	0,2
RV Wanddicke (mm)	0,54 ± 0,04	0,6 ± 0,06	0,05	0,52 ± 0,05	0,54 ± 0,03	0,4
AK Taschendicke (µm)	24,2 ± 1,4	35,0 ± 2,9	<0,0001	18,2 ± 1,0	21,1 ± 2,6	0,02
AKF (mm ²)	2,5 ± 0,3	1,6 ± 0,3	0,0002	2,3 ± 0,6	2,5 ± 0,3	0,7
AKFi (mm ² /kg)	71,4 ± 1,4	30,6 ± 1,1	<0,0001	56,09 ± 1,6	54,35 ± 0,8	0,04

Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte ± Standardabweichung (SD). WT, Wildtyp C57BL/6 Mäuse; RAGE KO, C57BL/6 RAGE^{-/-} Mäuse; ND, Normaldiät; HFD, Hochfettdiät; LV, linker Ventrikel; RV, rechter Ventrikel; AK, Aortenklappe; AKF, Aortenklappen Fläche; AKFi, Aortenklappen-Flächen-Index für das Körpergewicht; p, p-Wert.

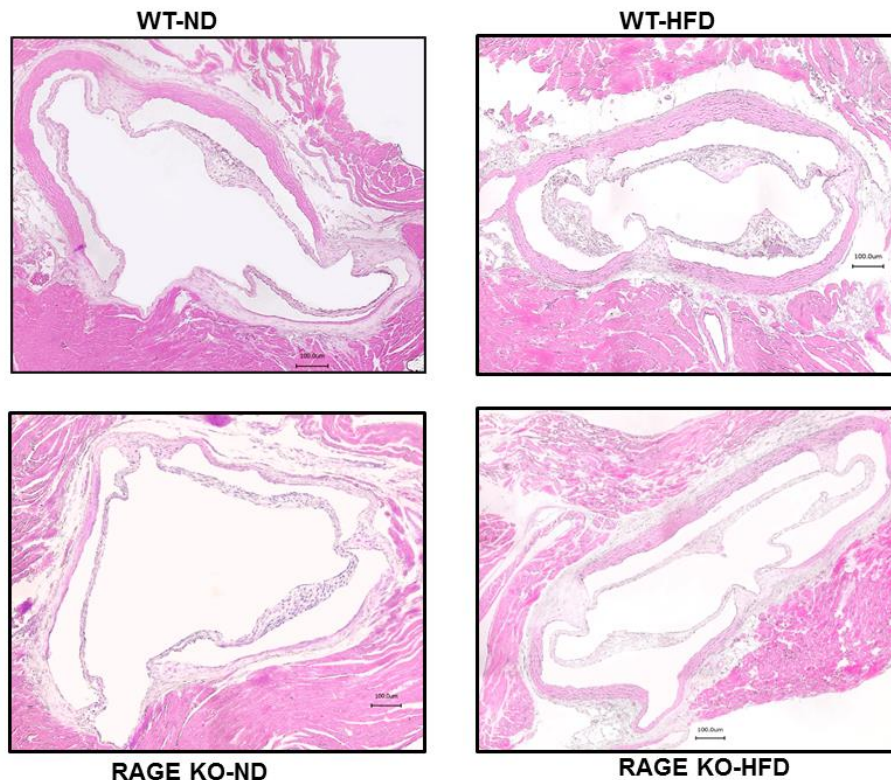


Abbildung 11: Typische Beispiele für Aortenklappen-Präparate in Hämatoxylin und Eosin Färbung

4.4. Ergebnisse der histologischen und immunohistochemischen Untersuchungen

Die Auswertung der Aortenklappen Präparate ergab, dass WT Mäuse unter Hochfetterernährung mehr Kalkeinlagerungen in der Aortenklappe (von Kossa Färbung, $p=0,018$) zeigten. Ebenfalls kam es bei WT-HFD Tieren zu einer vermehrten Akkumulation von AGEs ($p=0,005$) und einer höheren RAGE Expression ($p=0,01$) im Bereich der Aortenklappentaschen (Abb. 12 und 13) im Vergleich zu WT-ND Tieren. Die Aortenklappen Präparate von RAGE KO Mäusen zeigten weniger Kalkeinlagerungen und eine geringere Anreicherung mit AGEs als die der WT-HFD Tiere. Auch die Ventrikel Präparate zeigten in der Kollagenfärbung insbesondere bei Wildtypmäusen unter Hochfetterernährung vermehrte fibrotische Veränderungen.

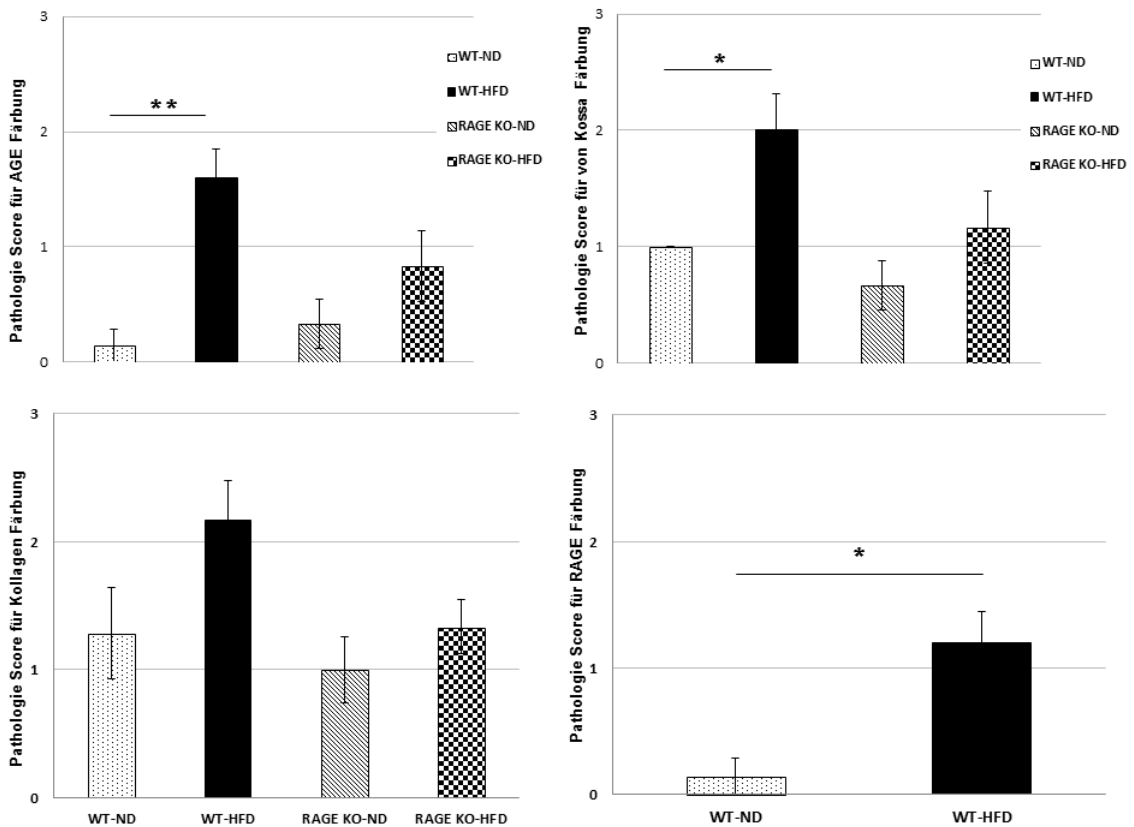
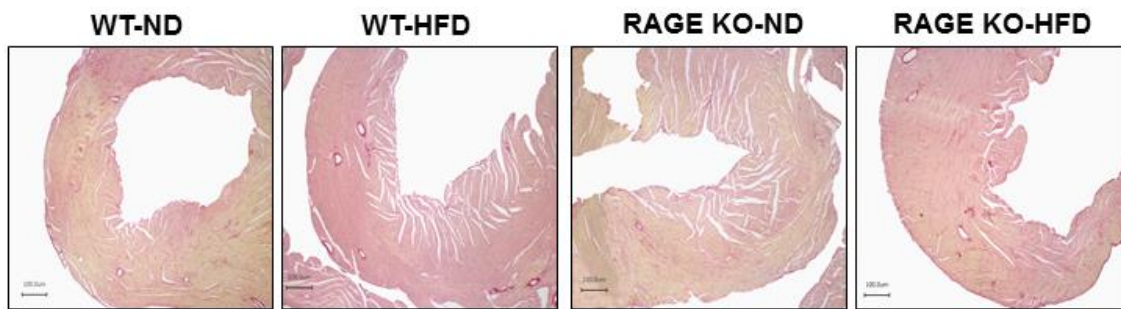
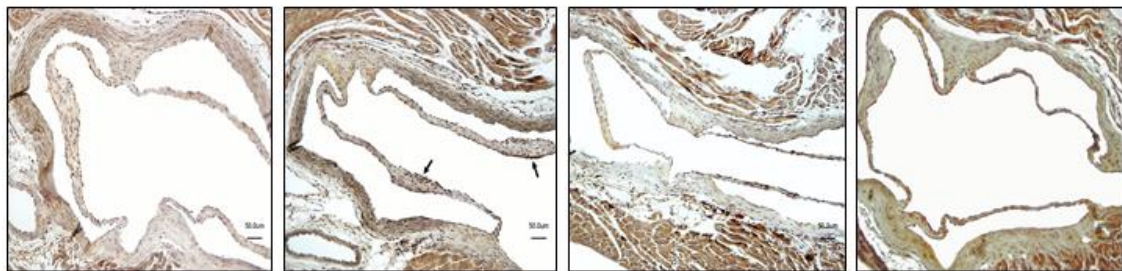


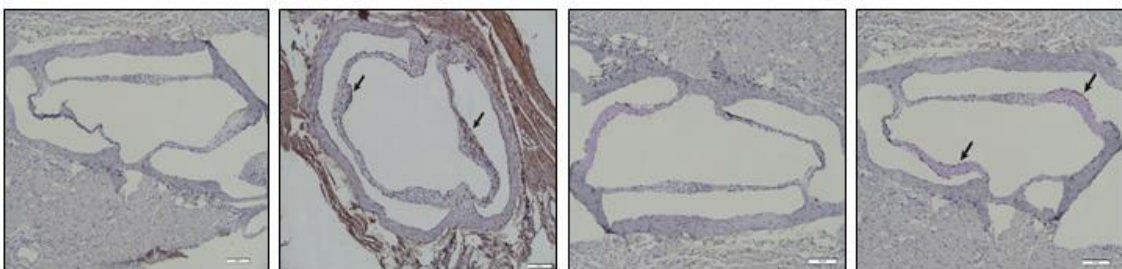
Abbildung 12: Auswertung der histologischen und immunohistochemischen Untersuchungen Die Färbung wurde nach einem Punktesystem (Pathologie Score) beurteilt, der wie folgt definiert war: 0- keine Färbung, 1- leicht positive Färbung, 2- positive Färbung, 3- stark positive Färbung. Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD). WT, Wildtyp C57BL/6 Mäuse; RAGE KO, C57BL/6 RAGE^{-/-} Mäuse; ND, Normaldiät; HFD, Hochfettdiät; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.



