

Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften
(Direktor: Prof. Dr. R. Jahn)
der
Naturwissenschaftlichen Fakultät III
(Dekan: Prof. Dr. P. Wycisk)
der
Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

**„Einfluss von diätetisch verabreichten
Advanced Glycation Endproducts
auf oxidativen Stress im Herz-Kreislaufsystem“**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Trophologie (Dr. troph.)

vorgelegt von

Diplom-Ernährungswissenschaftlerin Beatrice Leuner

geb. am 18.05.1983 in Sebnitz

Gutachter: 1. Prof. Dr. Gabriele Stangl
2. Prof. Dr. Andreas Simm
3. Prof. Dr. Veronika Somoza

Verteidigung am: 7.2.2011

Halle (Saale) 2010

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	1-12
1.1. Advanced Glycation Endproducts	1
1.2. Resorption, Metabolisierung, Ausscheidung	3
1.3. Wirkungen von AGEs	5
1.4. Pathophysiologische Bedeutung der AGEs	7
1.5. Mögliche protektive Wirkungen von AGEs	9
1.6. AGE-Inhibitoren	9
1.7. Zielsetzung	10
2. Material und Methoden	13-32
2.1. Chemikalien	13
2.2. Versuch 1	15
2.3. Versuch 2	17
2.4. Versuch 3	18
2.5. Versuch 4	19
2.6. RNA-Analytik	20
2.6.1. RNA-Isolation	20
2.6.2. Reverse Transkription	21
2.6.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)	21
2.7. Proteinanalytik	24
2.7.1. Proteinisolation	24
2.7.2. SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE)	25
2.7.3. Western Blot	26
2.7.4. Dotblot	28
2.7.5. Oxiblot	28
2.8. Bestimmung der Triglyzeridkonzentration	29
2.9. Bestimmung der Cholesterinkonzentration	29
2.10. Bestimmung der Insulinkonzentration	30
2.11. Autofluoreszenzmessung von Glykierungsprodukten	30
2.12. Immunohistochemie	31
2.13. Statistische Auswertung	31

3. Ergebnisse	33-78
3.1. Charakterisierung von Kaffee und Brotkruste auf vorhandene AGE-Modifikationen	33
3.2. Charakterisierung der C57Bl/6- und RAGE-KO-Mäuse bezüglich der zu analysierenden Parameter	34
3.2.1. Oxidative Stressparameter	34
3.2.2. AGE-spezifische Fluoreszenz in Serum und Herz	35
3.2.3. AGE-Modifikationen in Serum und Herz	36
3.2.4. kardiale mRNA-Expression spezifischer AGE-Rezeptoren, Hypertrophie-, Fibrose-, Inflammationsmarker	36
3.3. Genotypunabhängige Effekte der Diäten	37
3.3.1. Kaffee	38
3.3.2. Brotkruste	38
3.3.3. Fettreiche Diät	39
3.4. Altersabhängige Unterschiede in den zu analysierenden Parametern	40
3.5. Einfluss von diätetisch verabreichten AGEs auf oxidativen Stress und AGE-Modifikationen im Herzkreislaufsystem von C57Bl/6- und RAGE-KO-Mäusen	41
3.5.1. Einfluss von diätetisch verabreichtem Kaffee	41
3.5.1.1. Gewichtsverlauf und Futteraufnahme	41
3.5.1.2. Oxidative Stressparameter	42
3.5.1.3. AGE-spezifische Fluoreszenz im Serum	44
3.5.1.4. AGE-Modifikationen in Serum und Herz	45
3.5.1.5. Kardiale mRNA-Expression spezifischer AGE-Rezeptoren, Hypertrophie-, Fibrose- und Inflammationsmarker	47
3.5.2. Einfluss von diätetisch verabreichter Brotkruste	49
3.5.2.1. Gewichtsverlauf und Blutzuckerspiegel	49
3.5.2.2. Oxidative Stressparameter	50
3.5.2.3. AGE-spezifische Fluoreszenz in Serum und Herz	53
3.5.2.4. Immunohistochemischer Nachweis von Carboxymethyllysine (CML) im Herzgewebe von C57Bl/6-Mäusen nach dreitägiger Brotkrustenfütterung	55
3.5.2.5. AGE-Modifikationen in Serum und Herz	55

3.5.2.6. Kardiale mRNA-Expression spezifischer AGE-Rezeptoren, Hypertrophie-, Fibrose- und Inflammationsmarker	59
3.5.3. Einfluss einer fettreichen Diät	62
3.5.3.1. Gewichtsverlauf, Organgewichte, Blutzucker, Insulin, Cholesterin und Triglyzeride (TG)	62
3.5.3.2. Oxidative Stressparameter	64
3.5.3.3. AGE-spezifische Fluoreszenz in Serum und Herz	65
3.5.3.4. AGE-Modifikationen in Serum und Herz	66
3.5.3.5. Kardiale mRNA-Expression spezifischer AGE-Rezeptoren, Hypertrophie-, Fibrose- und Inflammationsmarker	69
3.6. Einfluss von Laufradtraining auf den AGE-Gehalt in alten C57Bl/6- und RAGE-KO-Mäusen	70
3.6.1. Gewichtsentwicklung und Laufverhalten	71
3.6.2. Oxidative Stressparameter	72
3.6.3. AGE-spezifische Fluoreszenz in Serum und Herz	74
3.6.4. AGE-Modifikationen in Serum und Herz	75
3.6.5. Kardiale mRNA-Expression spezifischer AGE- Rezeptoren, Hypertrophie-, Fibrose- und Inflammationsmarker	77
4. Diskussion	79-97
4.1. Charakterisierung der C57Bl/6- und RAGE-KO-Mäuse bezüglich der zu analysierenden Parameter	79
4.2. Altersassoziierte Veränderungen der zu analysierenden Parameter	81
4.3. Einfluss von diätetisch verabreichtem Kaffee auf oxidativen Stress und AGE-Modifikationen im Herzkreislaufsystem	83
4.4. Einfluss von diätetisch verabreichter Brotkruste auf oxidativen Stress und AGE-Modifikationen im Herzkreislaufsystem	86
4.5. Einfluss einer fettreichen Diät auf oxidativen Stress und AGE-Modifikationen im Herzkreislaufsystem	89
4.6. Einfluss von Laufradtraining auf oxidativen Stress und AGE-Modifikationen im Herzkreislaufsystem von alten C57Bl/6- und RAGE-KO-Mäusen	94

5.	Zusammenfassung/Summary	98-101
6.	Literaturverzeichnis	102-114
7.	Anhang	115-124

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AGE	Advanced Glycation Endproduct
AGE-R	AGE-Rezeptor
ALE	Advanced lipid peroxidation endproducts
ANF	atrialer natriuretischer Faktor
APS	Ammoniumpersulfat
Arg-Pyrimidin	Arginin-Pyrimidin
BCA	Bichinonsäure
BSA	bovine serum albumin
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure
cDNA	complementary DNA
CEL	Carboxyethyllysine
CHE	Cholesterinesterase
CHO	Cholesterinoxidase
CML	Carboxymethyllysine
DEPC	Diethylpyrocarbonat
3-DG	3-Desoxyglucoson
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ecSOD	extrazelluläre SOD
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FE	relative Fluoreszenzeinheiten
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GK	Glycerokinase
GPO	Glycerin-3-phosphatoxidase
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCL	Chlorwasserstoff
HDL	high density lipoprotein
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HNE	4-Hydroxy-2-nonenal
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm

Abkürzungsverzeichnis

LDL	low density lipoprotein
LPL	Lipoproteinlipase
MDA	Malondialdehyd
MHC	Myosin heavy chain
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
MUFA	einfach ungesättigte Fettsäuren
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukloetidphosphat
Na ₃ VO ₄	Natriumvanadat
NF-κB	nuclear factor κB
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamidelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline (phosphate-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEPT 1	Peptidtransporter 1
POD	Peroxidase
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäuren
PVDF	Polyvinylfluorid
RAGE	receptor for advanced glycation endproducts
RAGE-KO	RAGE knockout
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
Rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodesulfat
SEM	Standardfehler
SFA	gesättigte Fettsäuren
SOD	Superoxiddismutase
sRAGE	soluble RAGE
Srb1	Scavenger Rezeptor 1

Abkürzungsverzeichnis

Tab.	Tabelle
TG	Triglyceride
TGF- β	transforming growth factor β
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tpm1	Tropomyosin 1
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1. Advanced Glycation Endproducts

Bei „Advanced Glycation Endproducts“ (AGEs) handelt es sich um Glykierungsendprodukte, die während der so genannten Maillardreaktion gebildet werden. Diese wurde zum ersten Mal im Jahre 1912 vom französischen Biochemiker Louis Maillard als komplexer chemischer Prozess beschrieben, bei dem Zucker und Eiweißmoleküle miteinander reagieren. Die Maillardreaktion ist eine nicht-enzymatische Reaktion, die sich in 3 Phasen einteilen lässt (Abb.1.1).

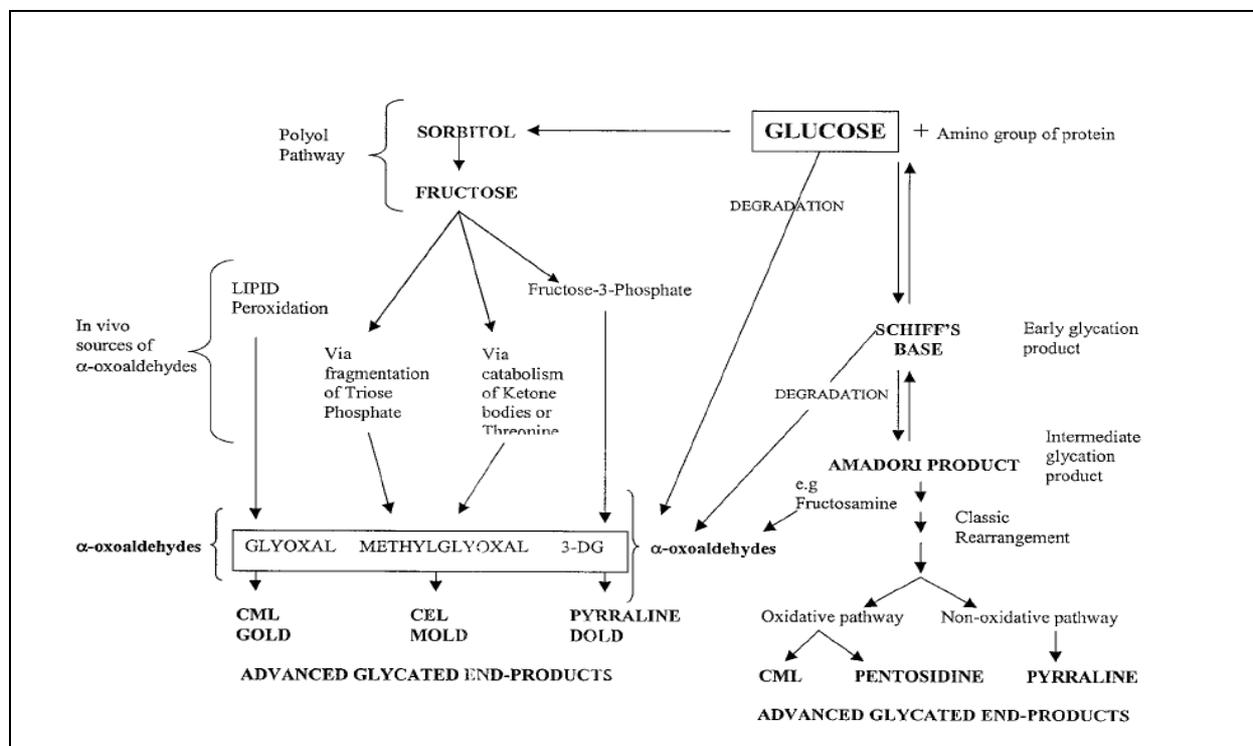


Abb.1.1.: Darstellung der Bildung von Advanced Glycation Endproducts (AGEs) durch nicht-enzymatische Glykierung, entnommen aus Singh R. et al. (1)

In der ersten frühen Phase erfolgt durch Kondensation zwischen der Carbonylgruppe eines reduzierenden Zuckers wie Glukose oder Fruktose und der Aminogruppe von Proteinen, Fetten oder Nukleinsäuren die Bildung einer Schiff'schen Base mit anschließender Umlagerung zum Amadoriprodukt. In einer zweiten Phase kommt es durch Degradierungsreaktionen oder Rearrangements zur Bildung von reaktiven Carbonylen, wie Ketoaldehyden und Dicarbonylen (z.B. Glyoxal und Methylglyoxal). Die Carbonyle reagieren in einem letzten Schritt mit Aminogruppen und bilden irreversible Melanoidine oder Advanced Glycation Endproducts (AGEs) (2,3). Diese zeigen eine charakteristisch braune

Farbe. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften können AGEs in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Man unterscheidet u.a. zwischen fluoreszierenden (Arg-pyrimidin, Imidazolone), nicht-fluoreszierenden (CML, CEL) sowie quervernetzenden AGEs (Pentosidin) (4). AGEs können neben der Glykierungsreaktion auch durch Oxidation von Fetten gebildet werden. So konnte gezeigt werden, dass bei der Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) CML gebildet werden kann (5).