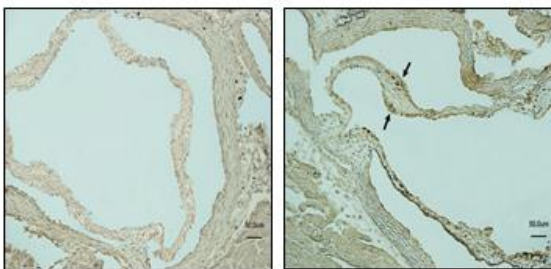
Kollagen Färbung



von Kossa Färbung



AGE Färbung



RAGE Färbung

Abbildung 13: Repräsentative histologische und immunohistochemische Färbungen WT, Wildtyp C57BL/6 Mäuse; RAGE KO, C57BL/6 RAGE^{-/-} Mäuse; ND, Normaldiät; HFD, Hochfettdiät.

4.5. Ergebnisse der biochemischen Analysen

Zur Untersuchung des Einflusses der Hochfettdiät auf den Fettstoffwechsel wurden die Konzentrationen von Gesamtcholesterin (TC), Triglyzeriden (TG), HDL und LDL im Serum der Tiere bestimmt. Die Cholesterin Werte und auch die Triglyzeride waren sowohl bei Wildtyptieren wie auch bei RAGE KO Mäusen mit Hochfetterernährung im Vergleich zu den jeweiligen Gruppen mit Normaldiät deutlich erhöht (Tab. 3, Abb.14). Die LDL-Werte zeigten nur bei Wildtypmäusen mit Hochfettdiät einen deutlichen Anstieg im Vergleich zu den WT-ND Tieren (Tab.3). Tiere mit Hochfetterernährung zeigten generell höhere HDL-Werte. Allerdings hatten RAGE KO Mäuse im Vergleich mit Wildtyptieren insgesamt ein besseres Verhältnis von HDL zu LDL, unabhängig von der Art der Ernährung (ND p=0,003, HFD p=0,008; Abb. 15).

Tabelle 3: Ergebnisse der biochemischen Analysen

	WT			RAGE KO		
	ND	HFD	p	ND	HFD	p
TC (mmol/l)	1,49 ± 0,17	3,5 ± 0,15	<0,0001	1,85 ± 0,29	2,78 ± 0,22	0,0001
TG (mmol/l)	0,69 ± 0,23	1,15 ± 0,31	0,01	0,73 ± 0,34	1,53 ± 0,41	0,005
LDL (mmol/l)	0,20 ± 0,04	0,46 ± 0,06	<0,0001	0,21 ± 0,05	0,27 ± 0,05	0,09
HDL (mmol/l)	1,47 ± 0,24	3,26 ± 0,19	<0,0001	1,93 ± 0,23	2,82 ± 0,25	0,0001
HDL/LDL Verhältnis	6,3 ± 1,21	6,8 ± 0,75	0,4	8,8 ± 0,98	10,2 ± 1,94	0,18

Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte ± Standardabweichung (SD). WT, Wildtyp C57BL/6 Mäuse; RAGE KO, C57BL/6 RAGE-/- Mäuse; ND, Normaldiät; HFD, Hochfettdiät; TC, Gesamtcholesterin; TG, Triglyzeride; HDL, High Density Lipoprotein; LDL, Low Density Lipoprotein; p, p-Wert.

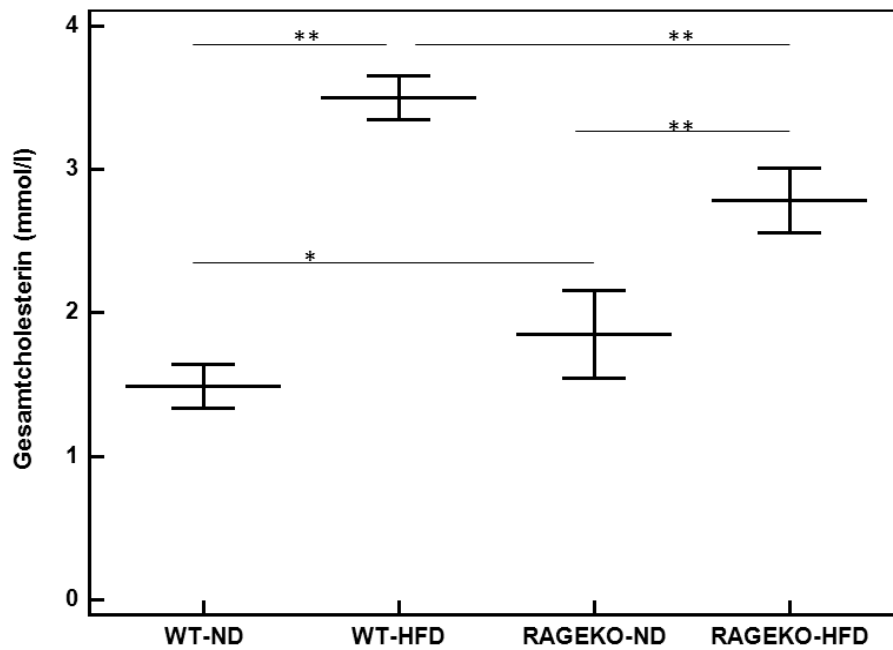


Abbildung 14: Darstellung der Gesamtcholesterin Werte für die einzelnen Gruppen
 Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD). WT, Wildtyp C57BL/6 Mäuse; RAGE KO, C57BL/6 RAGE^{-/-} Mäuse; ND, Normaldiät; HFD, Hochfettdiät; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

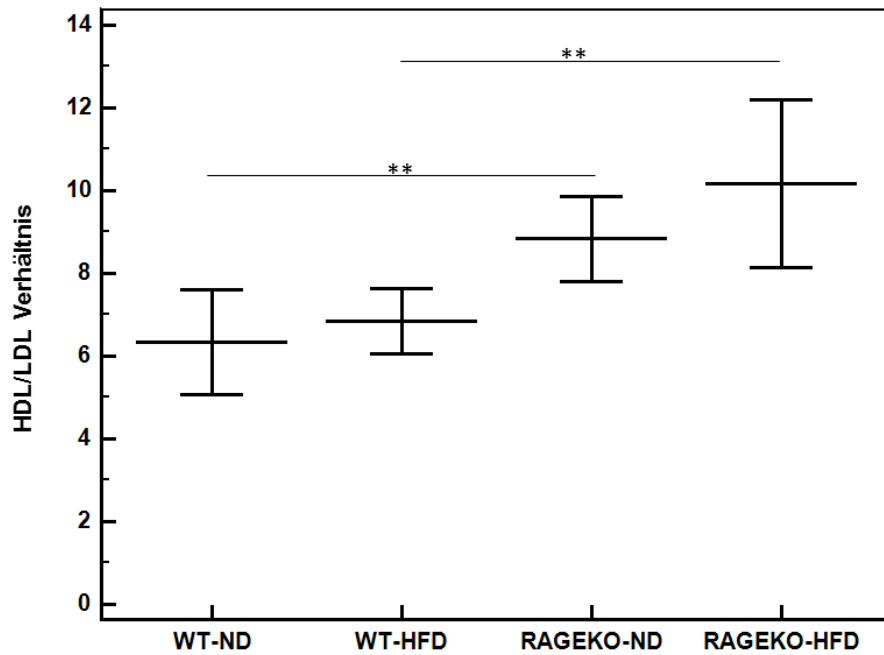


Abbildung 15: Darstellung des HDL/LDL Verhältnis für die einzelnen Gruppen
 Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD). WT, Wildtyp C57BL/6 Mäuse; RAGE KO, C57BL/6 RAGE^{-/-} Mäuse; ND, Normaldiät; HFD, Hochfettdiät; ** $p < 0,01$.

5. Diskussion

Das metabolische Syndrom und seine Folgen stellt eines der wachsenden Probleme in unserer modernen Gesellschaft dar (Wild, Roglic et al. 2004; Nyamdorj, Qiao et al. 2009; Hare, Magliano et al. 2013). Besonders das zunehmende Übergewicht der Bevölkerung und die daraus resultierenden Erkrankungen, wie z.B. Diabetes mellitus und Arteriosklerose, stellen das Gesundheitssystem vor ein schwerwiegendes und kostenintensives Problem. Als ursächlich für die zunehmende Zahl an übergewichtigen Menschen wird der so genannte Western Lifestyle gesehen. Dieser ist durch einen Mangel an Bewegung und eine Ernährung mit einem hohen Anteil an Fetten und Kohlenhydraten gekennzeichnet (Mann 2000; Li, Siriamornpun et al. 2005). Die AGEs gehören zu den so genannten Maillardprodukten und werden über die Nahrung in verhältnismäßig großen Mengen aufgenommen. Bisher ist unklar, welchen Anteil die aufgenommenen im Vergleich zu den endogen gebildeten AGEs an den AGE-assoziierten pathophysiologischen Prozessen haben. Allerdings führt die vermehrte Aufnahme von Fetten, wie bei einer fettreichen Ernährung, auch zu einer erhöhten endogenen AGE-Bildung (Li, Liu et al. 2005). Es wurde bereits gezeigt, dass sich bei Diabetikern und Patienten mit Nierenerkrankungen eine fettreiche Ernährung zusätzlich negativ auswirken kann (Yndestad, Landro et al. 2009; Vlassara and Striker 2013; Cai, Uribarri et al. 2014). Ob allerdings im gesunden Organismus eine Akkumulation von AGEs durch eine Hochfetterernährung im Herz- und Kreislaufsystem induziert wird, dieses dann negativ beeinflusst, und die Entstehung von Erkrankungen wie z.B. der Aortenklappenstenose forcieren kann, wurde bisher kaum untersucht. Ziel der Arbeit war es, die Wirkung der Akkumulation von AGEs auf das Herz eines gesunden Organismus zu untersuchen. Ob mögliche Wirkungen der AGEs in Abhängigkeit von RAGE, dem Rezeptor für AGEs, ablaufen, sollte anhand der Verwendung einer RAGE Knockout Mauslinie geklärt werden. Ein weiteres Merkmal des metabolischen Syndroms ist das Auftreten einer Dyslipidämie (Vitale, Marazzi et al. 2006; Levesque and Lamarche 2008; Caminiti, Volterrani et al. 2009). Gekennzeichnet ist diese durch eine Hypertriglyzeridämie und erhöhte LDL- sowie verminderte HDL-Werte (Ascaso, Gonzalez Santos et al. 2007; Esposito, Ciotola et al. 2007; Esposito, Ciotola et al. 2008; Ascaso, Millan et al. 2011). Deshalb wurden im Rahmen der Arbeit auch die Plasmakonzentrationen von Triglyzeriden (TG), Gesamtcholesterin (TC), LDL und HDL ermittelt.