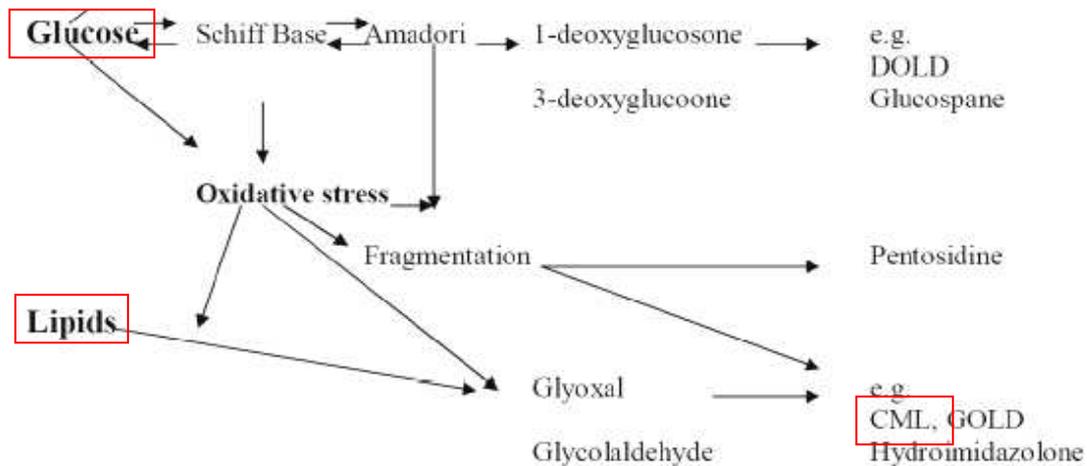


Abb.1.2.: vereinfachte schematische Darstellung der Bildung von CML aus Glukose und durch Oxidation von Lipiden, entnommen aus Meerwaldt et al. (6)

Bei der Lipidperoxidation von PUFAs entstehen eine Reihe von reaktiven Lipidperoxidationsprodukten wie Ketone, Aldehyde und Dicarbonyle (Glyoxal, Methylglyoxal). So führt beispielsweise die Oxidation von n-6-PUFAs wie Linolsäure und Arachidonsäure zur Bildung von reaktiven 4-Hydroxynonenal (4-HNE) (7). Diese reaktiven Produkte interagieren bevorzugt mit Lysine-, Histidin- und Cysteinresten von zellulären und Gewebeproteinen, was zur Bildung von Advanced Lipid Peroxidationsprodukten (ALEs) führt. Diese wiederum induzieren Proteindysfunktionen und führen zu einer veränderten zellulären Antwort (8).

Die Bildung von AGEs findet fortlaufend in unserem Körper statt. Da die Reaktion unter anderem in Abhängigkeit von der Temperatur und dem Gehalt an Zucker abläuft, verläuft sie im gesunden Organismus bei 37°C Körpertemperatur relativ langsam. Da AGEs jedoch irreversibel gebildet und der Abbau so modifizierter Proteine verlangsamt ist, kommt es zu einer allmählichen Anreicherung der Glykierungsendprodukte mit steigendem Alter, vor allem in Geweben mit Proteinen, die eine lange Halbwertszeit besitzen. So konnten altersabhängige Ablagerung von AGEs in humanen Knorpelgewebe, Kollagen oder auch Linsenprotein gezeigt werden (3, 9, 10, 11). Daneben kann es bei pathologischen Zuständen

zu einer überdurchschnittlich schnellen Anreicherung von AGEs im Organismus kommen. Im Falle des Diabetes mellitus führen krankhaft erhöhte Zuckerwerte schon in jungen Jahren zu einer übermäßigen endogenen Bildung und Anreicherung (12). Auch eine eingeschränkte Nierenfunktion, wie im Falle der Nephropatie, kann aufgrund der reduzierten *Clearance* zu einem verstärkten Anstieg der AGE-Gehalte im Serum und Organen führen.

Nicht nur endogen werden AGEs gebildet, auch die Nahrung sowie das Rauchen stellen Quellen für die AGE-Akkumulation im Körper dar (12). In Abhängigkeit von Zusammensetzung, Feuchtigkeitsgehalt und pH-Wert sowie Dauer und Art der Hitzeeinwirkung entstehen vergleichbare AGEs in Nahrungsmitteln (13). Vor allem Lebensmittel, die frittiert, gegrillt oder geröstet werden, enthalten große Mengen davon (2). Da aber so gut wie alle Lebensmittel Kohlenhydrate und Proteine enthalten, ist die Menge an Maillardprodukten in der Nahrung erheblich. Neben kohlenhydratreichen stellen auch kohlenhydratarme, fettreiche Lebensmittel eine wichtige Quelle für AGEs/ALEs dar. In Abb.1.3. ist der Gehalt an AGEs in einigen ausgewählten Nahrungsmitteln angegeben.

Lebensmittel	AGE-Gehalt in „units“
Cereal (GRANOLA)	193,400 u/100 g
Feinbackwaren	425,740 u/100 g
Kuchen (Berliner)	838,400 u/100 g
Entenhaut (gebraten)	6250,000 u/100 g
Ahornsirup	795 u/15 ml
Brauner Reissessig	2,100 u/15 ml
Sojasauce	8,700 u/15 ml
Soda	475 u/250 ml
Orangensaft	600 u/250 ml
Tee	2,025 u/250 ml
Kaffee	2,200 u/250 ml
Coca-Cola classic	8,500 u/250 ml
Coca-Cola Diät	9,500 u/250 ml

Abb. 1.3: Gehalt an Advanced Glycation Endproducts in Units in ausgewählten Nahrungsmitteln, AGE-Units sind definiert als mittels Elisa bestimmte Menge an Carboxymethyllysine (CML), entnommen aus Maslo R. (14)

1.2. Resorption, Metabolisierung und Ausscheidung

Die tägliche Aufnahme an AGEs schwankt zwischen 25-75mg (15). Da Advanced Glycation Endprodukte mit einer Reihe von Krankheiten assoziiert und täglich in erheblichen Mengen vor allem in den westlichen Industrieländern aufgenommen werden, gewinnt die Frage, welche Rolle Glykierungsendprodukte aus der Nahrung spielen, stark an Bedeutung.

Nach Aufnahme mit der Nahrung gelangen die AGEs über den Magen in den Dünndarm. Wie die einzelnen AGEs im Darm absorbiert werden, ist bis zum heutigen Zeitpunkt weitestgehend unklar. Bekannt ist, dass hochmolekulare Verbindungen, aufgrund der Ausbildung von so genannten Crosslinks, stärker gegen Enzyme im Verdauungstrakt resistent sind als niedermolekulare Verbindungen (1). Niedermolekulare AGEs könnten prinzipiell durch einfache Diffusion das intestinale Epithel überqueren oder durch endozytotische Prozesse aufgenommen werden. Ebenso könnten sie mit Hilfe von Transporterproteinen vom Dünndarm in den Kreislauf gelangen. Hinweise darauf lieferten kürzlich Geissler et al. (15). Sie konnten zeigen, dass in HeLa-Zellen die Peptidderivate Alaninpyrralin und Pyrralinalanin mittels des Peptidtransporters PEPT1 transportiert werden können. Allerdings konnte dies nur für die gebundene Form beobachtet werden, nicht für freies Pyrraline.

Bekannt ist auch, dass der Gehalt an AGEs im Körper durchaus über unsere Ernährung beeinflusst werden kann. Koschinsky et al. konnten in Ratten nach Fütterung einer AGE-reichen Diät zeigen, dass 10% der im Futter enthaltenen AGEs im Serum wieder zu finden sind und davon jedoch nur 40% über die Niere wieder ausgeschieden werden (16). Das zeigt, dass ein Teil der resorbierten AGEs aus der Nahrung im Körper verbleibt und somit zur Akkumulation von AGEs beiträgt. Besonders kritisch kann eine hohe Zufuhr an AGEs bei einer eingeschränkten Nierenfunktion sein, da AGEs hauptsächlich über die Niere und den Urin ausgeschieden werden.

Dass aufgenommene AGEs auch Einfluss auf Veränderungen im Körper zu scheinen haben, konnten Vlassara et al. in einer Studie mit Mäusen zeigen. Die Tiere wurden einer hoch- oder niedrig AGE-Diät mit identischem Protein- und Nährstoffgehalt ausgesetzt, wobei die Tiere mit der AGE-reichen Diät signifikante Zeichen einer Albuminurie sowie mikroskopische Anzeichen einer glomerulären Sklerose zeigten, die in der AGE-armen Diätgruppe nicht zu sehen waren (17, 18). In einer Studie von Cai et al. konnte an Mäusen gezeigt werden, dass eine Ernährung, die arm an AGEs ist, zu einer verminderten Aufnahme beitragen kann und damit sogar oxidativer Stress vermindert wird. In Rahmen dieser Langzeitstudie zeigten die Tiere mit AGE-armer Ernährung zusätzlich eine höhere Lebenserwartung (19). Weitere in vivo Hinweise für die metabolische Wirkung von diätetischen AGEs zeigen Versuche mit ApoE-defizienten Mäusen. Sie erhielten über 5 Wochen eine AGE-arme oder -reiche Diät. Nach einer Woche wurde an der femoralen Arterie eine Verletzung induziert. Am Ende der 5 Wochen zeigten die Mäuse mit AGE-armer Diät signifikant verminderte Plaquebildung mit weniger Schaumzelleinlagerung (20).

Allerdings besitzt unsere Körper auch eine Reihe von zellulären Abwehrmechanismen, die den Organismus vor einer übermäßigen Bildung und Anreicherung von AGEs schützen sollen. Dazu gehören das Glyoxalase-System (Glyoxalase I und II) sowie die Aldehyddehydrogenase, welche reaktive endogene intrazelluläre Dicarbonyle wie Glyoxal und Methylglyoxal als Vorstufen der AGE-Bildung detoxifizieren und somit die Bildung von Advanced Glycation Endprodukten verhindert (21). Bei der Glyoxalase-reaktion wird Methylglyoxal spontan an Glutathion gebunden. Das Reaktionsprodukt 2-Hydroxyacylglutathion wird dann durch die Glyoxalase II zu α -Hydroxyazid und Glutathion recycelt (4). Eine weitere Möglichkeit zur Detoxifizierung stellt die humane Fruktosamin-3-Kinase dar. Diese katalysiert die Phosphorylierungsreaktion der Fruktoselysinreste von glykierten Proteinen (21).

Die einzige Möglichkeit zur Eliminierung von AGEs ist der rezeptorvermittelte Abbau durch Gewebemakrophagen. Diese lysieren die AGEs zu niedermolekularen, löslichen Peptiden, welche über die Niere ausgeschieden werden (22,23,24).

1.3. Wirkungen von AGEs

Ursprünglich ist man davon ausgegangen, dass AGEs spezielle Markerproteine für seneszente Makromoleküle sind, um diese für den proteolytischen Abbau zu markieren (25). In den letzten Jahren stellte sich jedoch heraus, dass AGE-modifizierte Proteine verschiedenen Signaltransduktionswege aktivieren können. Bei der Wirkung von AGEs im Organismus muss jedoch zwischen rezeptorunabhängigen und rezeptorabhängigen Wirkungen unterschieden werden.

Rezeptorunabhängig wirken AGEs zum einen über die Modifizierung von Membranproteinen, Enzymen etc. und bewirken einerseits eine Strukturänderung dieser und damit deren Funktionsmodifikation bis hin zum Funktionsverlust. Andererseits können Glykierungsvorgänge zur Bildung von so genannten intermolekularen oder intramolekularen Crosslinks führen. Dabei sind vor allem Proteine mit einem langsamen *Turnover*-Rate betroffen, wie Kollagen, Elastin, Laminin etc. Infolge der Crosslink-Bildung zeigen die Proteine eine Resistenz gegenüber proteolytischer Digestion, eine verminderte Löslichkeit und erhöhte Denaturierungstemperatur (26). Außerdem können intermolekulare Kollagen-Crosslinks zu verminderter arterieller und myokardialer Compliance sowie zu erhöhter vaskulärer/myokardialer Steifheit und verminderter Elastizität der Gefäße mit anschließender kardiovaskulärer Dysfunktion führen (27,28).

Rezeptorabhängige Wirkungen von AGEs werden über die Bindung an Rezeptorproteine vermittelt. Der am ausführlichsten untersuchte Rezeptor ist der so genannte Rezeptor für Advanced Glycation End Products (RAGE). AGEs sind jedoch auch in der Lage andere Proteine wie Oligosaccharyltransferase 48 (OST- 148; AGE-Rezeptor1), 80K-H Phosphoprotein (AGE-Rezeptor 2), Galektin-3 (AGE-Rezeptor 3), Scavenger Rezeptor Klasse B (Srb1), CD36 und Lactoferrin (29, 30) zu binden.