Die Aortenklappenstenose wird in der Literatur meist als eine altersassoziierte degenerative Erkrankung beschrieben. Allerdings gibt es Hinweise, dass es sich nicht

nur um einen altersbedingten degenerativen Prozess handelt, sondern vielmehr um eine aktive Reaktion, der ähnliche pathologische Entstehungswege wie der Arteriosklerose, zu Grunde liegen. In klinischen und experimentellen Studien wurde die Rolle verschiedener Moleküle, u.a. von AGEs, bei der Entstehung von arteriosklerotischen Plaques gezeigt. Diese scheinen auch bei der Entstehung der Aortenklappenstenose eine Rolle zu spielen. Es ist bekannt, dass die Anreicherung von AGEs in der extrazellulären Matrix des Herzens und in Gefäßen zu strukturellen und funktionellen Veränderungen durch die Quervernetzung von Kollagenen führt (Reddy 2004). Dies beeinflusst die Endothelfunktion und es kommt zu einer vermehrten Synthese von proinflammatorischen Zytokinen (Nozynski, Zakliczynski et al. 2013). Zahlreiche Studien zeigen, dass fortgeschrittene Glykierung einer der Hauptmechanismen für die Entstehung der Herzinsuffizienz ist (Kilhovd, Juutilainen et al. 2007; Hartog, Hummel et al. 2008; Campbell, Somaratne et al. 2011; Nin, Jorsal et al. 2011). Deshalb scheint der Rezeptor für Advanced Glycation Endproducts (RAGE) ein interessanter therapeutischer Angriffspunkt sowohl für die Arteriosklerose, wie auch für die Aortenklappenstenose, zu sein. Dass RAGE bei der Entstehung der Arteriosklerose und der Aortenklappenerkrankung eine Rolle spielt, wird durch Studiendaten über die lösliche Isoform, soluble RAGE (sRAGE), bestätigt. Erhöhte Serumspiegel von sRAGE gingen in Studien mit einer niedrigeren KHK Inzidenz einher, wogegen niedrige sRAGE Spiegel mit KHK, Sklerose der Arteria carotis und Aortenklappenstenose assoziiert waren (Basta, Corciu et al. 2010). In einem diabetischen Mausmodell führte die Behandlung mit sRAGE zu einer geringeren Ausprägung der Arteriosklerose, unabhängig von den Blutzucker und Lipidwerten (Park, Raman et al. 1998).

Die Aortenklappenstenose ist eine häufige Erkrankung in Industrienationen. Ein Faktor, der mit der Entstehung von Aortenklappen Veränderungen in Zusammenhang gebracht wird ist unsere fett- und kohlenhydratreiche Ernährung. Bisher konnte schon in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass eine so genannte Hochfettdiät bei C57Bl/6N Mäusen zu einer signifikanten Gewichtszunahme führt (Sandu, Song et al. 2005; Gallou-Kabani, Vige et al. 2007). Dabei war bereits nach nur sechs Wochen Hochfetterernährung das Gewicht der Tiere signifikant erhöht (Andrikopoulos, Massa et al. 2005). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte nach sieben Monaten Hochfettdiät eine signifikante Gewichtszunahme und linksventrikuläre Hypertrophie vor allem der Wildtypmäuse beobachtet werden. Diese Ergebnisse werden von Daten von Tian et al. (Tian, Li et al. 2012) unterstützt, die in einem Rattenmodell unter Hochfetterernährung über einen vergleichbaren Zeitraum eine Verminderung der linksventrikulären Ejektionsfraktion und des Herz Index zeigen konnten. Diese Studie und unsere Daten

konnten eine linksventrikuläre myokardiale Hypertrophie als Zeichen des linksventrikulären Remodeling induziert durch eine Hochfetterernährung nachweisen. Ein weiteres wichtiges Ergebnis unserer vorliegenden Untersuchung ist, dass Wildtypmäuse nach sieben Monaten Hochfetterernährung signifikante Veränderungen an der Aortenklappe im Sinne einer Aortenklappenstenose entwickelten, wohingegen die RAGE Knockout Tiere unter derselben Hochfetterernährung hiervor geschützt waren. Die durchgeführten echokardiographischen Untersuchungen zeigten, dass die Wildtypmäuse mit Hochfetterernährung im Verlauf des Experiments deutliche Veränderungen der Aortenklappe aufwiesen. Die systolische transvalvuläre Geschwindigkeit nahm bei diesen Tieren über den Versuchszeitraum von 7 Monaten signifikant zu und war gegenüber der Vergleichsgruppe mit Normaldiät deutlich erhöht. Bei der morphologischen Untersuchung der Herz- und Aortenklappen Präparate war bei den Wildtypmäusen unter der Hochfetterdiät die linksventrikuläre Fläche, die Aortenklappen Öffnungsfläche und der Aortenklappen-Flächen- Index deutlich reduziert. Die histologischen und immunohistochemischen Untersuchungen der Aortenklappen Präparate zeigten vermehrte Kalkablagerungen, vermehrte AGE Anreicherungen und eine stärkere RAGE Expression der Aortenklappen Taschen von den WT-HFD Mäusen. Die RAGE KO Mäuse entwickelten unter der Hochfetterernährung auch eine Adipositas, allerdings fanden sich keine echokardiographischen Zeichen einer Aortenklappenstenose. Die Herzen und Aortenklappen dieser Tiere wiesen kaum morphologische Veränderungen auf. Eine mögliche Erklärung für unsere Ergebnisse ist, dass RAGE Knockout Mäuse ein besseres HDL/LDL Verhältnis aufwiesen. Im Einklang mit unseren Ergebnissen zeigte die Arbeitsgruppe Wei (Wei, Ren et al. 2013) in einem Rattenmodell, dass AGEs die Gefäßverkalkung zum größten Teil über einen RAGE vermittelten ROS Mechanismus verstärken. Brodeur und Kollegen (Brodeur, Bouvet et al. 2014) beschrieben in diesem Zusammenhang eine reduzierte Mediaverkalkung der Femoralarterien von diabetischen Ratten, wenn die Verbindung von AGE mit RAGE oder das RAGE Signaling reduziert bzw. unterbrochen werden. In einer früheren Untersuchung konnten wir auch zeigen, dass RAGE KO Mäuse besser gegen oxydative Schädigungen geschützt sind (Leuner, Max et al. 2012). Schließlich demonstrierten Li et al. in einem Kaninchenmodell, dass eine verminderte RAGE Expression die Progression der Aortenklappenverkalkung abschwächt, indem die Infiltration von inflammatorischen Zellen und der oxidative Stress reduziert werden (Li, Cai et al. 2012). Matsumoto und Kollegen zeigten außerdem, dass regelmäßiges Bewegungstraining die Entstehung einer Aortenklappenstenose bei Mäusen über eine Reihe von Mechanismen, u.a. durch die verminderte Einwanderung von inflammatorischen Zellen und die Reduktion von

oxidativem Stress, verhindert (Matsumoto, Adams et al. 2010). RAGE beeinflusst auch die Immunantwort. Die Blockade von RAGE führt zu einer verzögerten inflammatorischen Antwort, während die Aktivierung von RAGE am Endothel und den Lymphozyten zu einer zellulären Reaktion führt, die die Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren forciert (Ott, Jacobs et al. 2014). Chavakis et al. fanden heraus, dass RAGE ein Gegenrezeptor für das Leukozyten Integrin Mac-1 ist, welches direkt die Leukozytenrekrutierung steuert (Chavakis, Bierhaus et al. 2003). Die Aktivierung von RAGE an Leukozyten führt zu einer NF- κ B abhängigen Genexpression. Neben der gesteigerten ROS Produktion führt eine Bindung von AGEs an RAGE auch zu verminderten zellulären Abwehr (Bierhaus, Chevion et al. 1997). All diese Mechanismen könnten die Entstehung einer Aortenklappenstenose beeinflussen, allerdings können wir diese Frage an Hand der hier gezeigten Daten noch nicht beantworten.

Diese Arbeit konnte zeigen, dass eine Hochfetterernährung über 7 Monate in einem Mausmodell zur Entstehung von Aortenklappen Veränderungen im Sinne einer Aortenklappenstenose führt. Das nicht Vorhandensein des AGE Rezeptors RAGE führte bei RAGE KO Mäusen unter einer Hochfettdiät zwar auch zu einer Gewichtszunahme, allerdings waren sie gegen die Entwicklung von Aortenklappen- und kardialen Veränderungen weitestgehend geschützt.

5.1. Studienlimitationen

Einige Einschränkungen dieser Untersuchung sollten realisiert werden. Die Anzahl der Mäuse pro Gruppe war klein und wir haben nur am Ende der Untersuchung Serumproben zur Bestimmung von Plasmalipidwerten entnommen, leider haben wir keine Blutzuckerwerte bestimmt. Auch den Blutdruck der Tiere haben wir nicht gemessen. Es ist allerdings anzunehmen, dass einige Tiere einen Hypertonus entwickelt haben, was auch mit dem Auftreten von Aortenklappen Veränderungen assoziiert wird.

5.2. Ausblick

Mit einer immer älter werdenden Bevölkerung in Industrieländern stellt die kalzifizierende Aortenklappenstenose ein immer größer werdendes Gesundheitsproblem dar. Die einzige bisher etablierte Therapie für die symptomatische Aortenklappenstenose ist der operative Klappenersatz. Mögliche Behandlungsstrategien, die durch eine Anpassung der Ernährung, Sport oder die Gabe von AGE-Hemmern die Entstehung der Erkrankung verzögern, reduzieren oder gar verhindern wären hier von großer Bedeutung. Es gibt eine Reihe von Parallelen zwischen

arteriosklerotischen Gefäßläsionen und den pathologischen Veränderungen in sklerotischen beziehungsweise stenotischen Aortenklappentaschen. Beide Erkrankungen zeichnen sich durch Ähnlichkeiten in den pathophysiologischen Prozessen aus. Otto et al. zeigten, dass die initialen pathologischen Veränderungen bei der Aortenklappenstenose ebenso wie bei der Arteriosklerose, durch eine Kontinuitätsunterbrechung der Basalmembran, starke Lipidablagerung und einen chronischen, T-Zell und Makrophagen vermittelten Immunprozess gekennzeichnet sind (Otto, Kuusisto et al. 1994). Die Akkumulation von Lipoproteinen spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese der kalzifizierenden Aortenklappen Erkrankung. Oxidiertes LDL (Olsson, Thyberg et al. 1999), Lipoprotein, Apolipoprotein B und Apo-lipoprotein E (O'Brien, Reichenbach et al. 1996) wurden in humanen stenotischen Aortenklappen nachgewiesen. O'Brien et al. zeigten, dass Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) Makrophagen assoziiert und extrazellulär in sklerotischen sowie stenotischen humanen Aortenklappen vorhanden ist (O'Brien, Shavelle et al. 2002). Der Angiotensin-II-Rezeptor Typ-1 wurde als weiteres Element des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems in stenotischen Aortenklappen nachgewiesen und von Fibroblasten in den pathologischen Läsionen exprimiert (O'Brien 2006). Diese experimentellen Daten führten dazu, dass man sich von der Therapie mit Statinen und ACE-Hemmern positive Effekte bei der medikamentösen Behandlung der Aortenklappenstenose versprach. Bisher konnten allerdings drei große Studien keinen Effekt der Statin-Therapie auf die Progression der Aortenklappenstenose zeigen (Cowell, Newby et al. 2005; Rossebo, Pedersen et al. 2008; Chan, Teo et al. 2010). Allerdings war möglicherweise der Erkrankungsprozess für einen medikamentösen Erfolg bereits zu fortgeschritten (Rayner, Coffey et al. 2014). Eine weitere medikamentöse Therapiemöglichkeit ist die Behandlung mit ACE-Hemmern, die die linksventrikuläre Hypertrophie (Chockalingam, Venkatesan et al. 2004) reduzieren und einen positiven Effekt in Tiermodellen zeigten (Turcani and Rupp 2000). Die Daten großer klinischer Studien hierzu stehen allerdings noch aus. Auch körperliche Aktivität hat einen positiven Effekt auf das kardiovaskuläre System. Dieser erstreckt sich sowohl auf die Primär- wie auch auf die Sekundärprävention von kardiovaskulären Ereignissen bei Herzinsuffizienz und Koronararteriosklerose. Die kalzifizierende Aortenklappen Erkrankung zeigt pathophysiologische Gemeinsamkeiten sowie Parallelen im Risikofaktorenprofil mit der Arteriosklerose. Die frühe Beeinflussbarkeit des Erkrankungsprozesses der Aortenklappe durch körperliches Training konnte im Mausmodell durch Matsumoto et al. (Matsumoto, Adams et al. 2010) gezeigt werden. Allerdings ließ sich nicht bestätigen, dass bei bereits etablierten Veränderungen der Aortenklappe im Sinne einer Aortenklappensklerose durch körperliches Training im Tiermodell auch eine

Remission zu erreichen ist. Vielmehr geben die immunohistochemischen und Genexpressionsanalysen Grund zur Annahme, dass der einmal initiierte sklerosierende Prozess innerhalb der Aortenklappentaschen nicht mehr durch körperliches Training zu beeinflussen ist (Schlotter, Matsumoto et al. 2012). Möglicherweise könnte auch durch die Gabe von AGE-Crosslink-Breakern eine Reduktion der AGE-RAGE Interaktion und damit eine Verminderung der Entzündungsreaktion initiiert werden. Aktuelle Daten von Chang et al.(Chang, Tsai et al. 2014) zeigen, dass durch eine derartige Therapie die Induktion und Progression von entzündlichen Prozessen, die auch bei der Entstehung der Aortenklappenstenose eine Rolle spielen, gehemmt wird.

6. Zusammenfassung

Einleitung

Die durch die Maillard-Reaktion entstehenden Advanced Glycation Endproducts (AGEs) stehen im Verdacht zur Entstehung der Aortenklappenstenose beizutragen. Unter einer Hochfetterernährung sollte es zu einer vermehrten Akkumulation von AGEs kommen. Ob im gesunden Organismus eine AGE Akkumulation das Herz- und Kreislaufsystem negativ beeinflusst, und die Entstehung von Erkrankungen wie z.B. der Aortenklappenstenose forcieren kann, wurde bisher kaum untersucht.

Zielsetzung

Ziel der Arbeit war es, die Effekte einer fettreichen Ernährung auf das Herz eines gesunden Organismus zu untersuchen. Hierzu wurden Fütterungsstudien im Tiermodell Maus durchgeführt. Ob mögliche Wirkungen der AGE Akkumulation in Abhängigkeit von RAGE, dem Rezeptor für AGEs, ablaufen, sollte anhand der Verwendung einer RAGE Knockout Mauslinie geklärt werden.

Material und Methoden

Die Versuchstiere waren sechs Wochen alte männliche Wildtypmäuse (n=14) und sechs Wochen alte männliche RAGE knockout Mäuse (n=14). Für den Versuch wurden die Tiere zufällig in je zwei Gruppen eingeteilt, die jeweils eine Normaldiät oder eine Hochfett diät erhielten. Im Verlauf des Experiments wurde die Gewichtszunahme der Tiere wöchentlich gemessen und eine echokardiographische Untersuchung der Aortenklappen mit dem CW-Doppler nach 2, 4 und 7 Monaten durchgeführt. Am Ende des Experiments wurden Blutproben zur Untersuchung des Lipidstoffwechsels und die Herzen zur morphologischen, histologischen und immunohistochemischen Untersuchung entnommen.

Ergebnisse

Diese Arbeit konnte zeigen, dass eine Hochfetterernährung über 7 Monate in einem Mausmodell zur Gewichtszunahme und zur Entstehung von morphologischen, histologischen und immunohistochemischen Veränderungen am Herzen und der Aortenklappe führt, die denen einer Aortenklappenstenose entsprechen. Das nicht Vorhandensein des AGE Rezeptors RAGE führte bei RAGE KO Mäusen unter einer Hochfett diät zwar auch zu einer Gewichtszunahme, allerdings waren sie gegen die Entwicklung von Aortenklappen- und kardialen Veränderungen weitestgehend

geschützt. Dies ist möglicherweise auf ein besseres HDL/LDL Verhältnis bei diesen Tieren und eine durch den Mangel an RAGE Rezeptoren verminderte Entzündungsreaktion zurückzuführen.

Diskussion und Ausblick

Mit einer immer älter werdenden Bevölkerung in Industrieländern stellt die kalzifizierende Aortenklappenstenose ein zunehmendes Gesundheitsproblem dar. Die einzige bisher etablierte Therapie ist der operative Klappenersatz. Mögliche Behandlungsstrategien, die durch eine Anpassung der Ernährung, Sport oder die Gabe von AGE-Crosslink-Breakern eine Reduktion der AGE-RAGE Interaktion initiieren und hierdurch die Entstehung der Erkrankung verzögern, das Fortschreiten reduzieren oder gar verhindern wären von großer Bedeutung.

7. Literaturverzeichnis

- Ahmed, N. (2005). "Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications." Diabetes Res Clin Pract **67**(1): 3-21.
- Aikawa, E., M. Nahrendorf, et al. (2007). "Multimodality molecular imaging identifies proteolytic and osteogenic activities in early aortic valve disease." Circulation **115**(3): 377-386.
- Al-Robaiy, S., B. Weber, et al. (2013). "The receptor for advanced glycation end-products supports lung tissue biomechanics." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **305**(7): L491-500.
- Andrikopoulos, S., C. M. Massa, et al. (2005). "Differential effect of inbred mouse strain (C57BL/6, DBA/2, 129T2) on insulin secretory function in response to a high fat diet." J Endocrinol **187**(1): 45-53.
- Ascaso, J., P. Gonzalez Santos, et al. (2007). "Management of dyslipidemia in the metabolic syndrome: recommendations of the Spanish HDL-Forum." Am J Cardiovasc Drugs **7**(1): 39-58.
- Ascaso, J. F., J. Millan, et al. (2011). "Prevalence of metabolic syndrome and cardiovascular disease in a hypertriglyceridemic population." Eur J Intern Med **22**(2): 177-181.
- Badenhorst, D., M. Maseko, et al. (2003). "Cross-linking influences the impact of quantitative changes in myocardial collagen on cardiac stiffness and remodelling in hypertension in rats." Cardiovasc Res **57**(3): 632-641.
- Basta, G., A. I. Corciu, et al. (2010). "Circulating soluble receptor for advanced glycation end-product levels are decreased in patients with calcific aortic valve stenosis." Atherosclerosis **210**(2): 614-618.
- Bierhaus, A., S. Chevion, et al. (1997). "Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappaB is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells." Diabetes **46**(9): 1481-1490.
- Bierhaus, A., P. M. Humpert, et al. (2005). "Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products." J Mol Med (Berl) **83**(11): 876-886.
- Bierhaus, A., S. Schiekofer, et al. (2001). "Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB." Diabetes **50**(12): 2792-2808.
- Brodeur, M. R., C. Bouvet, et al. (2014). "Reduction of Advanced-Glycation End Products Levels and Inhibition of RAGE Signaling Decreases Rat Vascular Calcification Induced by Diabetes." PLoS One **9**(1): e85922.
- Bucciarelli, L. G., T. Wendt, et al. (2002). "RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice." Circulation **106**(22): 2827-2835.
- Bundesamt (2012). Todesursachen in Deutschland 2011. Wiesbaden Statistisches Bundesamt.