Der RAGE-Rezeptor ist ein Mitglied der Immunglobulin Superfamilie von Zelloberflächenmolekülen. Identifiziert wurde er ursprünglich in bovinen Lungengewebe als ein AGE-Bindungsprotein (31). Mittlerweile ist bekannt, dass es sich um einen Multiligandenrezeptor handelt. Neben AGEs wurden weitere Liganden identifiziert wie S100/Calgranuline, Amphoterin (HMGB1), Amyloid β -Proteine und β -sheet Fibrillen (31,32). Der Rezeptor besitzt eine extrazelluläre Region bestehend aus einer „V“-Typ sowie zwei „C“-Typ Immunglobulindomänen. Daran anschließend befindet sich eine hydrophobe membranüberspannende Domäne gefolgt von einer kurzen cytoplasmatischen Domäne (Abb.1.4). Der Rezeptor ist lokalisiert auf Chromosom 6 nahe dem HLA Locus. Neben dem full *length* RAGE sind weitere Isoformen bekannt, deren Funktion noch nicht genau geklärt ist. Am ehesten bekannt ist die lösliche Isoform soluble RAGE (sRAGE), welche lediglich aus der extrazellulären Domäne besteht. Gebildet wird sRAGE über alternatives Splicing des RAGE-Gens (esRAGE) oder durch Abspaltung der membrangebundenen RAGE-Domäne (33, 34). sRAGE ist ebenfalls in der Lage, AGEs zu binden und konkurriert somit mit full-length RAGE um Bindungspartner. Aufgrund dessen wird sRAGE eine physiologische Rolle als kompetitiver Inhibitor der Liganden-RAGE-Interaktion zugeschrieben und somit auch die Hemmung der RAGE-vermittelten Signalwege. So konnten Bucciarelli et al. durch die Verabreichung von sRAGE in diabetischen Apo-E-Mäusen eine Verminderung von atherosklerotischen Veränderungen beobachten (35).

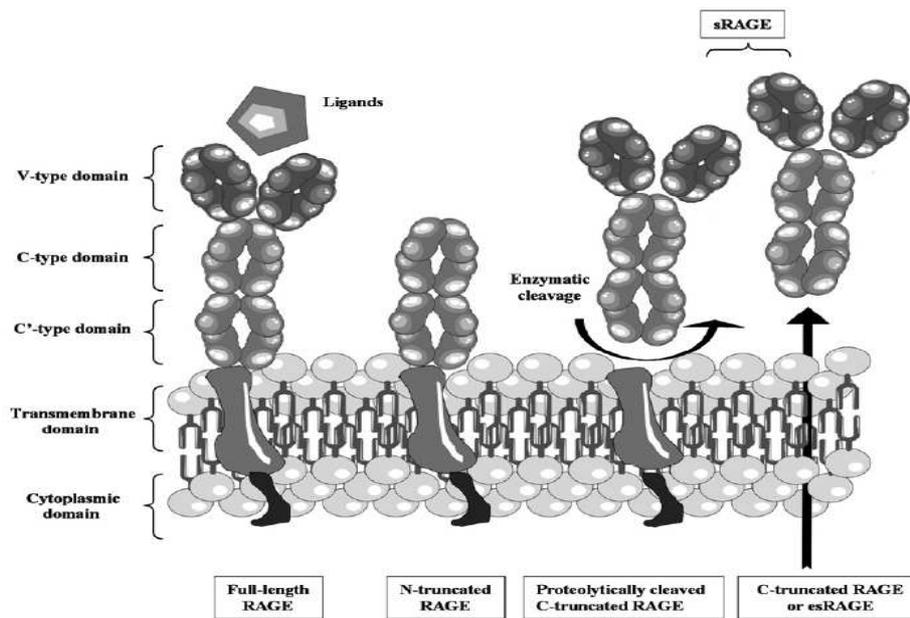


Abb. 1. 4.: Struktur von full-length RAGE und seinen Splicing-Formen. Die V-Domäne ist entscheidend für die Bindung von Liganden. Deletionen in dieser Domäne führen zur N-truncated Form, die nicht mehr binden kann. Die lösliche, C-truncated Form (sRAGE) besteht lediglich aus der extrazellulären Domäne von RAGE und ist ebenfalls in der Lage, Liganden zu binden. sRAGE entsteht durch enzymatische Abspaltung von full-length RAGE oder durch alternatives Splicen. Entnommen aus Basta G. (36)

Auf zellulärer Ebene führt die Bindung von AGEs an RAGE zum einen zu einer Aktivierung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- κ B und zur Induktion der Expression von dessen Zielgenen (IL-6, TNF- α etc.) (37). Des Weiteren führt die AGE-RAGE-Interaktion zu einer gesteigerten Bildung von ROS (38), vermutlich über die Aktivierung der NADPH-Oxidase (39). Außerdem konnte die Aktivierung zahlreicher Signaltransduktionswege nach AGE-Bindung an RAGE gezeigt werden, wie die p42/p55MAP Kinasen (40), p38 und SAPK/JNK MAP Kinasen (41) und der JAK/STAT Reaktionsweg (42). Viele 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 (43, 44).

1.4. Pathophysiologische Bedeutung der AGEs

Die Bildung von AGEs wird mit der Entstehung von zahlreichen alters- und diabetesassoziierten Erkrankungen wie Katarakt, Nephropathie, Neuropathie, Arthritis, Arteriosklerose und Morbus Alzheimer assoziiert.

So führt die AGE-Modifizierung von Crystallin, dem dominanten Protein in der Linse, zur Bildung von gelb-braunen Pigmenten, die die Transparenz der Linse bis hin zur Blindheit

(Katarakt) einschränken können (45). Weiterhin konnten immunohistologische Studien zeigen, dass AGEs in Amyloid Plaques bei der Alzheimererkrankung abgelagert werden (46). Ebenso wurden erhöhte Gehalte der AGE-Precursor Methylglyoxal und Glyoxal im Liquor von Alzheimer Patienten nachgewiesen. Hier wird diskutiert, dass die beiden Komponenten zum einen zur Bildung und somit Akkumulation von AGEs beitragen. Zum anderen zeigten sie durch Induktion von Apoptose verbunden mit vermehrter ROS-Produktion neurotoxische Wirkungen an kultivierten kortikalen Neuronen, (47). Da die Niere eine wichtige Rolle bei der Eliminierung von AGEs einnimmt, zeigten Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion erhöhte Plasma-AGE-Gehalte. Ebenso scheint der Rezeptor RAGE eine ursächliche Rolle bei der Entstehung von renalen Defekten zu haben. So konnte in RAGE-defizienten Mäusen eine Abschwächung der diabetischen Nephropathie beobachtet werden (48), wohingegen die Überexpression von RAGE im diabetischen Mausmodell zu gesteigerten renalen Schädigungen führte (49). Außerdem scheinen AGEs durch die Bindung an RAGE über die Expression von VEGF und die Aktivierung inflammatorischer Zellen zur Entstehung einer Glomerulosklerose beizutragen (50). AGEs spielen auch eine Rolle bei der Entstehung der Arthritis. So zeigen Patienten mit rheumatischer Arthritis erhöhte Plasmagehalte an AGEs (51), während eine Behandlung mit sRAGE im Mausmodell zu einer Senkung der Inflammation bei rheumatischer Arthritis führte (52). Weitere Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen rheumatischer Arthritis und AGEs lieferten Experimente an jungen Hunden. Eine Injektion von Ribose in das Kniegelenk der Tiere führte zur AGE-Bildung und parallel zur Induktion von alters- und arthritissassoziierten Veränderungen im Knorpelgewebe (53). Auch im Herz-Kreislaufsystem hat die Akkumulation von AGEs einen großen Einfluss. AGEs schädigen das kardiovaskuläre System über die Bildung von Crosslinks zwischen Collagenen oder durch die Modifizierung von zirkulierenden Proteinen wie LDL sowie durch die RAGE-vermittelte ROS-Produktion (54). In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass die strukturellen Veränderungen durch die Glyklierungsendprodukte zu einer Versteifung von Gefäßen und des Myokards führen können (55, 56). So zeigten Cantini et al., dass in Ratten die altersbedingte Zunahme der Versteifung der Aortenwand mittels Aminoguanidine, eine Hemmer der AGE-Bildung, vermindert werden konnte (57). Die Modifizierung von LDL und VLDL kann zu einer Schädigung der Gefäße führen. Da modifiziertes LDL nicht mehr von dem LDL-Rezeptor erkannt werden kann, wird es stattdessen von Makrophagen aufgenommen und trägt somit zur Bildung von Schaumzellen in der arteriellen Intima bei der frühen Lesion der Atherosklerose bei (58,59). So konnten AGE-Ablagerungen in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden (60). Vlassara et al. zeigten in Kaninchen,

dass die Gabe von exogenen AGEs zu einer Induktion von atherosklerotischen Veränderungen an der Gefäßwand führten (61).

1.5. Mögliche protektive Wirkungen von AGEs

Neben der pathophysiologischen Bedeutung von AGEs werden auch mögliche protektive Eigenschaften einzelner Melanoidine diskutiert.

Eine Hypothese zu möglichen protektiven Effekten besagt, dass nicht absorbierte Melanoidine im Darm möglicherweise die Aufnahme von mutagenen Substanzen, wie den heterozyklischen Aminen, durch Bindung dieser vermindern (62). Dadurch könnte die Digestion und Absorption der Verbindungen gehemmt werden. Eine Interaktion zwischen Melanoidinen und heterozyklischen Aromaten konnte in verschiedenen Modellsystemen mit Melanoidinen aus einem gerösteten Glukose-Glycin-Mix und Melanoidinen, die in Kaffee- und Fleisch gebildet werden können, gezeigt werden (63).

Zum anderen werden antioxidative, chemopräventive Eigenschaften über die Modulation der Phase I und Phase II Enzyme im Xenobiotikastoffwechsel der AGEs diskutiert. Eine Senkung der Aktivität von Phase I Enzymen bei gleichzeitiger Induktion der Phase-II-Enzymaktivität ist dabei am effektivsten. So induziert Pronyl-Glycine, als Melanoidin der Brotkruste, in CaCo-Zellen nach 48h Behandlung einen signifikanter Anstieg der Aktivität des Phase-II-Enzyms Glutathione-S-Transferase (GST) bei gleichzeitiger Abnahme der Aktivität des Phase-I- Enzyms NADPH Cytochrome c Reduktase (64). Dieser in vitro Effekt der GST-Aktivierung konnte ebenfalls nach Brotkrustenfütterung bei Ratten in vivo beobachtet werden (65).

1.6. AGE-Inhibitoren

Aufgrund der zahlreichen pathophysiologischen Veränderungen im Zusammenhang mit Advanced Glycation Endprodukten steht auch die therapeutische Behandlung einer AGE-Anreicherung im Organismus im Focus der Aufmerksamkeit. Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten, die AGE-Akkumulation zu beeinflussen: zum einen über die Hemmung der Bildung von AGEs, zum anderen über die Eliminierung bereits gebildeter Strukturen.

Bekanntestes Beispiel für einen Inhibitor der AGE-Bildung ist Aminoguanidine. Es ist in der Lage die toxischen 1,2-Dicarbonyle abzufangen, sie in die relativ gering toxischen Addukte 1,2,4-Triazin umzuwandeln und sie somit der irreversiblen Bildung von AGEs zu entziehen

(29). Forbes et al. konnten zeigen, dass in Streptozotocin-induzierten diabetischen ApoE-KO-Mäusen mittels Aminoguanidine die Anzahl und Komplexität an atherosklerotischen Plaques gesenkt werden können (66).

Die Zerstörung bereits vorhandener Cross-links stellt eine weitere Möglichkeit dar, AGE-assoziierte Komplikationen zu beeinflussen. Bekannt sind hier N-phenyl-4,5-dimethyl-1,3-thiazolium bromide (PTB) sowie das PTB-Derivat N-Phenacyl-4,5-dimethyl-1,3-thiazolium chloride (ALT-711). Asif et al. beobachteten, dass nach 4-wöchiger Behandlung mit ALT-711 die Kammerversteifung im linken Ventrikel des Herzens alter Hunde vermindert war (44). In Sprague-Dawley-Ratten zeigten Candido et al., dass bei Streptozotocin-induziertem Diabetes mellitus nach 32 Wochen ALT-711-Behandlung eine Verbesserung der Diabetes-assoziierten kardialen Veränderungen, wie die vermehrte Bildung von Collagen, zu beobachten waren (67).

1.7. Zielsetzung

Es ist bekannt, dass Advanced Glycation Endprodukte über die Nahrung aufgenommen werden und zu Schädigungen im Organismus beitragen können. Dabei scheinen AGEs aus der Nahrung besonders schädlich bei bereits vorhandenen pathophysiologischen Zuständen wie Diabetes mellitus oder einer Nierenfunktionsschädigung zu sein. Wie sich jedoch über die Nahrung aufgenommenen AGEs in einem gesunden Organismus auf das Herz-Kreislaufsystem auswirken, ist bis dato kaum bekannt. Neue Erkenntnisse dazu sollten in der vorliegenden Arbeit gegeben werden. Dazu wurden Fütterungsstudien mit Mäusen durchgeführt, welche eine AGE-reiche Diät über verschiedene Zeiträume erhielten. Dabei wurden unterschiedliche Nahrungsmittel als Quellen für AGEs gewählt: Versuchsansatz 1: Fütterung von AGEs aus Kaffee, Versuchsansatz 2: Fütterung von AGEs aus Brotkruste; Versuchsansatz 3: Fütterung einer fettreicher Diät (indirekte Erhöhung der AGEs). In einem letzten Ansatz sollte überprüft werden, ob die mit dem Alter bzw. der Ernährung erfolgte Akkumulation der AGEs durch eine Bewegungsintervention beeinflussbar ist.