- Butchart, E. G., C. Gohlke-Barwolf, et al. (2005). "Recommendations for the management of patients after heart valve surgery." Eur Heart J **26**(22): 2463-2471.
- Cai, W., J. Uribarri, et al. (2014). "Oral glycotoxins are a modifiable cause of dementia and the metabolic syndrome in mice and humans." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(13): 4940-4945.
- Caminiti, G., M. Volterrani, et al. (2009). "Metabolic syndrome predicts lower functional recovery in female but not in male patients after an acute cardiac event." Int J Cardiol **135**(3): 296-301.
- Campbell, D. J., J. B. Somaratne, et al. (2011). "Impact of type 2 diabetes and the metabolic syndrome on myocardial structure and microvasculature of men with coronary artery disease." Cardiovasc Diabetol **10**: 80.
- Carabello, B. A. (2013). "The symptoms of aortic stenosis: a step closer to understanding their cause." JACC Cardiovasc Imaging **6**(2): 147-149.
- Casselmann, C., A. Reimann, et al. (2004). "Age-dependent expression of advanced glycation end product receptor genes in the human heart." Gerontology **50**(3): 127-134.
- Chan, K. L., K. Teo, et al. (2010). "Effect of Lipid lowering with rosuvastatin on progression of aortic stenosis: results of the aortic stenosis progression observation: measuring effects of rosuvastatin (ASTRONOMER) trial." Circulation **121**(2): 306-314.
- Chang, P. C., S. C. Tsai, et al. (2014). "N-Phenacylthiazolium Bromide Inhibits the Advanced Glycation End Product (AGE)-AGE Receptor Axis to Modulate Experimental Periodontitis in Rats." J Periodontol **85**(7): e268-276.
- Chavakis, T., A. Bierhaus, et al. (2003). "The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment." J Exp Med **198**(10): 1507-1515.
- Cheng, G., L. L. Wang, et al. (2007). "Beneficial effects of C36, a novel breaker of advanced glycation endproducts cross-links, on the cardiovascular system of diabetic rats." Br J Pharmacol **152**(8): 1196-1206.
- Chockalingam, A., S. Venkatesan, et al. (2004). "Safety and efficacy of angiotensin-converting enzyme inhibitors in symptomatic severe aortic stenosis: Symptomatic Cardiac Obstruction-Pilot Study of Enalapril in Aortic Stenosis (SCOPE-AS)." Am Heart J **147**(4): E19.
- Christen, T., R. Lerch, et al. (2000). "Die Aortenklappenstenose beim Erwachsenen." Schweiz Med Forum(6): 626-632.
- Colvee, E. and J. M. Hurle (1981). "Maturation of the extracellular material of the semilunar heart valves in the mouse. A histochemical analysis of collagen and mucopolysaccharides." Anat Embryol (Berl) **162**(3): 343-352.
- Constien, R., A. Forde, et al. (2001). "Characterization of a novel EGFP reporter mouse to monitor Cre recombination as demonstrated by a Tie2 Cre mouse line." Genesis **30**(1): 36-44.
- Cowell, S. J., D. E. Newby, et al. (2005). "A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis." N Engl J Med **352**(23): 2389-2397.

- Drolet, M. C., J. Couet, et al. (2008). "Development of aortic valve sclerosis or stenosis in rabbits: role of cholesterol and calcium." J Heart Valve Dis **17**(4): 381-387.
- Drolet, M. C., E. Roussel, et al. (2006). "A high fat/high carbohydrate diet induces aortic valve disease in C57BL/6J mice." J Am Coll Cardiol **47**(4): 850-855.
- Dukic-Stefanovic, S., R. Schinzel, et al. (2001). "AGES in brain ageing: AGE-inhibitors as neuroprotective and anti-dementia drugs?" Biogerontology **2**(1): 19-34.
- Dweck, M. R., N. A. Boon, et al. (2012). "Calcific aortic stenosis: a disease of the valve and the myocardium." J Am Coll Cardiol **60**(19): 1854-1863.
- Dyer, D. G., J. A. Blackledge, et al. (1991). "Formation of pentosidine during nonenzymatic browning of proteins by glucose. Identification of glucose and other carbohydrates as possible precursors of pentosidine in vivo." J Biol Chem **266**(18): 11654-11660.
- Esposito, K., M. Ciotola, et al. (2007). "Mediterranean diet and the metabolic syndrome." Mol Nutr Food Res **51**(10): 1268-1274.
- Esposito, K., M. Ciotola, et al. (2008). "Lifestyle approach for type 2 diabetes and metabolic syndrome." Curr Atheroscler Rep **10**(6): 523-528.
- Falcao-Pires, I., N. Hamdani, et al. (2011). "Diabetes mellitus worsens diastolic left ventricular dysfunction in aortic stenosis through altered myocardial structure and cardiomyocyte stiffness." Circulation **124**(10): 1151-1159.
- Freeman, R. V., G. Crittenden, et al. (2004). "Acquired aortic stenosis." Expert Rev Cardiovasc Ther **2**(1): 107-116.
- Freeman, R. V. and C. M. Otto (2005). "Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies." Circulation **111**(24): 3316-3326.
- Fu, M. X., J. R. Requena, et al. (1996). "The advanced glycation end product, Nepsilon-(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions." J Biol Chem **271**(17): 9982-9986.
- Gallou-Kabani, C., A. Vige, et al. (2007). "C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome." Obesity (Silver Spring) **15**(8): 1996-2005.
- Goh, S. Y. and M. E. Cooper (2008). "Clinical review: The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes." J Clin Endocrinol Metab **93**(4): 1143-1152.
- Gotzmann, M., A. Czauderna, et al. (2014). "Three-Year Outcomes After Transcatheter Aortic Valve Implantation With the CoreValve Prosthesis." Am J Cardiol **114**(4):606-611.
- Gould, K. L. and B. A. Carabello (2003). "Why angina in aortic stenosis with normal coronary arteriograms?" Circulation **107**(25): 3121-3123.
- Hare, M. J., D. J. Magliano, et al. (2013). "Glucose-independent ethnic differences in HbA1c in people without known diabetes." Diabetes Care **36**(6): 1534-1540.

- Hartog, J. W., Y. M. Hummel, et al. (2008). "Skin-autofluorescence, a measure of tissue advanced glycation end-products (AGEs), is related to diastolic function in dialysis patients." J Card Fail **14**(7): 596-602.
- Hoff, H. F., T. E. Whitaker, et al. (1992). "Oxidation of low density lipoprotein leads to particle aggregation and altered macrophage recognition." J Biol Chem **267**(1): 602-609.
- Hofmann, B., A. C. Adam, et al. (2013). "Advanced glycation end product associated skin autofluorescence: a mirror of vascular function?" Exp Gerontol **48**(1): 38-44.
- Huang, J. S., J. Y. Guh, et al. (2001). "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 **81**(1): 102-113.
- John, W. G. and E. J. Lamb (1993). "The Maillard or browning reaction in diabetes." Eye (Lond) **7 (Pt 2)**: 230-237.
- Kilhovd, B. K., A. Juutilainen, et al. (2007). "Increased serum levels of advanced glycation endproducts predict total, cardiovascular and coronary mortality in women with type 2 diabetes: a population-based 18 year follow-up study." Diabetologia **50**(7): 1409-1417.
- Lakatta, E. G. (2002). "Age-associated cardiovascular changes in health: impact on cardiovascular disease in older persons." Heart Fail Rev **7**(1): 29-49.
- Lee, J. C., X. Q. Zhao, et al. (2005). "Aortic valve sclerosis." J Echocardiogr **3**(2): 51-59.
- Leuner, B., M. Max, et al. (2012). "RAGE influences obesity in mice. Effects of the presence of RAGE on weight gain, AGE accumulation, and insulin levels in mice on a high fat diet." Z Gerontol Geriatr **45**(2): 102-108.
- Levesque, J. and B. Lamarche (2008). "The metabolic syndrome: definitions, prevalence and management." J Nutrigenet Nutrigenomics **1**(3): 100-108.
- Li, D., S. Siriamornpun, et al. (2005). "Lean meat and heart health." Asia Pac J Clin Nutr **14**(2): 113-119.
- Li, F., Z. Cai, et al. (2012). "Pioglitazone attenuates progression of aortic valve calcification via down-regulating receptor for advanced glycation end products." Basic Res Cardiol **107**(6): 306.
- Li, J. H., W. Wang, et al. (2004). "Advanced glycation end products induce tubular epithelial-myofibroblast transition through the RAGE-ERK1/2 MAP kinase signaling pathway." Am J Pathol **164**(4): 1389-1397.
- Li, S. Y., Y. Liu, et al. (2005). "High-fat diet enhances visceral advanced glycation end products, nuclear O-Glc-Nac modification, p38 mitogen-activated protein kinase activation and apoptosis." Diabetes Obes Metab **7**(4): 448-454.
- Liliensiek, B., M. A. Weigand, et al. (2004). "Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response." J Clin Invest **113**(11): 1641-1650.

- Maillard, L. (1912). "Action des acides amines sur les sucres: formation des melanoides par voie methodique." CR Acad Sci Ser **154**: 66-88.
- Makkar, R. R., G. P. Fontana, et al. (2012). "Transcatheter aortic-valve replacement for inoperable severe aortic stenosis." N Engl J Med **366**(18): 1696-1704.
- Mann, N. (2000). "Dietary lean red meat and human evolution." Eur J Nutr **39**(2): 71-79.
- Matsumoto, Y., V. Adams, et al. (2010). "Regular exercise training prevents aortic valve disease in low-density lipoprotein-receptor-deficient mice." Circulation **121**(6): 759-767.
- Miller, J. D., R. M. Weiss, et al. (2011). "Calcific aortic valve stenosis: methods, models, and mechanisms." Circ Res **108**(11): 1392-1412.
- Minakata, K., S. Tanaka, et al. (2014). "Long-term outcome of the carpentier-edwards pericardial valve in the aortic position in Japanese patients." Circ J **78**(4): 882-889.
- Miyata, T., Y. Wada, et al. (1997). "Implication of an increased oxidative stress in the formation of advanced glycation end products in patients with end-stage renal failure." Kidney Int **51**(4): 1170-1181.
- Mohler, E. R., 3rd, L. P. Adam, et al. (1997). "Detection of osteopontin in calcified human aortic valves." Arterioscler Thromb Vasc Biol **17**(3): 547-552.
- Monnier, V. M., D. R. Sell, et al. (1988). "Collagen browning and cross-linking are increased in chronic experimental hyperglycemia. Relevance to diabetes and aging." Diabetes **37**(7): 867-872.
- Myint, K. M., Y. Yamamoto, et al. (2006). "RAGE control of diabetic nephropathy in a mouse model: effects of RAGE gene disruption and administration of low-molecular weight heparin." Diabetes **55**(9): 2510-2522.
- Nass, N., K. Vogel, et al. (2010). "Glycation of PDGF results in decreased biological activity." Int J Biochem Cell Biol **42**(5): 749-754.
- Nin, J. W., A. Jorsal, et al. (2011). "Higher plasma levels of advanced glycation end products are associated with incident cardiovascular disease and all-cause mortality in type 1 diabetes: a 12-year follow-up study." Diabetes Care **34**(2): 442-447.
- Nishikawa, T., D. Edelstein, et al. (2000). "Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage." Nature **404**(6779): 787-790.
- Nozynski, J., M. Zakliczynski, et al. (2013). "Advanced glycation end products and lipofuscin deposits share the same location in cardiocytes of the failing heart." Exp Gerontol **48**(2): 223-228.
- Nyamdorj, R., Q. Qiao, et al. (2009). "BMI compared with central obesity indicators as a predictor of diabetes incidence in Mauritius." Obesity (Silver Spring) **17**(2): 342-348.
- O'Brien, K. D. (2006). "Pathogenesis of calcific aortic valve disease: a disease process comes of age (and a good deal more)." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(8): 1721-1728.

- O'Brien, K. D., J. Kuusisto, et al. (1995). "Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions." Circulation **92**(8): 2163-2168.
- O'Brien, K. D., D. D. Reichenbach, et al. (1996). "Apolipoproteins B, (a), and E accumulate in the morphologically early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **16**(4): 523-532.
- O'Brien, K. D., D. M. Shavelle, et al. (2002). "Association of angiotensin-converting enzyme with low-density lipoprotein in aortic valvular lesions and in human plasma." Circulation **106**(17): 2224-2230.
- Olsson, M., J. Thyberg, et al. (1999). "Presence of oxidized low density lipoprotein in nonrheumatic stenotic aortic valves." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(5): 1218-1222.
- Ott, C., K. Jacobs, et al. (2014). "Role of advanced glycation end products in cellular signaling." Redox Biol **2**: 411-429.
- Otto, C. M. (2008). "Calcific aortic stenosis--time to look more closely at the valve." N Engl J Med **359**(13): 1395-1398.
- Otto, C. M., J. Kuusisto, et al. (1994). "Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies." Circulation **90**(2): 844-853.
- Park, L., K. G. Raman, et al. (1998). "Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts." Nat Med **4**(9): 1025-1031.
- Paulsen, F. und J. Waschke (2010). "Sobotta-Atlas der Anatomie des Menschen. Innere Organe" Urban & Fischer Verlag, 23. Auflage, Seite 16.
- Pullerits, R., M. Bokarewa, et al. (2005). "Decreased levels of soluble receptor for advanced glycation end products in patients with rheumatoid arthritis indicating deficient inflammatory control." Arthritis Res Ther **7**(4): R817-824.
- Rahimtoola, S. H. and R. L. Frye (2000). "Valvular heart disease." Circulation **102**(20 Suppl 4): IV24-33.
- Raj, D. S., D. Choudhury, et al. (2000). "Advanced glycation end products: a Nephrologist's perspective." Am J Kidney Dis **35**(3): 365-380.
- Rayner, J., S. Coffey, et al. (2014). "Aortic valve disease." Int J Clin Pract. doi: 10.1111/ijcp.12471
- Reddy, G. K. (2004). "AGE-related cross-linking of collagen is associated with aortic wall matrix stiffness in the pathogenesis of drug-induced diabetes in rats." Microvasc Res **68**(2): 132-142.
- Reddy, S., J. Bichler, et al. (1995). "N epsilon-(carboxymethyl)lysine is a dominant advanced glycation end product (AGE) antigen in tissue proteins." Biochemistry **34**(34): 10872-10878.
- Roberts, W. C., T. J. Vowels, et al. (2013). "Natural history of unoperated aortic stenosis during a 50-year period of cardiac valve replacement." Am J Cardiol **112**(4): 541-553.

- Rossebo, A. B., T. R. Pedersen, et al. (2008). "Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis." N Engl J Med **359**(13): 1343-1356.
- Sakata, N., J. Meng, et al. (1995). "Nonenzymatic glycation and extractability of collagen in human atherosclerotic plaques." Atherosclerosis **116**(1): 63-75.
- Sandu, O., K. Song, et al. (2005). "Insulin resistance and type 2 diabetes in high-fat-fed mice are linked to high glycotoxin intake." Diabetes **54**(8): 2314-2319.
- Schlotter, F., Y. Matsumoto, et al. (2012). "Regular exercise or changing diet does not influence aortic valve disease progression in LDLR deficient mice." PLoS One **7**(5): e37298.
- Simm, A., A. Navarrete-Santos, et al. (2012). "[Protein glycation as a pathological mechanism in diabetes]." Z Gerontol Geriatr **45**(2): 95-99.
- Singh, R., A. Barden, et al. (2001). "Advanced glycation end-products: a review." Diabetologia **44**(2): 129-146.
- Smith, M. A., V. M. Monnier, et al. (1995). "Amyloidosis, advanced glycation end products and Alzheimer disease." Neuroreport **6**(12): 1595-1596.
- Sobal, G., H. Sinzinger, et al. (1999). "Binding of long-term glycated low density lipoprotein and AGE-albumin by peripheral monocytes and endothelial cells." J Recept Signal Transduct Res **19**(1-4): 267-281.
- Szamosi, A. and B. Wassberg (1983). "Radiologic detection of aortic stenosis." Acta Radiol Diagn (Stockh) **24**(3): 201-207.
- Takahashi, M., M. Suzuki, et al. (1997). "Relationship between pentosidine levels in serum and urine and activity in rheumatoid arthritis." Br J Rheumatol **36**(6): 637-642.
- Thanavaro, K. L. and J. V. Nixon (2014). "Endocarditis 2014: An update." Heart Lung **43**(4): 334-337.
- Tian, Y. Q., S. S. Li, et al. (2012). "Effects of pioglitazone on high-fat-diet-induced ventricular remodeling and dysfunction in rats." J Cardiovasc Pharmacol Ther **17**(2): 223-228.
- Tikellis, C., M. C. Thomas, et al. (2008). "Cardiac inflammation associated with a Western diet is mediated via activation of RAGE by AGEs." Am J Physiol Endocrinol Metab **295**(2): E323-330.
- Towler, D. A. (2013). "Molecular and cellular aspects of calcific aortic valve disease." Circ Res **113**(2): 198-208.
- Turcani, M. and H. Rupp (2000). "Heart failure development in rats with ascending aortic constriction and angiotensin-converting enzyme inhibition." Br J Pharmacol **130**(7): 1671-1677.
- Ulrich, P. and A. Cerami (2001). "Protein glycation, diabetes, and aging." Recent Prog Horm Res **56**: 1-21.
- Uribarri, J. and K. R. Tuttle (2006). "Advanced glycation end products and nephrotoxicity of high-protein diets." Clin J Am Soc Nephrol **1**(6): 1293-1299.

- Vahanian, A., O. Alfieri, et al. (2013). "[Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012). The Joint Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS)]." G Ital Cardiol (Rome) **14**(3): 167-214.
- Vitale, C., G. Marazzi, et al. (2006). "Metabolic syndrome." Minerva Med **97**(3): 219-229.
- Vlassara, H., H. Fuh, et al. (1995). "Advanced glycation endproducts promote adhesion molecule (VCAM-1, ICAM-1) expression and atheroma formation in normal rabbits." Mol Med **1**(4): 447-456.
- Vlassara, H. and G. E. Striker (2013). "Advanced glycation endproducts in diabetes and diabetic complications." Endocrinol Metab Clin North Am **42**(4): 697-719.
- Walther, T., J. Blumenstein, et al. (2012). "Contemporary management of aortic stenosis: surgical aortic valve replacement remains the gold standard." Heart **98** **Suppl 4**: iv23-29.
- Wang, Z., Y. Jiang, et al. (2012). "Advanced glycation end-product Nepsilon-carboxymethyl-Lysine accelerates progression of atherosclerotic calcification in diabetes." Atherosclerosis **221**(2): 387-396.
- Wautier, M. P., O. Chappey, et al. (2001). "Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE." Am J Physiol Endocrinol Metab **280**(5): E685-694.
- Wei, Q., X. Ren, et al. (2013). "Advanced glycation end products accelerate rat vascular calcification through RAGE/oxidative stress." BMC Cardiovasc Disord **13**: 13.
- Wells-Knecht, K. J., E. Brinkmann, et al. (1996). "New biomarkers of Maillard reaction damage to proteins." Nephrol Dial Transplant **11** **Suppl 5**: 41-47.
- Wendt, T. M., N. Tanji, et al. (2003). "RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy." Am J Pathol **162**(4): 1123-1137.
- Wild, S., G. Roglic, et al. (2004). "Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030." Diabetes Care **27**(5): 1047-1053.
- Yamamoto, Y., T. Doi, et al. (2005). "Receptor for advanced glycation end products is a promising target of diabetic nephropathy." Ann N Y Acad Sci **1043**: 562-566.
- Yamamoto, Y., I. Kato, et al. (2001). "Development and prevention of advanced diabetic nephropathy in RAGE-overexpressing mice." J Clin Invest **108**(2): 261-268.
- Yan, S. D., A. M. Schmidt, et al. (1994). "Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins." J Biol Chem **269**(13): 9889-9897.
- Yeh, C. H., L. Sturgis, et al. (2001). "Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor-kappaB transcriptional activation and cytokine secretion." Diabetes **50**(6): 1495-1504.

Yndestad, A., L. Landro, et al. (2009). "Increased systemic and myocardial expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in clinical and experimental heart failure." Eur Heart J **30**(10): 1229-1236.

Yonekura, H., Y. Yamamoto, et al. (2003). "Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury." Biochem J **370**(Pt 3): 1097-1109.

Yonekura, H., Y. Yamamoto, et al. (2005). "Roles of the receptor for advanced glycation endproducts in diabetes-induced vascular injury." J Pharmacol Sci **97**(3): 305-311.

Zieman, S. J. and D. A. Kass (2004). "Advanced glycation endproduct crosslinking in the cardiovascular system: potential therapeutic target for cardiovascular disease." Drugs **64**(5): 459-470.

Zieman, S. J., V. Melenovsky, et al. (2005). "Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(5): 932-943.

8. Thesen

1. Eine Hochfetterernährung führt zu einer vermehrten Akkumulation von AGEs.
2. Unter Hochfetterernährung über einen Zeitraum von 7 Monaten kommt es bei Wildtypmäusen zu einer deutlichen Gewichtszunahme.
3. Die Hochfetterernährung führt zu morphologischen Veränderungen im Bereich der Aorten-klappe und zu deutlichen linksventrikulären Veränderungen.
4. Wildtypmäuse unter Hochfetterernährung über 7 Monate zeigen histologische und immunohistochemische Veränderungen am Herzen und der Aortenklappe.
5. Die beschriebenen Veränderungen entsprechen dem Bild einer Aortenklappenstenose.
6. Das nicht Vorhandensein des AGE Rezeptors RAGE führte bei RAGE KO Mäusen unter einer Hochfett-diät auch zu einer Gewichtszunahme.
7. RAGE KO Mäuse sind aber gegen die Entwicklung von Aortenklappen- und kardialen Veränderungen weitestgehend geschützt.
8. Ein besseres HDL/LDL Verhältnis bei RAGE KO Tieren und eine durch den Mangel an RAGE Rezeptoren verminderte Entzündungsreaktion wirkt sich hier möglicherweise protektiv aus.