Da nahezu alle Nahrungsmittel Kohlenhydrate und Proteine enthalten, sind AGEs in zahlreichen Lebensmitteln zu finden. Dabei hat der Herstellungs- und Zubereitungsprozess entscheidenden Einfluss auf den Gehalt an Maillardprodukten. Besonders das Einwirken von hohen Temperaturen zwischen 150-180°C, wie beim Braten, Backen, Rösten, Grillen oder Frittieren führt zu einer rasanten Bildung von Melanoidinen, die meist für die charakteristische braune Farbe und das Aroma der Nahrungsmittel verantwortlich sind

(68,69). So ist davon auszugehen, dass vor allem Lebensmitteln mit einer intensiven braunen Farbe auch einen hohen Gehalt an AGEs aufweisen. Aufgrund dessen wurden in der vorliegenden Arbeit als AGE-reiche Lebensmittel Kaffee- und Brotkrustenextrakt eingesetzt, welche beide in zahlreichen publizierten Studien als AGE-reiche Lebensmittel im Tierversuch an kranken Tieren Verwendung fanden (72,73,74,75). Sie tragen auch zur täglichen Ernährung vieler Menschen bei. Beim Rösten von Kaffee werden Temperaturen bis zu 200°C erreicht (70). Melanoidine sind eine der Hauptkomponenten im Kaffee und machen 25 % der Trockenmasse aus (71). Beim Backprozess des Brotes führt das Einwirken von Temperaturen bis 220°C zur Bildung der typischen braunen Kruste. Ob der Verzehr der AGE-reichen Produkte Kaffee und Brot auch zu einer vermehrten AGE-Anreicherung im Herzen führt, sollte in den beiden Fütterungsstudien überprüft werden.

Die Hoch-Fett-Diät wurde gefüttert, da bekannt ist, dass bei der Autooxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren direkt sowie über eine erhöhte ROS Bildung auch indirekt AGEs sowie ALEs entstehen können. Somit stellen auch stark fetthaltige und erhitzte Nahrungsmittel einen Pool für Maillardprodukte in unserer Ernährung da (76,77). Interessanterweise werden vor allem Lebensmittel mit hohem Fett- und niedrigem Kohlenhydratgehalt als besonders AGE-reich beschrieben (78). In den westlichen Industriestaaten hat sich in den letzten Jahrzehnten eine fettreiche Ernährung etabliert, bei gleichzeitiger verminderter sportlicher Aktivität, was die Zahl an Übergewichtigen stark ansteigen lässt. Verbunden mit dem Übergewicht kommt es auch zu einer Zunahme von Erkrankungen des Herzkreislaufsystems sowie Diabetes mellitus bei denen auch AGEs eine Rolle zu spielen scheinen. Ob auch eine fettreiche Ernährung zu einer vermehrten AGE-Anreicherung im Herzkreislaufsystem führt, sollte im Versuchsansatz 3 überprüft werden.

Durch exogene Aufnahme wie endogene Bildung reichern sich AGEs mit zunehmendem Alter im Körper kontinuierlich an und werden mit zahlreichen alterbedingten Veränderungen im Herzen assoziiert. So wird eine zunehmende Versteifung und verminderte Elastizität der Herzkranzgefäße im Alter auf eine zunehmende Einlagerung von AGEs und damit Ausbildung der *Crosslinks* zurückgeführt. Es ist möglich, die AGE-induzierte Versteifung durch den Einsatz von so genannten Hemmern der AGE-Bildung zu beeinflussen. So konnte gezeigt werden, dass Ratten durch die Behandlung mit Aminoguanidin vor altersbedingter Versteifung der Aorta und kardialer Hypertrophie geschützt werden (79,80). Eine andere Möglichkeit zur Vermeidung oder Verbesserung von kardialen Veränderungen stellt Sport da. Zahlreiche Studien zeigen, dass Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz durch regelmäßigen Sport ihre endotheliale Funktion verbessern können (81,82,83,84,85). Ob

mittels der Intervention Sport im hohen Alter auch der Gehalt an AGEs beeinflusst werden kann, sollte im 4. Versuchansatz überprüft werden. Dazu wurden Mäuse im Alter von 24 Monaten über einen Zeitraum von 3 Monaten mittels Laufradintervention trainiert.

Um zu überprüfen, ob bei den vier Versuchsansätzen rezeptorvermittelte Reaktionen eine Rolle bei der möglichen Wirkung der AGEs auf das Herz spielen, wurden für alle Versuchsansätze C57Bl/6-Mäuse als Wildtyp verwendet sowie eine RAGE-Knockout-Mauslinie.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Acrylamid 40%	Serva, Heidelberg, Deutschland
Agarose	Biozym, Oldendorf, Deutschland
Amido Schwarz	Bio Rad, München, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg, Deutschland
Brillant Blau G250	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bromphenol Blau	Bio Rad, München, Deutschland
BSA	Serva, Heidelberg, Deutschland
CAPS	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Fluka Bio Chemika, Steinheim, Deutschland
Cumarsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dithioerythritol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
dNTP	Promega, Mannheim, Deutschland
EDTA	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 96%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg, Deutschland
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Guanidin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Hämalaunlösung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
H ₂ O ₂	Universitätsapotheke, Halle
HCL	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ketavet	Pharmacia, Erlangen, Deutschland
Luminol	Fluka Bio Chemika, Steinheim, Deutschland
Mercaptopropionsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
M-MLV Reverse Transcriptase	
RNase H Minus, Point Mutant	Promega, Mannheim, Deutschland
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Na-Citrat	Fluka Bio Chemika, Steinheim, Deutschland
Natriumvanadat Na_3VO_4	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ocadiensäure	Calbiochem, USA
Oligo-dt-18 Primer	Biomers, Ulm, Deutschland
Orange G	Merck, Darmstadt, Deutschland
PCR-Mastermix	Promega, Mannheim, Deutschland
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Rompun 2%	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Proteaseinhibitorcocktail	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
SDS	Serva, Heidelberg, Deutschland
TEMED	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tris	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Trizol®	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tween20	Merck, Darmstadt, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Fluka Bio Chemika, Steinheim, Deutschland
Zitronensäure	Serva, Heidelberg, Deutschland

2.2. Versuch 1

Um den Einfluss einer AGE-reichen Ernährung auf das Herz eines gesunden Organismus zu untersuchen, erfolgte im **Versuchsansatz 1** eine kontrollierte Fütterungsstudie mit einer AGE-angereicherten Diät. Es handelte sich dabei um eine eiweißarme Standarddiät (Altromin 1004C; Tabelle 2.2.) mit Zusatz von Casein und AGE-reichem koffeinfreiem Kaffee. Das verwendete Kaffeeextrakt wurde im Rahmen einer Kooperation von Frau PD Dr. Veronika Somoza (Stellvertretende Direktorin der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching) bezogen. Versuchstiere waren hierbei C57BL/6-Wildtypmäuse (n=20) und RAGE-knockout (RAGE-KO) Mäuse (n=20). Die C57Bl/6NCrl-Mäuse wurden über die Charles River GmbH (Sulzfeld; Dtl.) bezogen, die RAGE-KO Mäuse stammen aus der Zucht von Frau Dr. Angelika Bierhaus (Med. Fakultät, Universität Heidelberg; Dtl.). Die Haltung der Tiere erfolgte unter Standardbedingung mit 23°C Lufttemperatur, 60% Luftfeuchte und einem künstlich erzeugtem 12 Stunden Tag/Nacht - Rhythmus.

Über die Versuchsdauer von drei Wochen wurden die Tiere in Einzelhaltung gesetzt, um die Futteraufnahme zu kontrollieren. Für den Versuch wurden Tiere im Alter von 16 Monaten eingesetzt. Die Tiere erhielten zunächst über einen Zeitraum von einer Woche täglich 7g der Kontrolldiät, um sie an das neue pulverisierte Futter zu gewöhnen. Im Anschluss wurden die Tiere zufällig in vier Gruppen mit je zehn Tieren eingeteilt und erhielten je nach Gruppenzugehörigkeit über 15 Tage täglich 7g Kontrolldiät oder Kaffeediät (Tabelle 2.1.). Die Gabe von 7g pro Tag ergab sich aus Vorversuchen im eigenen Labor (Bartling B., HTC, Halle), die zeigten, dass die verabreichte Menge ausreichend ist. Zur Kontrolle der Körpergewichte wurden die Tiere täglich gewogen. Nach Beendigung des Versuches erfolgte die Tötung der Tiere durch zervikale Dislokation und anschließende sofortige Öffnung des 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 wurden Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz und Muskelgewebe entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Tabelle 2.1: Zusammensetzung Kontroll- und Kaffeediät

	Kontrolldiät	Kaffeediät
Altromin C1004 eiweißarm	70%	70%
Casein	15%	15%
Stärke	15%	-
Kaffeextrakt	-	15%

Tabelle 2.2.: Zusammensetzung Standarddiät Altromin C1004 eiweißarm

Energiegehalt (kcal/kg)	3504,8
Rohprotein (g/kg)	2,7
Rohfett (g/kg)	90,5
SFA (g/kg)	7,5
MUFA (g/kg)	20,1
PUFA (g/kg)	63,8
Kohlenhydrate (g/kg)	674,0
Rohfaser (g/kg)	99,3
Rohasche (g/kg)	59,8
Mineralstoffe/Spurenelemente (g/kg)	43,1
Vitamin A (I.E./kg)	15000
Vitamin D3 (I.E./kg)	500
Vitamin E (mg/kg)	10
Vitamin B1 (mg/kg)	20
Vitamin B2 (mg/kg)	20
Vitamin B6 (mg/kg)	15
Vitamin B12 (mg/kg)	0,03
Vitamin C (mg/kg)	20
Biotin (mg/kg)	0,20
Nikotinsäure (mg/kg)	50
Pantothensäure (mg/kg)	50
Folsäure (mg/kg)	10

2.3. Versuch 2

Im **Versuchsansatz 2** erfolgte ebenfalls eine kontrollierte Fütterungsstudie mit einer AGE-reichen Diät. Bei der AGE-haltigen Komponente handelt es sich um ein Brotkrustenextrakt, welches in definierter Menge einer eiweißarmen Standarddiät (Altromin C1004 siehe 2.1.1.) zugefügt wurde. Das Brotkrustenextrakt wurde ebenfalls im Rahmen der Kooperation mit Frau PD Dr. Veronika Somoza zur Verfügung gestellt. Leider konnten Versuchsansatz 1 und 2 nicht gemeinsam gestartet werden, da aufgrund einer vorangegangenen Zuchtunterbrechung zunächst nicht genügend Tiere zur Verfügung standen. Im Rahmen der Brotkrustenfütterung erfolgten zwei voneinander getrennte Fütterungen über einen Zeitraum von drei Tagen bzw. vier Wochen. Für die Fütterung über einen Zeitraum von drei Tagen bzw. vier Wochen wurden je 20 C56Bl/6-Wildtypmäuse und 20 RAGE-KO-Mäuse eingesetzt. Während des Versuchs wurden die Tiere in Einzelhaltung gesetzt, um die Futteraufnahme zu kontrollieren. Die Tiere erhielten zunächst über einen Zeitraum von fünf Tagen täglich 7g Kontrollfutter, um sie an die Futterumstellung zu gewöhnen. Im Anschluss erfolgte die zufällige Einteilung in je zwei Gruppen mit 10 Tieren. Diese erhielten über einen Zeitraum von drei Tagen oder vier Wochen täglich 7g - je nach Gruppenzugehörigkeit - der Kontroll- oder Brotdiät (siehe Tabelle 2.3.).

Nach Beendigung der jeweiligen Fütterung wurden die Tiere über Nacht gehungert und anschließend mittels 3,5mg Ketamin und 0,03mg Xylazin betäubt. Durch zervikale Dislokation erfolgte die Tötung der Tiere. Nach Ruptur der Aorta oberhalb des Herzen erfolgte die Blutentnahme aus dem Bauchraum. Nach zwei Stunden bei Raumtemperatur wurde durch Zentrifugation (10min; 12000rpm) aus dem entnommenen Blut Serum gewonnen. Die anschließend entnommenen Organe wurden in Eppendorfgefäße überführt und direkt in flüssigen Stickstoff gegeben. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung der Seren und Organe bei -80°C.

Tabelle 2.3.: Zusammensetzung Kontroll- und Brotdiät

	Kontrolldiät	Brotdiät
Altromin C1004 eiweißarm (Tabelle 2.)	70%	70%
Casein	15%	15%
Stärke	15%	-
Brotkrustenextrakt	-	15%

2.4. Versuch 3

Im **Versuchsansatz 3** wurde eine Fütterungsstudie mit einer Hoch-Fett Diät (60% Energie aus Fett) durchgeführt. Die fettreiche Diät wurde gewählt, da bekannt ist, dass AGEs auch endogen aus Fetten gebildet werden können.

Dazu wurden C57Bl/6-(WT)- (n=23) und RAGE-KO-Mäuse (n=20) im Alter von drei bis vier Monaten zufällig in je zwei Gruppen eingeteilt, die jeweils eine Kontrolldiät oder Fettdiät (Zusammensetzung Tabelle 2.4.) erhielten. Über die Versuchsdauer von 14 Wochen waren die Tiere in Gruppen von drei bis fünf Mäusen pro Käfig untergebracht mit freiem Zugang zu Wasser und Futter. Zur Kontrolle der Gewichtszunahme wurden einmal pro Woche die Gewichte der Tiere erfasst.