9. Anhang

Gewichtstabellen

Maus	Typ	Gewicht [g]										
		Woche 0 08.12.2008	Woche 1 15.12.2008	Woche 2 22.12.2008	Woche 3 29.12.2008	Woche 4 05.01.2009	Woche 5 12.01.2009	Woche 6 19.01.2009	Woche 7 26.01.2009	Woche 8 02.02.2009	Woche 9 09.02.2009	Woche 10 16.02.2009
Maus 1	WT ND	30	30,1	31,8	31,4	31,4	31,2	31	30,7	32,1	32,2	33,2
Maus 2	"	30,4	31,7	33,3	33,6	33,3	33,4	32,1	33,6	32,8	32,7	33,7
Maus 3	"	29,4	29,8	30,2	30,1	30,7	30	30,3	29,8	29,8	30	30,6
Maus 4 (re)	"	26,8	27,5	28,8	29,2	29,4	29	29	28,7	29	29,6	30,8
Maus 5	"	31,7	31,2	32,5	32,6	33	32,3	30,9	31,7	31,5	31,9	33,7
Maus 6 (re)	"	28,7	29	29,8	29,7	29,3	28,7	29,6	31,1	30,4	31,9	32,9
Maus 75	"	31,4	32	32,3	35,3	34,9	34,1	35	35	34	34,2	33,4
Maus 76	"	32,7	32,7	32,9	32,8	33,5	34,8	34,4	34,4	34,4	33,2	33,1
Maus 7	WT HFD	29,5	36,1	40,4	44,3	46,7	47,1	48,1	49,8	50,1	50,6	50
Maus 8 (re)	"	31,1	38,5	42,2	45,6	48,1	48,5	49	51	50,8	51,7	50,5
Maus 9 (li)	"	29	35,3	38,7	40,2	42	42,2	42,7	43,8	46,2	47,9	47,2
Maus 10	"	31,8	39,8	43,1	46	48,5	49,1	50,3	50,5	50,7	50,7	50,3
Maus 11 (re)	"	24,9	29,9	31,9	34,2	35,7	36,2	36,7	38,7	40,6	42	43,3
Maus 12 (li)	"	25	31,9	36,7	39,2	41,6	42,8	43,7	45	47	47,7	47,6
Maus 77	"	25	31,5	36,5	38,9	(+)						
Maus 13	RAGEKO ND	32,7	31,9	33,3	34,8	35	35,4	34,6	35,2	35,7	35,8	35,4
Maus 14 (re)	"	32,6	34,6	35,1	37	36,1	35	34,4	34,9	35,8	35,1	34,9
Maus 15 (li)	"	34,6	36,8	37,6	38,3	38,1	36,7	35,3	36,1	36,9	36,5	37,4
Maus 16 (re-li)	"	30,5	30,8	31,5	32,2	32,2	31,6	31,9	32,2	32,5	33,3	32
Maus 17	"	35	33,5	35	36,8	36,4	34,7	34,8	36,4	36	36,8	37,9
Maus 18 (re)	"	32,3	34	36,1	35,1	36,4	35,9	37,3	38,4	38,4	38,5	38,6
Maus 70	"	27,5	28,3	29,1	29,5	29,2	29,5	29,2	29	29,1	29,7	31,7
Maus 19 (li)	RAGEKO HFD	32,4	40	43,3	45,6	47,1	47,4	47,4	49,6	49,5	50,3	(+09.02.09)
Maus 20 (re-li)	"	32,3	38,7	42,4	45	46,9	47	48,4	50,6	47,5	50,1	51,3
Maus 21	"	29,1	35,4	37,8	40,4	41,9	42,1	43	43,7	44,7	44,7	42,5
Maus 22 (re)	"	32,9	36,9	40,4	43,6	44,5	45,5	46,4	46,2	47,1	47,7	47,2
Maus 23 (li)	"	27,3	32,5	35,1	37,7	39,7	40	41,2	42,7	44,5	(+08.02.09)	
Maus 24 (re-li)	"	30,8	35,2	35,9	38,5	40,5	41,9	42,4	44,1	46,5	46	44,7
Maus 69	"	30,1	33,9	37,9	38	37,8	39,8	40,5	42,8	44,7	45,4	46,9
Maus 71	"	31,2	34	36,7	36,9	36,4	37,7	38,9	38,5	41,2	42,2	42,9
Maus 72	"	29,3	32,9	38,2	37,2	36,9	39,6	40,1	40,6	42,7	44	45,5
Maus 73	"	28,5	32	33,8	(+19.07.09)							
Maus 74	"	27,1	31	31,6	31,6	31,5	33,5	34,6	35,8	36,1	37,9	38,6

Maus	Woche 11	Woche 12	Woche 13	Woche 14	Woche 15	Woche 16	Woche 17	Woche 18	Woche 19	Woche 20	Woche 21	Woche 22
	23.02.2009	02.03.2009	09.02.2009	16.02.2009	23.03.2009	30.03.2009	06.04.2009	13.04.2009	20.04.2009	27.04.2009	04.05.2009	11.05.2009
Maus 1	33	31,8	32,7	32,5	32,9	32,1	32,6	33,8	34,1	32,2	32,8	32,7
Maus 2	33,8	32,8	34,3	33,7	32,8	30,8	31,5	31,7	31,1	30,5	32,3	30,8
Maus 3	31,4	30,3	32	31,3	30,8	31,9	33,4	33,9	32,9	32,4	30,8	30
Maus 4 (re)	30,2	28,6	30	27,9	26,9	28,3	30,8	30,3	31	30,7	31,1	30,9
Maus 5	34,3	33	34	34	34,1	33,6	35,1	35,2	35,8	35,2	35,4	35
Maus 6 (re)	33,6	32,4	33,6	32,2	32,8	33	34,7	34,7	35,5	34,5	35,2	34,1
Maus 75	32,9	31,2	32,2	31,7	31,5	32	31,9	31,6	33,1	33,3	33,5	33,9
Maus 76	33,5	31,9	32,8	32,4	32,2	32	34	35,2	35,6	35,2	35,3	35
Maus 7	49,6	49,6	48,9	49,7	48,9	49,5	50,1	50,6	50,7	51,5	51,9	51,3
Maus 8 (re)	51,6	51	50,4	51,8	50,5	50,6	51,4	51,5	51,4	52,2	53,1	52,6
Maus 9 (li)	46	46,7	46,7	48,3	48,1	46,8	48	48,6	48,4	48,6	49,1	48,5
Maus 10	50,4	49,5	49	50,1	49	48,7	49,4	49,7	50,2	50,5	50	51,3
Maus 11 (re)	44,7	44	44,9	44,8	46,5	46,7	46,9	48	47,7	48,9	49,9	49,5
Maus 12 (li)	47,6	46,5	45,6	46,7	47,2	46,9	47	47,5	47,3	47,7	47,7	48
Maus 77												
Maus 13	36,4	36,6	37,2	38	36,9	36,2	37,6	38	37,7	36,7	36,4	36,2
Maus 14 (re)	35,5	35,6	36	34,3	33,5	33,7	34,5	34,7	34,9	34,4	34,1	34,5
Maus 15 (li)	38,2	37,1	38,1	38,7	37	36,4	37,8	38,3	37,8	37,8	37,3	37,7
Maus 16 (re,li)	32,6	33,8	34,7	35,3	34,4	34,3	34,7	36	35,8	35	34,4	34,6
Maus 17	38,8	37,6	38,5	37,6	38,2	37,6	38,8	39,7	39,9	39,3	40,6	39,3
Maus 18 (re)	40	38,8	40,6	39,9	39,7	39	41,3	41,3	41,1	40,7	42,1	40,7
Maus 70	31,9	31	31,6	31,6	31,6	31,3	30,9	30,8	30,9	32,1	31,7	31,3
Maus 19 (li)												
Maus 20 (re,li)	52	52,4	53,5	54,3	53,6	54,3	55,3	55,6	54	55,1	56,2	56,4
Maus 21	43,7	43,3	43,3	43,3	43,7	43,5	43,5	43,2	44,5	44	44,6	44,4
Maus 22 (re)	48	47,4	48,3	47,3	48,7	48	47,6	46,4	47,5	48,9	50	49,9
Maus 23 (li)												
Maus 24 (re,li)	45,5	44	44,7	45,5	45,2	45	44,9	44,2	44,8	45,4	45,6	45,2
Maus 69	46,7	47,4	47,5	47,5	48,3	48,6	(+123.10.09)					
Maus 71	43,2	43,6	44,3	44,3	42,2	43,3	40,6	41,6	43,8	44,8	45	44
Maus 72	46,3	46,5	46,6	46,6	47	47,2	43,2	43	41	42,4	43,6	44,5
Maus 73												
Maus 74	38	39,5	41,7	41,7	42	42	42,6	43,2	42,9	43,1	43,9	44,9
	14.09.2009	21.09.2009	28.09.2009	05.10.2009	12.10.2009	19.10.2009	26.10.2009	02.11.2009	09.11.2009	16.11.2009	23.11.2009	30.11.2009

Maus	Woche 23	Woche 24	Woche 25	Woche 26	Woche 27	Woche 28	Woche 29	Woche 30	Woche 31
Maus 1	18.05.2009	25.05.2009	02.06.2009	08.06.2009	15.06.2009	22.06.2009	29.06.2009	06.07.2009	13.07.2009
Maus 2	32,4	34,8	34,2	33,6	33,6	34,6	35,2	37,3	36,3
Maus 3	32	35,1	34,8	34,3	34,4	34,5	34,5	34,8	35,2
Maus 4 (re)	30,5	34,4	34,1	34,1	34	34,8	35,3	38	36,4
Maus 5	30,6	33,6	33,3	33,4	32,5	32,4	33,6	35,1	34
Maus 6 (re)	34,6	38,7	39,5	39,3	38,7	37	37,4	38	39,2
Maus 7	34	36,5	36,5	35,5	36	36	35,7	37	36,3
Maus 8 (re)	34,5	34,9	34,5	34	33	32,2		32,8	32,2
Maus 9 (li)	35,1	35,1	35,2	35,4	35,5	35,4		35	34,7
Maus 10	51,7	51,7	53	52,8	51,2	52	51	51,6	53,5
Maus 11 (re)	52,7	52,4	54,1	54,2	53,8	54,8	54,5	54,8	56,3
Maus 12 (li)	48,8	47,9	49,7	49,1	48	48,6	47,9	48,7	49,6
Maus 13	49,8	52,8	53,3	53	52,1	52	51,9	51,5	50,7
Maus 14 (re)	48,9	51,4	52,5	52,8	51,9	52,2	51,4	52	53,9
Maus 15 (li)	47,8	49,4	48,7	49	49,1	49,2	49,3	49,3	49,7
Maus 16 (re,li)									
Maus 17	35	37,9	37,5	36,1	35,4	37,5	36,9	37,9	38,8
Maus 18 (re)	34,5	36,6	35,8	34,5	35,6	36,1	36,4	37,5	38
Maus 19 (li)	37,4	39,3	39,7	38,7	40,7	41,5	41,4	42,9	43
Maus 20 (re,li)	34,7	35,7	35	35	36	36,1	35,4	36,5	36,7
Maus 21	39,1	40,8	40,9	40,7	41,4	41,2	40,7	41,6	42,2
Maus 22 (re)	40,8	43,5	42,7	40	43,4	42,9	42,7	43,6	44,4
Maus 23 (li)	31,1	32,3	34,5	34,3	34,7	35	35,4	35,8	36,1
Maus 24 (re,li)									
Maus 25	56	57,6	57,9	58,4	57,7	54,3	(+129.06.09)		
Maus 26	44,1	45	45,1	44,9	44,5	45,1	43,9	44	45,1
Maus 27 (re)	49,6	50,7	50,1	49,5	48,9	49,1	49,2	50,1	51,5
Maus 28 (li)									
Maus 29	45,1	45,7	43,8	43,4	41,5	43,2	42,1	43,1	44,6
Maus 30									
Maus 31	44,9	46,4	46,8	45,8	46	45,8	46,3	46,3	46,5
Maus 32	45,5	46,5	46,9	46,8	46,8	46,8	46,9	46,9	46,9
Maus 33									
Maus 34	43	44,5	47,1	47,3	47,9	48,3	49	49,5	49,9
Maus 35	07.12.2009	14.12.2009	21.12.2009	28.12.2009	04.01.2010	11.01.2010	18.01.2010	25.01.2010	01.02.2010