Tabelle 2.4.: Zusammensetzung der Kontroll- und Fettdiät

	Kontrolldiät	Fettdiät
Energiegehalt (MJ/kg)	14,6	22
Proteine (%)	20	20
Kohlenhydrate (%)	68	20
Fett (%)	12	60

Komponenten (g/kg)	Kontrolldiät	Fettdiät
Sonnenblumenöl, raffiniert	50,0	-
Sojaöl	-	32,3
Schweineschmalz	-	316,6
Cholesterin	-	300,8
Casein	200,0	258,4
Maisstärke	530,0	-
Saccharose	100,0	-
Sucrose	-	88,9
Maltodextrin	-	161,5
Cellulose	40,0	64,6
Vitaminmischung	20,0	12,9
Mineral- und Spurenelementmischung	60,0	58,2

MJ, Megajoule; - nicht enthalten

Fettsäuren	Kontrolldiät	Fettdiät
SFA gesamt	4,5	136,8
MUFA gesamt	11,2	139,9
PUFA gesamt	35,5	51,5
Linolsäure C-18:2	35,0	47,0
Linolensäure C-18:3	0,1	3,9
Arachidonsäure C-20:4	0,0	0,6

Nach Beendigung der Fütterung wurden die Tiere über Nacht gehungert. Mittels 3,5mg Ketamin (Ketavet 100mg/ml) und 0,03mg Xylazin (Rompun 2%) erfolgte zunächst die Betäubung der Tiere mit anschließender Tötung durch zervikale Dislokation und Öffnung des Bauchraums zur Blut- und Organentnahme (siehe 2.1.1.).

Die gewonnenen Serum- und Organproben wurden bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

2.5. Versuch 4

Im **Versuchansatz 4** sollte überprüft werden, ob der Gehalt an Advanced Glycation Endproducts im Herzen von alten Mäusen durch freiwilliges Laufradtraining beeinflusst werden kann. Für den Versuch wurden Mäuse im Alter von 24-26 Monaten gewählt, da bekannt ist, dass mit zunehmendem Alter der Gehalt an Glykierungsprodukten ansteigt.

Über die Versuchsdauer von vier Monaten wurden C57Bl/6-Wildtypmäuse (n=18) und RAGE-KO-Mäuse (n=20) in Einzelhaltung gesetzt und zufällig in Kontroll- und Laufradgruppe eingeteilt. Die Käfige in der Laufradgruppe waren mit einem kommerziell erhältlichen Laufrad (aus Zoofachgeschäft) ausgestattet, zu dem die Tiere freien Zugang hatten. Die Lauftätigkeit (Strecke, Geschwindigkeit, Pausen) der Tiere wurde online über den gesamten Versuchszeitraum erfasst. Dazu war jedes Laufrad mit einem Sensor gekoppelt, der die Umdrehungen pro Minute ermittelte.

In den ersten 14 Tagen wurden die Tiere jeden zweiten Tag gewogen, anschließend einmal pro Woche zur Überprüfung des Gewichts. Während des gesamten Versuches stand den Tieren Standardfutter und Wasser ad libitum zur Verfügung.

Nach Beendigung des Versuches erfolgte die Tötung durch zervikale Dislokation. Die Blut- und Organentnahme erfolgte wie in 2.1.1. beschrieben. Aus dem erhaltenen Vollblut wurde

nach zweistündiger Gerinnungszeit durch Zentrifugation (7000g; 10min, 20°C) Serum gewonnen. Alle Organe und gewonnenes Serum wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.6. RNA-Analytik

2.6.1. RNA-Isolation

Die Isolation der Gesamt-RNA aus den zu analysierenden Organen erfolgte mittels Trizol® Reagenz. Dazu wurden 50mg Gewebe eingewogen und mechanisch in Alufolie mit Hilfe eines Hammers zerkleinert. Um das Auftauen und somit den möglichen Angriff von RNAsen zu verhindern, wurde das Gewebe während der mechanischen Bearbeitung mehrfach in flüssigen Stickstoff getaucht. Anschließend wurde das pulverisierte Gewebe in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 500µl Trizol®-Reagenz versetzt. Mittels eines Minihomogenisators wurde das Gewebe vollständig homogenisiert.

Zur Phasentrennung wurde dem Homogenisat 0,1ml eines Chloroform/Isoamylalkohol Gemisches (23:1; v/v) zugesetzt, das Ganze gut gemischt und für 3min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation (15min, 7500g, 4°C) erfolgte die Phasentrennung in eine untere organische Phase, eine Interphase und eine wässrige obere Phase, welche im Anschluss in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Die Interphase und untere Phase wurden für die anschließende Proteinisolation bei -80°C gelagert.

Die gewonnene Phase wurde anschließend mit 0,1ml Isopropanol zur Fällung der RNA versetzt. Nach zehnminütiger Inkubation und anschließender Zentrifugation (10min, 7500g, 4°C) wurde der Überstand verworfen und die pelletierte RNA mit 1ml 75% Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5min, 2500g, 4°C) wurde der Alkohol vollständig entfernt und das Pellet unter dem Abzug luftgetrocknet. In einem letzten Schritt wurde 0,1ml DEPC-Wasser zugesetzt und das RNA-Pellet bei 60°C für 10min in einem Thermomixer (Thermomixer 5436; Eppendorf; Hamburg; Dtl.) gelöst. Die so gewonnenen Proben wurden bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung der gewonnenen RNA erfolgte spektrophotometrisch. Dazu wurden je 2µl RNA am Nano Drop ND-1000 (PeqLab Biotechnologie; Erlangen; Dtl.) eingesetzt und die Absorption bei 260nm und 280nm gemessen. Hierbei entspricht eine Absorption von 1 bei 260nm (A_{260}) einer RNA-Konzentration von 40µg/ml. Daraus ergibt sich die Berechnung der Gesamt RNA-Konzentration wie folgt:

$$\text{Konzentration RNA } \mu\text{g}/\mu\text{l} = A_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Zur Beurteilung der Qualität der RNA wurde zusätzlich der Quotient aus 260nm und 280nm gebildet. Dieser sollte bei optimaler Reinheit zwischen 1,7 und 2,1 liegen.

2.6.2. Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription erfolgte die Umschreibung der mRNA in cDNA mittels einer M-MLV Reverse Transcriptase RNase H Minus Point Mutant, Oligo-dt-18 Primer sowie dNTPs. Für einen Versuchsansatz wurden 1µg RNA mit einem cDNA-Mastermix (Tabelle 2.5.) versetzt und 60 min bei 42°C in einem Thermocycler (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg, Dtl.) umgeschrieben. In einem anschließenden zehnminütigem Schritt bei 72°C wurde die Aktivität der reversen Transkriptase gestoppt und die Proben bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

Tabelle 2.5.: cDNA Mastermix je Reaktionsansatz

Reagenzien	Volumen (µl)
M-MLV RT 5x Reaction Puffer	5
dNTPs Mix (10mM)	1,25
Oligo dT 18 Primer	1
M-MLV Reverse Transcriptase RNase H Minus, Point Mutant (200u/µl)	0,5

2.6.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Analyse der Expression gewünschter Gene wurde die gewonnene cDNA in einer quantitativen PCR eingesetzt. Diese Methode dient zur exponentiellen Vervielfältigung von bestimmten DNA-Abschnitten, welche mit Hilfe von spezifischen Primerpaaren festgelegt werden. Anschließend erfolgt eine elektrophoretische Auftrennung der gewonnenen Fragmente

in einem Agarosegel und die Visualisierung mittels Ethidiumbromidfärbung zur semiquantitativen Auswertung. Durch eine initiale Denaturierung der DNA bei 94° C für 30sec erfolgt die Auftrennung des Doppelstranges in zwei Einzelstränge. In einem zweiten Schritt erfolgt die komplementäre Anlagerung der sense und antisense Primer an die DNA bei einer für jeden Primer spezifischen Temperatur (Annealing). Mit Hilfe einer Taq-Polymerase erfolgt in Schritt 3 (Elongation) bei 72°C die Strangsynthese. Durch mehrmaliges Wiederholen der 3 Schritte Denaturierung, Anneling und Elongation kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung der gewünschten DNA-Fragmente. Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 20µl in einem Mix aus den in Tabelle 2.6. aufgeführten Reagenzien durchgeführt. Für die Analyse wurde ein fertiger PCR-Mastermix verwendet, welcher TaqPolymerase, MgCl₂, dNTPs und Reaktionspuffer enthielt. Zur Kontrolle der Primerpaare wurde während jeder Reaktion eine Negativkontrolle, ohne cDNA, mitgeführt. Als *house-keeping*-Gen wurde die mRNA-Konzentration von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) bestimmt.

Tabelle 2.6.: PCR-Mix je Reaktionsansatz

Reagenzien	Volumen (µl)
Master-Mix	10
Primer sense	2
Primer antisense	2
cDNA	1
H ₂ O	5

Die in der Arbeit verwendeten Primersequenzen sind in Tabelle 7 aufgeführt. Die optimalen Bedingungen für die einzelnen Primerpaare wurden in vorherigen Zyklen- und Temperaturtests bestimmt.

Tabelle 2.7.: Sequenzen und Eigenschaften der verwendeten Primer

Gen		Sequenz 5'-3'	Genbanknummer	Produktgröße [bp]	Tm [C°]	Zyklen
α-MHC	se	CTG CTG GAG AGG TTA TTC CTCG	NM 010856	302	61	30
	ase	GGA AGA GTG AGC GGC GCA TCA AGG				
β-MHC	se	TGC AAA GGC TCC AGG TCT GAG GGC	NM 080728	203	61	34
	ase	GCC AAC ACC AAC CTG TCC AAG TTC				
α-Aktin	se	CAC GAA ACC ACC TAT AAC AGCA	NM 009606	354	58	25
	ase	ATC CAC AAA ACG TTC ACA GTTG				
ANF	se	TGA TAG ATG AAG GCA GGA AGC CGC	NM 008725	202	63	39
	ase	AGG ATT GGA GCC CAG AGT GGA CTA GG				
AGE-R1	se	TGT TCA AGG AGG AGG GTG TC	NM 078382	300	58	28
	ase	AGC CTA GCC GGT TGT AAT CC				
AGE-R2	se	ACA GAC GAG TAC AAC AGC GGCA	NM 008925	536	61	30
	ase	GCG GTA CTT GTC CCT GAT GGC				
AGE-R3	se	TGA TGT TGC CTT CCA CTT TAA	NM 010705	152	55	29
	ase	CCA GGA CTT GTA TTT TGA ATG				
Collagen1a1	se	GGT CCC CCT GGC TCT GCT GG	NM 007742	197	64	30
	ase	TTC GGG GCT GCG GAT GTT CTC				
Collagen3a1	se	TGG TAT GAA AGG ACA CAG AGGC	NM 009930	283	61	29
	ase	TCC AAC TTC ACC CTT AGC ACC				
Ceruloplasmin	se	TTC AGC CAA TGG GAG TAA GTTT	NM 007752	374	55	38
	ase	TGC ATG TGT GAA CAT CCT GATA				
Cu/ZnSOD	se	TGA AGA GAG GCA TGT TGG AGAC	NM 011434	172	61	29
	ase	TCC TTC ATT TCC ACC TTT GCCC				
Fibulin5	se	AAA CCA CAC GTG TAC CTC ACTG	NM 011812	417	58	31
	ase	CTG CCT CTG AAG TTG ATG ACAG				
GAPDH	se	GAC CAC AGT CCA TGC CAT CAC	NM 008084	453	60	22
	ase	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TAG				
Gp91phox	se	TCG AAG ACA ACT GGA CAG GAA	NM 007807	379	55	34
	ase	GAA GAA GAT CAC AAA GAG ATG				
Lipocalin 2	se	ATG TCA CCT CCA TCC TGG TC	NM 008491	366	58	29
	ase	CAC ACT CAC CAC CCA TTC AG				
MnSOD	se	CCG AGG AGA AGT ACC ACG AG	NM 013671	281	55	25
	ase	GAA GGT AGT AAG CGT GCT CC				
RAGE	se	CTG AAC TCA CAG CCA GTG TCC C	NM 007425	298	55	40
	ase	CCC TGA CTC GGA GTT GGA TAG				
EcSOD	se	AGC TGG CTT TGC TTC TCT TG	NM 011435	326	61	35
	ase	GGT CAA GCC TGT CTG CTA GG				
Srb1	se	GAA TTC TGG GGT CTT CAC TGT C	NM 016741	593	61	29
	ase	GCA GAA CTA CTG GCT CGA TCT T				
Tpm1	se	TGG TGT CAC TGC AAA AGA AACT	NM 024427	313	58	28
	ase	TGG ATC TCC TGA ATC TCC ATCT				

Im Anschluss an die PCR erfolgte eine Auftrennung der gewonnenen Produkte anhand ihrer Größe in einem 2%-igem Agarosegel, welches zur anschließenden Visualisierung mit 0,5mg/ml Ethidiumbromid versetzt wurde. Dazu wurden die Proben mit 5µl Orange G – Ladepuffer (50% (v/v) Glycerin; 0,1% Orange G) versetzt und von dem Proben-Puffergemisch 10µl im Gel aufgetragen. Gleichzeitig wurde zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente 3µl eines 1kb Größenmarkers (Gene Ruler™ 1kb, Fermentas, St. Leon-Rot, Dtl.) im Gel mitgeführt. Die 20minütige Auftrennung erfolgte in einer horizontalen Elektrophoresekammer (ReadySub-Cell GT Cells, Bio-Rad, München) in 1x TAE-Puffer (2M Tris; 5% Essigsäure; 0,5M EDTA, pH 8,0) bei 100V.