CW-Dopplermessungen

Maus	Typ	Transvalvuläre systolische Geschwindigkeit (cm/s)			
		1	9	18	31
		08.12.2008	08.02.2009	18.04.2009	16.07.2009
Maus 1	WT-ND	83,6	83,8	86,4	87,8
Maus 2	"	86,2	86,9	91,9	91,8
Maus 3	"	83,2	86,9	86,3	85,8
Maus 4 (re)	"	85,8	88,5	89,4	89,2
Maus 5	"	85,7	89,2	89,6	
Maus 6 (re)	"	83,1	85,2	85,3	85,2
Maus 75	"	82,2	83,1	82,5	85,2
Maus 76	"	82,5	85,5	86,5	87,8
Maus 7	WT-HFD	83,1	92,3	95,6	103
Maus 8 (re)	"	85,8	89,1	93,1	107
Maus 9 (li)	"	85,2	91,7	95,1	105
Maus 10	"	85	94,4	96,9	104
Maus 11 (re)	"	84,5	94,6	98,2	107
Maus 12 (li)	"	84,8	93,1	96,9	108
Maus 13	RAGEKO-ND	85,5	85,6	86,5	85,2
Maus 14 (re)	"	83,1	86,8	87,9	91,8
Maus 15 (li)	"	84,1	84,3	86,3	89,2
Maus 16 (re,li)	"	83,1	88,5	89,9	89,2
Maus 17	"	84,5	87,7	89,4	91,2
Maus 18 (re)	"	85,5	88,5	93,1	93,1
Maus 70	"	85,8	86,8	87,2	89,2
Maus 19 (li)	RAGEKO-HFD	83,4	87,6		
Maus 20 (re,li)	"	83,3	87,5	94,4	
Maus 21	"	84,7	86,1	91,9	99,8
Maus 22 (re)	"	83,4	86,1	96,9	100
Maus 23 (li)	"	84,9			
Maus 24 (re,li)	"	84,6	88,6	89,3	93,5
Maus 69	"	85	92,8		
Maus 71	"	82,5	83,8	90,5	98,1
Maus 72	"	83,2	85,2	87,8	99,2
Maus 73	"	83,8			
Maus 74	"	85,2	87,8	89,2	93,1

Morphologische Messungen

Maus	Typ	Ventrikel				Aortenklappe	
		LV-Fläche(mm ²)	LV-Dicke(mm)	Septum-Dicke(mm)	RV-Dicke(mm)	Taschen(µm)	Fläche(mm ²)
Maus 1	WT-ND	2,13	1,07	0,83	0,55	21,67	0,23
Maus 2	"	2,15	1,00	0,85	0,47	22,47	0,25
Maus 3	"	2,32	0,91	0,84	0,69	24,86	0,24
Maus 4	"	2,22	1,04	0,84	0,53	23,94	0,26
Maus 6	"	2,16	1,06	0,89	0,56	24,83	0,29
Maus 75	"	2,19	0,93	0,89	0,57	23,49	0,29
Maus 76	"	2,29	1,05	0,86	0,38	23,04	0,30
Maus 7	WT-HFD	1,43	1,35	1,03	0,63	32,18	0,17
Maus 8	"	1,60	1,14	0,98	0,49	35,32	0,18
Maus 9	"	1,59	1,18	0,97	0,41	34,90	0,16
Maus 10	"	1,60	1,27	0,93	0,77	32,77	0,17
Maus 11	"	1,65	1,14	1,04	0,57	37,53	0,16
Maus 12	"	1,46	1,20	1,07	0,74	35,61	0,15
Maus 14	RAGEKO-ND	2,00	1,09	0,88	0,72	15,58	0,27
Maus 15	"	2,42	1,10	0,84	0,59	16,97	0,24
Maus 16	"	2,25	1,06	0,81	0,39	21,67	0,23
Maus 17	"	2,20	0,94	0,81	0,57	19,89	0,25
Maus 18	"	1,99	0,96	0,86	0,48	19,67	0,22
Maus 70	"	2,19	0,94	0,85	0,38	18,66	0,24
Maus 21	RAGEKO-HFD	1,98	1,14	0,93	0,50	21,59	0,27
Maus 22	"	2,02	1,27	0,89	0,62	22,45	0,27
Maus 24	"	2,13	1,21	0,89	0,57	23,68	0,32
Maus 71	"	2,05	1,12	0,87	0,44	21,71	0,21
Maus 72	"	2,27	1,26	0,83	0,51	20,73	0,20
Maus 74	"	1,99	1,12	0,85	0,60	19,16	0,21

Bestimmung von Cholesterin, Triglyzeriden, HDL und LDL aus dem Plasma

Maus	Typ	Plasma			
		Chol	TG	HDL	LDL
Maus 1	WT-ND	1,54	0,58	1,63	0,28
Maus 2	"	1,64	0,47	1,73	0,21
Maus 3	"	1,43	0,55	1,41	0,2
Maus 4	"	1,38	1,09	1,41	0,18
Maus 6	"	1,25	0,5	1,16	0,21
Maus 75	"	1,75	0,89	1,76	0,16
Maus 76	"	1,44	0,76	1,2	0,19
Maus 7	WT-HFD	3,4	1,01	3,24	0,45
Maus 8	"	3,57	0,88	3,26	0,52
Maus 9	"	3,25	1,23	3,21	0,53
Maus 10	"	3,62	1,35	3,56	0,43
Maus 11	"	3,6	1,61	2,89	0,38
Maus 12	"	3,56	0,8	3,42	0,46
Maus 14	RAGEKO-ND	1,98	0,46	1,77	0,21
Maus 15	"	1,48	0,9	2,3	0,28
Maus 16	"	1,65	0,56	1,64	0,16
Maus 17	"	2,18	0,99	2,09	0,26
Maus 18	"	1,66	0,31	1,85	0,17
Maus 70	"	2,15	1,19	1,94	0,21
Maus 21	RAGEKO-HFD	2,81	1,1	2,84	0,21
Maus 22	"	3,15	1,34	3,08	0,31
Maus 24	"	2,56	1,73	2,53	0,25
Maus 71	"	2,62	2,02	2,63	0,3
Maus 72	"	2,68	1,93	2,69	0,21
Maus 74	"	2,89	1,08	3,16	0,34

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Yuliana Yakobus
Anschrift: Barfüßerstrasse 1
06108 Halle (Saale)
Geburtsdatum: 18.07.1977
Geburtsort: Pekanbaru-Indonesien
Staatsangehörigkeit: Indonesisch

Schulischer Werdegang

1983 bis 1989 Grundschule an der Cendana, Pekanbaru-Indonesien
1989 bis 1992 Mittelschule an der Cendana, Pekanbaru-Indonesien
1992 bis 1995 Oberschule an der Cendana, Pekanbaru-Indonesien

Studium

1995 bis 2002 Studium der Humanmedizin an der Trisakti Universität, Jakarta, Indonesien

Beruflicher Werdegang

2002 bis 2003 Deutsch Sprachkurs am Goethe Institut in Jakarta
2003 bis 2004 Tätigkeit bei einem pharmazeutischen Konzern in Jakarta
2004 bis 2007 Ärztin in Weiterbildung zum Facharzt für Herzchirurgie am Georg-August Universitätsklinikum Göttingen
2007 bis 2013 Ärztin in Weiterbildung zum Facharzt für Herzchirurgie in Universitätsklinikum Halle
04.02.2009 Prüfung zur abschließenden Feststellung der Gleichwertigkeit des Kenntnisstandes bei der Ärztekammer Sachsen-Anhalt
23.01.2013 Facharztprüfung für Herzchirurgie bei der Ärztekammer Sachsen-Anhalt
Seit 2013 Fachärztin für Herzchirurgie im Universitätsklinikum Halle

Selbstständigkeitserklärung

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.

Yuliana Yakobus

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich das Promotionsverfahren an keiner anderen Universität eröffnet oder beantragt habe.

Frühere Promotionsversuche sind nicht unternommen worden.

Yuliana Yakobus

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Andreas Simm für die Vergabe und die Betreuung meiner Promotion bedanken.

Des Weiteren bedanke ich mich herzlich bei Frau Dr. med. Britt Hofmann und Herrn Dr. Norbert Nass für die praktische Betreuung meiner Promotion sowie für das immer offene Ohr für meine Fragen.

Meinem Klinikdirektor Herrn Prof. Silber danke ich für die Unterstützung und die Möglichkeit, die Promotion in der Forschungsabteilung der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie durchführen zu können.

Mein Dank gilt auch Alexander Navarrete-Santos, zu dem ich jederzeit mit allen Fragen kommen konnte und der sie bereitwillig beantwortet hat.

Außerdem möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Institutes für Anatomie für ihre bereitwillige Unterstützung bedanken.

Auch allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern der Klinik sowie Doktoranden und Diplomanten im Labor möchte ich für die Unterstützung danken.

Zu guter Letzt geht ein ganz großes Dankeschön an meine Familie und Freunde, die mich immer wieder motiviert haben durchzuhalten und stets Interesse an meiner Arbeit gezeigt haben.