Mit Hilfe des Image Reader LAS 3000 System wurden die DNA-Fragmente anschließend detektiert und mit der AIDA Image Analyser V.3.51 (Fuji, Tokio, Japan) Software semiquantitative ausgewertet. Zur Berechnung der relativen mRNA-Konzentration wurden alle Gene auf das *house-keeping*-Gen GAPDH normiert.

2.7. Proteinanalytik

2.7.1. Proteinisolation

Zur Proteinisolation wurden die bei der RNA-Gewinnung nicht verwendete Interphase und untere Phase genutzt. Als ersten Schritt erfolgte die Zugabe von 0,15ml 100%igem Ethanol zu den Proben. Nach gründlichem Mischen und einer Inkubation von 3min bei Raumtemperatur wurden die Proben für 5min bei 200g zentrifugiert. Der so gewonnene Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,75ml Isopropanol zur Fällung des Proteins versetzt. Nach erneutem gründlichen Mischen und einer Inkubation von 10min bei Raumtemperatur (RT) folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (10min; 4500g; 4°C), bei dem ein Pellet gewonnen wurde. Der angefallene Überstand wurde verworfen. Daraufhin erfolgte eine dreimalige Waschung des Pellets mit 1ml Guanidinhydrochlorid in 95% Ethanol. Dabei wurde das Pellet 10min bei RT inkubiert und nach einem anschließenden Zentrifugationsschritt (5min; 2500g; 4°C) der Überstand verworfen. Abschließend erfolgte ein 4. Waschschrift mit 1ml 96%igem Ethanol.

Nach dem Entfernen jeglicher Flüssigkeit wurde das Pellet unter dem Abzug 10min getrocknet und mechanisch mittels einer Gewebeschere zerkleinert. Nach Zugabe von 0,3ml SDS-Lysepuffer (50mM Tris/HCl pH 6,7; 2% SDS, 1mM Na₃VO₄, 1mM Dithioerythritol; 0,1µM Ocadiensäure; 1x Proteaseinhibitor) wurde mit Hilfe des Ultraschallbades und des

Ultrathorax (Sonoplus HD 2070, Bandelin; Berlin; Dtl.) das Pellet gelöst. Im Anschluss an die Ultraschallbehandlung erfolgte ein letzter Zentrifugationsschritt (10min; 4500g; 4°C), um nicht gelöste Partikel abzutrennen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die gewonnenen Proteinlösungen bei -80°C gelagert.

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe des BCA Protein Assay Kit (Pierce; Rochford; IL; USA). Die Methode beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Proteine in einem alkalischen Medium und die gleichzeitige Farbkomblexbildung von Cu^{1+} mit Bicinchinon-Säure. Der Farbkomblex zeigt eine starke Absorption bei 562nm, wobei die Farbintensität linear mit der Proteinkonzentration ansteigt. Als Proteinstandard für die Messung wurde ein BSA-Standard in den Konzentrationen 0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 $\mu\text{g/ml}$ verwendet. Zur Messung wurden 1 μl der Proteinlösung in Doppelbestimmung in einer 96er Well Platte eingesetzt sowie 10 μl der Standardlösungen. Nach einer Inkubation von 20min bei 37°C erfolgte die Absorptionsmessung im Plattenreader (FluoStar Optima; BMG Labtechnologies; Offenburg; Dtl.) bei 562nm. Die Berechnung der Proteinkonzentration anhand des BSA-Standards erfolgte mit Hilfe des FluoStar Optima V1.20-0 (BMG Labtechnologies; Offenburg; Dtl.) Programms.

2.7.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels SDS-PAGE nach Laemmli (1970) erfolgte die elektrophoretische Trennung der Proteine anhand ihrer molekularen Größe. Als Trennmittel wurde ein Gel auf Acrylamidbasis verwendet, welches sich aus einem Sammel- und Trenngel (Tabelle 2.8.) zusammensetzt. Der prozentuale Gehalt des Acrylamids bestimmt, ob sich große oder kleine Proteine gut auftrennen lassen - je größer das Protein ist, umso geringer muss der prozentuale Anteil des Acrylamids gewählt werden.

Tabelle 2.8.: Zusammensetzung der verwendeten Trenn- und Sammelgele (ml)

	Sammelgel	Trenngel	Trenngel
	5%	10%	15%
H ₂ O	2.1	4.0	2.3
40% Acrylamid	0.5	3.3	5.0
1.5M Tris (pH 8.8)	-	2.5	2.5
1.0M Tris (pH 6.8)	0.38	-	-
10% SDS	0.03	0.1	0.1
10% APS	0.03	0.1	0.1
TEMED	0.003	0.004	0.004

Die Proteinproben wurden in Vorbereitung auf die Trennung mit 5x Probenpuffer (10mM Tris-HCL pH 6.8, 10% SDS, 25% β -Mercaptoethanol, 0.01% Bromphenolblau) versetzt und für 4min bei 95°C im Thermomixer (Eppendorf; Hamburg; Dtl.) erhitzt. Durch das Erhitzen und das im Probenpuffer enthaltenen SDS und Mercaptoethanol werden die Proteine vollständig denaturiert und erhalten eine negative Ladung zur elektrophoretischen Trennung. Danach wurden je 20 μ g Protein im Gel aufgetragen und in einer *Mini-Protean[®] 2-D Electrophoresis Cell* (Bio-Rad, München) Kammer mit 1x Tris-Glycin-Laufpuffer (24,8mM Tris, 191,7mM Glycin, 5,2mM SDS, pH=8,6) zunächst bei 100V 15min im Sammelgel konzentriert und im Anschluss im Trenngel bei 130V über einen Zeitraum von 1-1,5h aufgetrennt. Zur Größenbestimmung der Proteine wurden jeweils 3 μ l eines Größenmarkers (Prestained Protein Marker; Fermentas; St. Leon Rot; Dtl.) mitgeführt.

2.7.3. Western Blot

Im Anschluss an die Auftrennung der Proteine erfolgt deren elektrophoretische Übertragung aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine synthetische Membran. Auf der Membran können dann die Proteine mittels immunologischer Verfahren sichtbar gemacht werden

Die für den Transfer verwendete PVDF-Membran (ImmobilionTM; Carl Roth GmbH; Karlsruhe; Dtl.) wurde zunächst in Methanol aktiviert und anschließend zusammen mit dem Filterpapier in CAPS-Blottingpuffer (50mM CAPS; 1mM 3-Mercaptopropionsäure, 10% Methanol (v/v); pH=10) äquilibriert. Zusammen mit dem Acrylamidgel wurden Filterpapier

und Membran in Sandwichform angeordnet und bei einer konstanten Stromstärke von 1 mA/cm² Membran über 50min geblottet.

Durch das Anfärben der Membran mit Ponceau S (1% (v/v) Essigsäure, 0,5% (w/v) Ponceau-Rot) wurde überprüft, ob der Transfer erfolgreich war. Mittels Wasser und TBS-T (10mM Tris/HCL pH=7,6; 150mM NaCl; 0,1% Tween 20) wurde die Membran anschließend wieder entfärbt und mit einer Lösung aus 2% BSA oder 5% Milchpulver, je nach Antikörper, für 1h bei Raumtemperatur blockiert, um freie Bindungsstellen auf der Membran zu belegen. Gleichzeitig erfolgte die Färbung des Polyacrylamidgels mittels Comassie-Blaufärbelösung (5% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure; 0,1% Comassie Brilliant Blau G250) zur Überprüfung der noch im Gel verbliebenen Proteinmengen.

Zur Detektion der Proteine wurde die Membran für 1h bei Raumtemperatur (RT) oder über Nacht bei 4°C mit einer primären Antikörperlösung (Tabelle 2.9.) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10min mit TBS-T wurde die Membran mit einem Peroxidasegekoppelten sekundären Antikörper erneut für 1h bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran mit TBS-T 3mal für 10min und einmal für 10min mit TBS gewaschen.

Die anschließende Detektion erfolgte durch Chemilumineszenz mittels einer Luminolsubstratlösung (2,5 mM Luminol, 400 µM p-Cumarsäure, 5,4 mM H₂O₂ in 0,1 M Tris/HCl pH 8,5) am Image Reader LAS 3000. Mittels der Software AIDA V.3.51 erfolgte die quantitative Auswertung der Proteinbanden. Um Schwankungen in der Proteinmenge auszugleichen, wurde alle Proben auf die Beladungskontrolle GAPDH normiert.

Tabelle 2.9.: Primär- und Sekundärantikörper

Primäre Antikörper	Verdünnung	Herkunft
anti-AGE (S006593), Schaf Antiserum	1:1000	Prof. Schinzel, Würzburg
anti-Arg-Pyrimidin, Maus	1:1000	Biologo, Kronshagen
anti-CML, Kaninchen polyklonal IgG	1:1000	Prof. Schleicher, Heidelberg
anti-GAPDH, Kaninchen polyclonal IgG	1:1000	Santa Cruz, USA
anti-HNE, Kaninchen Antiserum	1:1000	Alpha Diagnostic, USA
anti-3-DG-Imidazolone, Maus monoklonal IgG1	1:1000	Biologo, Kronshagen
anti-MDA, Kaninchen Antiserum	1:1000	Alpha Diagnostic, USA
anti- MnSOD, Kaninchen polyklonal IgG	1:1000	Upstate, USA
anti-Pentosidin, Maus monoklonal IgG1	1:1000	Biologo, Kronshagen
anti-Cu/ZnSOD, Schaf, polyklonal IgG	1:1000	Calbiochem®, Darmstadt

Sekundäre Antikörper	Verdünnung	Herkunft
anti-Kaninchen, HRP-konjugiert IgG	1:10000	Dianova, Hamburg
anti-Maus True Blot Ultra, HRP-konjugiert IgG	1:1000	eBioscience TM , USA
anti-Schaf, Peroxidase-konjugiert IgG	1:10000	Dianova, Hamburg

2.7.4. Dotblot

Beim Dotblot-Verfahren werden die Proteine nicht elektrophoretisch aufgetrennt, sondern direkt auf die Membran aufgetragen. In den Untersuchungen wurden jeweils in einer Doppelbestimmung 5 µg Protein oder 1 µl Serum in Lysepuffer aufgetragen. Membran und Filterpapier wurden in Vorarbeit in PBS getränkt und anschließend in Sandwichform in eine Dotblot-Apparatur (Minifold[®] I Spot Blot System, Schleicher & Schuell; Dassel; Dtl.) gebracht. Vor dem Auftragen wurden die Proben bei 95°C für 4min erhitzt. Nach dem Aufbringen der Proben auf die Membran wurde diese kurz in PBS gewaschen und anschließend mit 3% H₂O₂ gespült, um eventuelle Peroxidasereaktionen im Proteinlysate zu verhindern. Nach kurzem Spülen in Wasser wurde die Membran mit Amidoschwarz gefärbt und anschließend fotografiert. Die Amidoschwarzfärbung diente als Beladungskontrolle, auf die alle Proben bei der Auswertung normiert wurden. Nach der Färbung erfolgte die gleiche Vorgehensweise wie nach dem Blotten beim Western Blot-Verfahren (2.3.4.) mit Blockierung und anschließender Antikörperbehandlung.

2.7.5. Oxiblot

Der Oxiblot dient dem Nachweis von Carbonylgruppen, welche durch das Einwirken von freien Sauerstoffradikalen und anderen reaktiven Spezies in Proteinseitenketten gebildet werden können und als Kennzeichen für den Oxidativen Status eines Proteins dienen. Prinzip der Reaktion ist eine Derivatisierung der Carbonylgruppen mit 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) zu 2,4-dinitrophenylhydrazone (DNP-hydrazone), welches mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden kann. In den vorliegenden Untersuchungen erfolgte der Nachweis in 5 µg Protein mittels des Oxy BlotTM Protein Oxidation Detection Kit (Chemicon[®] Int.; Ternecula; CA; USA) nach Angaben des Herstellers.

2.8. Bestimmung der Triglyceridkonzentration

Die Bestimmung des Gehaltes an Triglyceriden (TG) im Serum erfolgte mit Hilfe eines colorimetrischen enzymatischen Testkits (Ecoline[®], Diagnostic Systemc GmbH; Holzheim; Dtl.). Das Prinzip der Messung beruht zunächst auf der Spaltung der TG durch eine Lipoproteinlipase in freie Fettsäuren und Glycerin. Glycerin wird über zwei weitere Reaktionsschritte zu Dihydroxyacetonphosphat und H₂O₂ umgewandelt. In einem letzten Reaktionsschritt reagiert das H₂O₂ mit Aminoantipyrin und 4-Chlorphenol unter katalytischer Wirkung einer Peroxidase und bildet die Indikatorsubstanz Chinonimin (Abb.2.1.). Der Farbumschlag wird anschließend bei einer Wellenlänge von 492nm im Plattenreader gemessen. Für die Messung wurden je 2µl Serum in einer Doppelbestimmung eingesetzt. Zur Bestimmung der Konzentration wurden je 10µl eines Plasmastandard (Ecoline HV Calbrator, erhalten aus Institut für Ernährungswissenschaften, Halle/Saale, Dtl.) mitgeführt. Die Konzentrationsberechnung erfolgte mit Hilfe des Programms FluoStar Optima V.1.20-0 anhand der mitgeführten Standards.

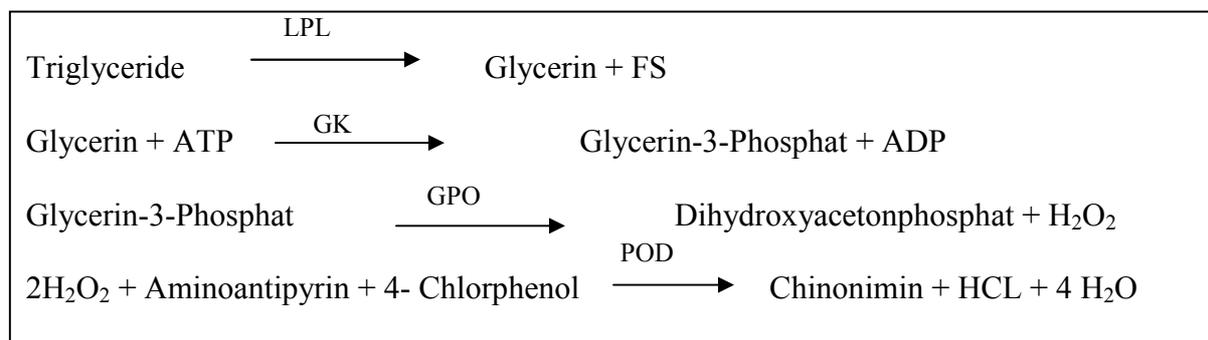


Abb. 2.1.: schematische Darstellung der ablaufenden Reaktionen zur TG-Bestimmung mittels enzymatisch photometrischen Tests
LPL=Lipoproteinlipase; **GK**=Glycerokinase; **GPO**=Glycerin-3-phosphatoxidase; **POD**=Peroxidase

2.9. Bestimmung der Cholesterinkonzentration

Die Bestimmung der Cholesterinkonzentration erfolgte ebenfalls über einen enzymatischen photometrischen Test (Diagnostic Systemc GmbH; Holzheim; Dtl) mit Chinonimin als colorimetrischen Indikator. Durch enzymatische Hydrolyse und Oxidation erfolgt der Umbau von Cholesterin unter Bildung von H₂O₂, welches durch die Peroxidase und in Anwesenheit von Aminoantipyrin und Phenol Chinonimin bildet (Abb.2.2.).

Für die Versuche wurden je 1µl Serum in einer Doppelbestimmung eingesetzt. Zur Konzentrationsbestimmung wurde ein Plasmastandard mit bekannter Cholesterinkonzentration (Ecoline HV Calibrator, erhalten aus dem Institut für Ernährungswissenschaften, Halle/Saale, Dtl.) mitgeführt. Die Konzentrationsberechnung erfolgte mit Hilfe des Programms FluoStar Optima V.1.20-0 anhand der mitgeführten Standards.

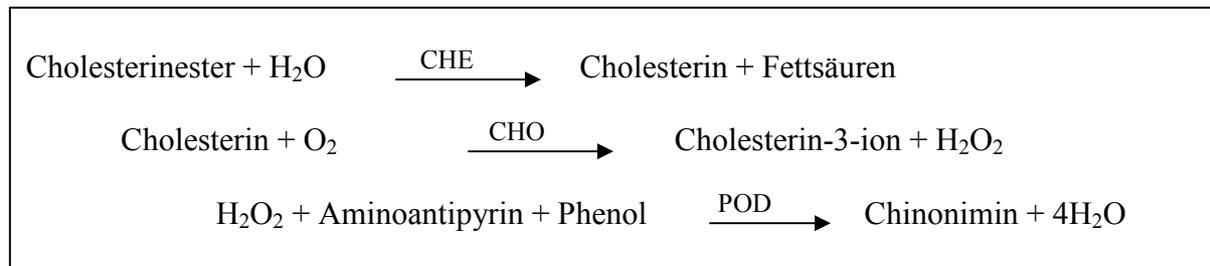


Abb. 2.2.: schematische Darstellung der ablaufenden Reaktionen zur Cholesterinbestimmung mittels enzymatisch-photometrischen Tests
CHE=Cholesterinesterase; **CHO**=Cholesterinoxidase; **POD**=Peroxidase

2.10. Bestimmung der Insulinkonzentration

Die Bestimmung der Insulinkonzentration erfolgte mittels Insulin Mouse Ultrasensitive ELISA (DRG Instruments GmbH, Marburg, Dtl.) nach Angaben des Herstellers.

Für den Versuch wurden je 5µl Serum in einer Doppelbestimmung eingesetzt. Die Absorptionsmessung erfolgte im Plattenreader bei 450nm. Die anschließende Konzentrationsbestimmung wurde anhand der mitgeführten Standards mit Hilfe des Programms FluoStar Optima V.1.20-0 durchgeführt.

2.11. Autofluoreszenzmessung von Glykierungsprodukten

Die Bestimmung der Autofluoreszenz erfolgte in einer UV-fähigen 96well Platte (Eppendorf) im Plattenreader (FluoStar Optima; BMG Labtechnologies; Offenburg; Dtl.). Die gewählten Messspektren 330nm/405nm und 360nm/440nm werden in der Literatur als spezifisch für die Glykierungsprodukte beschrieben (103). Für die Messung wurden je eine 1:50 Verdünnung der Seren oder 50µg Herzprotein in einer Dreifachbestimmung in einem Volumen von 200µl PBS eingesetzt. Zur Überprüfung der Proteingehalte der Seren wurde zusätzlich die Absorption bei 280nm gemessen und die Fluoreszenzdaten darauf abgeglichen.

2.12. Immunohistochemie

Für die Immunohistochemie wurden die Organe direkt nach der Entnahme in 4% Formaldehyd in PBS gegeben und nach 24 Stunden in 70% Ethanol überführt. Bis zur Einbettung in Paraffin wurden die Organe in Ethanol bei Raumtemperatur gelagert. Nach erfolgreicher Einbettung wurden 4µm dicke Präparate mit Hilfe eines Mikrotoms geschnitten und auf einem Objektträger fixiert.

Für die Antikörperbehandlung wurden die Präparate zunächst über Nacht bei 60°C gelagert zur Verflüssigung des Paraffins. Die Entparaffinierung erfolgte mittels absteigender Alkoholreihe und anschließendem dreimaligem Waschens mit Waschpuffer (1-fach PBS, 0,1% Tween). Zur Demaskierung der Proteine erfolgte das Kochen der Präparate in Citratpuffer (2mM Zitronensäure, 8mM Na-Citrat) für 20min 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 einer primären Antikörperlösung 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-gekoppelten sekundären Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Färbung der Präparate. Dazu wurde ein DAB-Substrat (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 5min unter fließendem Wasser gewässert. Die Kernfärbung im Anschluss wurde mittels Hämalaunlösung durchgeführt. Dazu wurde für 20sec Hämalaunlösung auf das Präparat gegeben und anschließend der Schnitt für 10 min in Leitungswasser gewässert. Abschließend wurden die Präparate mittels Eindeckmedium (Glycergel Mounting Medium, DAKO, Kalifornien, USA) luftdicht abgeschlossen.

2.13. Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden als Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD) (Diagramme, Tabellen) bzw. Standardfehler des Mittelwertes (SEM) (Gewichtskurven) angegeben. Die C57Bl/6 (WT)-Tiere der Kontrollgruppe wurden als Referenzgruppe 100% gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm MINITAB (Version 13, Minitab Ltd., Michigan, USA) mittels einfaktorieller Varianzanalyse. Zusätzlich erfolgte ein Mittelwertsvergleich der Gruppen mittels Student's Test im Programm Excel. Die graphische

Darstellung der Ergebnisse erfolgte ebenfalls mit Hilfe von MS Excel. Werte mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen und mit * (signifikant zur WT Kontrollgruppe) oder # (signifikant zur RAGE-KO-Kontrollgruppe) markiert.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung von Kaffee und Brotkruste auf vorhandene AGE-Modifikationen

AGEs entstehen nicht nur endogen, sondern werden auch in zahlreichen Lebensmitteln, in Abhängigkeit von der Temperatur und Dauer der Hitzeinwirkung, gebildet. Die so entstandenen Maillardprodukte sind verantwortlich für die charakteristisch braune Farbe und das Aroma der Lebensmittel. Die in der Arbeit verwendeten Lebensmittel, Kaffee und Brotkruste, sind grundsätzlich als AGE-reiche Lebensmittel anerkannt (86). Aufgrund ihrer verschiedenen Herstellungsprozesse und Inhaltsstoffe, sollten sie unterschiedliche Quellen für AGE-Modifikationen darstellen. In einer bereits abgeschlossenen Dissertation der Arbeitsgruppe wurden mittels Dotblotanalysen ausgewählte Modifikationen (CML, Arg-Pyrimidin, Pentosidin, 3-DG-Imidazol, AGE, MDA) in den löslichen Fraktionen der verwendeten Lebensmittel nachgewiesen (87). Dabei zeigte sich, dass in der löslichen Brotkruste alle untersuchten Modifikationen vorhanden sind, während im Kaffeeextrakt lediglich CML und MDA nachweisbar waren, diese jedoch in höheren Konzentrationen als im Brotkrustenextrakt (Abb.3.1.).

AGE-Modifikationen	BKE (mg)				BL (relative Einheit)				KE (mg)			
	5	2,5	1,25	0,63	5	2,5	1,25	0,63	1	0,5	0,25	0,13
anti - Arg - Pyrimidin	●	●	●	●	●	●	●	●				
anti - GA - Pyridin	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
anti - CML	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
anti - "AGE"	●	●	●	●	●	●	●	●				
anti - Pentosidin	●	●	●	●	●	●	●	●				
anti - 3-DG Imidazol	●	●	●	●	●	●	●	●				

Abb. 3.1.: Nachweis von AGE-Modifikationen im Kaffee- und Brotkrustenextrakt gemessen mittels Dotblot; entnommen aus Ruhs S. Dissertation (87)

Im Rahmen der Arbeit wurden ergänzend zu den Dotblotdaten die AGE-spezifischen Fluoreszenzen bei 330nm/405nm (Anregung / Emission) und 360nm/440nm in den löslichen Fraktionen der Lebensmittelextrakte gemessen. Für die Versuche wurden Kaffee und Brot mit einer Konzentration von 150mg/ml eingewogen und in HBSS gelöst. Dabei konnte Kaffee vollständig gelöst werden, während Brotkruste hohe Anteile an unlöslichen Substanzen aufwies. Beide Extrakte zeigten im Vergleich zum Puffer eine erhöhte Fluoreszenz im Bereich der analysierten Wellenlängen (Abb.3.2.B). Da jedoch Kaffee und Brotkruste eine unterschiedliche Löslichkeit aufwiesen, waren auch die Konzentrationen der Fraktionen nicht

identisch. Daher wurden beide Fraktionen bezüglich der Proteinkonzentration eingestellt mit Hilfe der Bestimmung der Fluoreszenz bei 280nm/330nm (88). Nach Einstellung (3.2.A) unterscheiden sich beide Extrakte weder bei 330nm/405nm noch bei 360nm/440nm voneinander (3.2.B). Allerdings lassen sich keine realen Aussagen zu Unterschieden in der AGE-spezifischen Fluoreszenz beider Futterquellen geben, da die unlöslichen Komponenten bei diesen Analysen methodenbedingt nicht gemessen wurden, diese jedoch ebenfalls im Futter enthalten waren.

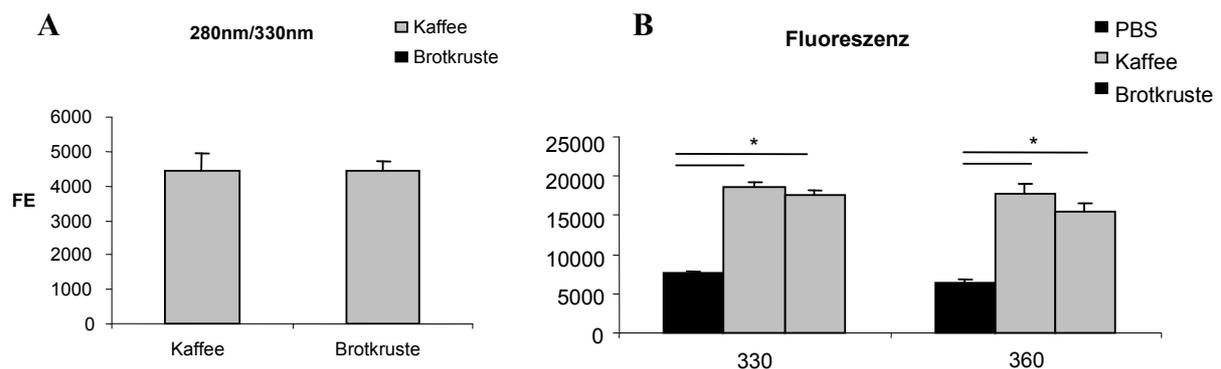


Abb. 3.2.: Fluoreszenzmessung in der löslichen Fraktion von Kaffee und Brotkruste; Werte in Fluoreszenzeinheiten (FE); (A) Fluoreszenz von Kaffee und Brot bei 280nm/330nm; (B) Fluoreszenz von Kaffee und Brotkruste verglichen mit PBS bei 330nm/405nm und 360nm/440nm

3.2. Charakterisierung der C57Bl/6- und RAGE-KO-Mäuse bezüglich der zu analysierenden Parameter

Die Wirkung AGE-haltiger Nahrungsmittel sollte laut Literaturdaten zumindest zum Teil über den RAGE Rezeptor vermittelt werden. Daher wurden in der Arbeit C57Bl/6 (WT)- und RAGE-Knockout (RAGE-KO)-Mäuse eingesetzt. Um genotypische Unterschiede in den zu analysierenden Parameter auszuschließen, wurden die Mäuse zunächst unabhängig von der Fütterung miteinander verglichen. Dazu wurden oxidative und antioxidative Parameter sowie die nativen AGE-Gehalte in Serum und Herz mittels Fluoreszenzmessung und spezifischer Antikörper ermittelt. Ebenfalls erfolgten Genexpressionsanalysen von AGE-spezifischen Rezeptoren und Markern für Hypertrophie, Fibrose und Inflammation.

3.2.1. Oxidative Stressparameter

Die Bestimmung von oxidativem Stress erfolgte über die Messung der Expression von oxidativen und antioxidativen Enzymen mittels RT-PCR (MnSOD, Cu/ZnSOD, ecSOD, Cp,

gp91phox) und Western Blot (MnSOD, Cu/ZnSOD) sowie insbesondere über die Erfassung des Gehaltes an oxidativ veränderten Proteinen mit Hilfe des so genannten Oxiblots (Tabelle 3.1.). Allerdings zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den WT- und RAGE-KO-Mäuse für die zu analysierten Parametern bezüglich des oxidativen Stresses.

Tabelle 3.1.: kardiale mRNA- und Proteinexpression oxidativer Marker in C57Bl/6 (WT)- und RAGE-KO-Mäusen

	WT	RAGE-KO	p-Wert
mRNA-Expression			
MnSOD	1,00 ± 0,21	1,00 ± 0,21	0,96
Cu/ZnSOD	1,00 ± 0,19	1,01 ± 0,21	0,83
ecSOD	1,00 ± 0,28	0,95 ± 0,26	0,81
Cp	1,00 ± 0,18	0,93 ± 0,19	0,24
gp91phox	1,00 ± 0,20	0,91 ± 0,29	0,55
Proteinexpression			
MnSOD	1,00 ± 0,24	0,84 ± 0,42	0,14
Cu/ZnSOD	1,00 ± 0,32	1,01 ± 0,32	0,69
Oxiblot	1,00 ± 0,68	0,80 ± 0,57	0,14

MW ± SD; WT als Kontrolle 1,0 gesetzt; * signifikanter Unterschied zur WT-Gruppe (p<0,05); n=20 je Gruppe

3.2.2. AGE-spezifische Fluoreszenz in Serum und Herz

Zur Überprüfung der nativen AGE-Gehalte in Serum und Herz der Tiere erfolgte die Messung AGE-spezifischer Fluoreszenzen bei einer Anregung/Emission von 330nm/405nm und 360nm/440nm. Bei der Messung der beiden Fluoreszenzen konnten sowohl im Serum als auch im Herzen keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und RAGE-KO-Mäusen festgestellt werden (Tabelle 3.2.).

Tabelle 3.2.: AGE-spezifische Fluoreszenz in Serum und Herz von C57Bl/6 (WT)- und RAGE-KO-Mäusen

<i>AGE-spezifische Fluoreszenz</i>	WT	RAGE-KO	p-Wert
Serum			
330nm/405nm	1,00 ± 0,26	0,93 ± 0,22	0,22
360nm/440nm	1,00 ± 0,29	0,92 ± 0,21	0,26
Herz			
330nm/405nm	1,00 ± 0,16	0,94 ± 0,15	0,07
360nm/440nm	1,00 ± 0,15	1,03 ± 0,15	0,32

MW ± SD; WT als Kontrolle 1,0 gesetzt; * signifikanter Unterschied zur WT-Gruppe, (p<0,05); n=20 je Gruppe

3.2.3. AGE-Modifikationen in Serum und Herz

Neben der AGE-spezifischen Fluoreszenz wurde auch der Gehalt einiger definierter Proteinmodifikationen (CML, AGE, Arg-Pyrimidin, 3-DG-Imidazolone, Pentosidin, MDA) mittels Dotblot und Western Blot analysiert. Dabei konnten im Serum der RAGE-KO-Mäuse um 12% ($p=0,0006$) geringere MDA-Gehalte beobachtet werden, während der Gehalt von AGE um 10% ($p=0,003$) sowie von Pentosidin um 25% ($p=0,008$) höher war, verglichen mit den WT-Mäusen. Im Herzen waren keine Unterschiede zwischen den beiden Mäusestämmen bezüglich CML, AGE, 3-DG-Imidazolone und MDA feststellbar. Dagegen war der Gehalt an Arg-Pyrimidin um 20% ($p=0,037$) höher in den Herzen der RAGE-KO-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp.

Tabelle 3.3.: mittels Dotblot und Western Blot bestimmte Proteinexpressionen der untersuchten AGE-Modifikationen im Serum und Herz von WT- und RAGE-KO-Mäusen

	WT	RAGE-KO	p-Wert
Proteinexpression			
AGE-Modifikationen			
<i>Dotblot Serum</i>			
CML	1,00 ± 0,21	0,99 ± 0,18	0,86
MDA	1,00 ± 0,10	0,88 ± 0,14	0,0007 *
AGE (S006593)	1,00 ± 0,15	1,09 ± 0,19	0,033 *
3-DG-Imidazolone	1,00 ± 0,24	0,96 ± 0,32	0,62
Pentosidin	1,00 ± 0,15	1,25 ± 0,24	0,0008 *
Arg-Pyrimidin	1,00 ± 0,24	1,09 ± 0,27	0,15
<i>Western Blot Herz</i>			
CML	1,00 ± 0,25	1,25 ± 0,46	0,46
MDA	1,00 ± 0,29	0,97 ± 0,35	0,53
AGE (S006593)	1,00 ± 0,32	1,06 ± 0,37	0,45
3-DG-Imidazolone	1,00 ± 0,46	1,04 ± 0,52	0,44
Arg-Pyrimidin	1,00 ± 0,24	1,19 ± 0,49	0,037 *

MW ± SD; * signifikanter Unterschied zur WT-Gruppe ($p<0,05$); WT als Kontrolle 1,0 gesetzt; n=20 je Gruppe

3.2.4. mRNA-Expressionen AGE-spezifischer Rezeptoren, Hypertrophie-, Fibrose- und InflammationMarker

Die zu analysierenden Genen ergaben sich aus vorherigen Microarray-Analysen der Arbeitsgruppe. Neben RAGE wurde auch der Einfluss der Interventionen auf weitere AGE-Rezeptoren überprüft. Die Marker für Hypertrophie und Fibrose wurden in *in vitro*

Zellversuchen mit kardialen Fibroblasten nach Behandlung mit Kaffee und Brotkruste identifiziert. Daher sollte der Einfluss der Extrakte auch *in vivo* auf die analysierten Marker untersucht werden. In Tabelle 3.4. sind die jeweiligen mRNA-Expressionen der untersuchten Gene in den Herzen der WT- und RAGE-KO-Mäuse dargestellt.

Bei den Analysen zeigte sich, dass die RAGE-KO-Mäuse signifikant niedrigere Expressionen der Gene AGE-Rezeptor 2, Collagen1a1, Fibulin 5, TGF- β 1 und Lipocalin2 im Vergleich zu den WT-Mäusen aufweisen.

Tabelle 3.4.: mRNA-Expression der untersuchten Gene in den Herzen von C57Bl/6 (WT)- und RAGE-KO-Mäusen

	WT	RAGE-KO	p-Wert
mRNA Expression			
AGE Rezeptoren			
AGER1	1,00 \pm 0,2	0,90 \pm 0,2	0,065
AGER2	1,00 \pm 0,3	0,85 \pm 0,2	0,024 *
AGER3	1,00 \pm 0,4	0,90 \pm 0,3	0,29
SRB1	1,00 \pm 0,2	0,91 \pm 0,3	0,12
Hypertrophie			
α -MHC	1,00 \pm 0,2	1,02 \pm 0,2	0,52
β -MHC	1,00 \pm 0,2	1,01 \pm 0,3	0,95
ANF	1,00 \pm 0,2	0,92 \pm 0,2	0,32
α -Aktin	1,00 \pm 0,4	0,90 \pm 0,5	0,77
Tropomyosin1	1,00 \pm 0,2	1,01 \pm 0,2	0,87
Fibrose			
Collagen 1a1	1,00 \pm 0,4	0,60 \pm 0,2	5,4*10 ⁻¹⁰ *
Collagen 3a1	1,00 \pm 0,5	0,79 \pm 0,4	0,07
Fibulin5	1,00 \pm 0,2	0,90 \pm 0,2	0,007 *
TGF- β 1	1,00 \pm 0,3	0,82 \pm 0,3	0,006 *
TGF- β 3	1,00 \pm 0,2	0,85 \pm 0,2	0,16
Inflammation			
Lipocalin2	1,00 \pm 0,3	0,78 \pm 0,3	0,001 *

MW \pm SD; * signifikanter Unterschied zum Wildtyp (WT) (p<0,05); n=20 je Gruppe

3.3. Genotypunabhängige Effekte der Diäten

In einem kurzen Überblick sollen nun die wesentlichen Effekte der Diäten auf die analysierten Parameter unabhängig von dem Genotyp der Mäuse dargestellt werden. Die Datentabellen (MW \pm SD) zu den Ergebnissen der nachfolgenden Abschnitte (3.3.1. bis 3.3.3.) befinden sich im Anhang in Tabelle A1-A16.

3.3.1. Kaffee

Infolge der Kaffeediät zeigten sich weder im Herzen noch im Serum Veränderungen in den oxidativen Parametern. Die Fütterung von Kaffeeextrakt führte zu einem signifikanten Anstieg in der Serum-AGE-Fluoreszenz bei 365nm/440nm um 19% ($p=0,022$), was auf eine Resorption der AGEs hinweist (Anhang Tabelle A1). Dagegen war bei den Analysen spezifischer Modifikationen (CML, AGE, Imidazolone etc.) keine Änderung nachweisbar. Im Herzen konnte sogar eine Abnahme der Modifikationen AGE um 20,9% ($p=0,03$) und 3-DG-Imidazolone um 23,1% ($p=0,024$) festgestellt werden, während bei den Lipidperoxidationsprodukten MDA und HNE ein signifikanter Anstieg zu beobachten war. MDA stieg um 25,4% ($p=0,029$) und HNE um 39,4% ($p=0,015$) an (Anhang Tabelle A3).

3.3.2. Brotkruste

Die Brotkrustenfütterung erfolgte in zwei unabhängigen Versuchen - über einen Zeitraum von drei Tagen und vier Wochen. Um eine Langzeitfütterung zu simulieren, wurde zunächst über einen Zeitraum von vier Wochen gefüttert. Allerdings konnten dabei nur geringe Effekte beobachtet werden im Vergleich zu vorherigen Zellkulturversuchen mit Brotkruste oder Fütterungen von zwei Wochen (119,136). Um mögliche Kurzzeiteffekte der Brotkruste zu erfassen, die nach vier Wochen nicht mehr messbar sind, wurde ebenfalls noch für drei Tage gefüttert. Nach der 3-Tage-Fütterung zeigte sich eine signifikante Zunahme der mRNA-Expression der MnSOD um 16% ($p=0,02$). Im Gegensatz dazu konnte eine Abnahme der Cu/ZnSOD um 14,8% ($p=0,006$), der ecSOD um 25,3% ($p=0,015$) sowie der gp91phox um 14,4% ($p=0,021$) beobachtet werden (Anhang Tabelle A6). Ebenso konnte ein Anstieg in der Proteinexpression der MnSOD um 19,8% ($p=0,033$) gesehen werden, während die Cu/ZnSOD um 18,5% ($p=0,009$) signifikant abnahm (Anhang Tabl. A6). Die Fluoreszenz im Serum war nach drei Tagen Brotkrustenfütterung signifikant bei 330nm/405nm um 27,3% ($p=0,0003$) und bei 365nm/440nm um 35,7% ($p=9,92E-06$) erhöht (Anhang Tabl. A5). Neben der Zunahme der AGE-spezifischen Fluoreszenz konnte im Serum auch eine Zunahme des Pentosidin-Gehalts um 12,5% ($p=0,048$) beobachtet werden, sowie ein Anstieg von 3-DG-Imidazolone um 18,1% ($p=0,046$) (Tabelle A7). Bei der Analyse der AGE-Rezeptoren zeigte sich eine Abnahme der Expression des AGE-Rezeptors 2 um 18,3% ($p=0,034$). Ebenso konnte eine Senkung der mRNA-Expression der Hypertrophie marker α -MHC um 14% ($p=0,02$) und ANF um 21,8% ($p=0,002$) beobachtet werden (Tabelle A8). Gleichzeitig führte

die Fütterung zu einer verminderten Expression der Fibrosemarker Collagen 1a1 um 25,3% ($p=0,015$), Collagen 3a1 um 27,7% ($p=0,014$) und TGF- β 3 um 12,8% ($p=0,023$).

Im Vergleich zu der 3-Tagesfütterung konnte nach vier Wochen nur noch eine signifikante Zunahme der mRNA-Expression der MnSOD um 21,5% ($p=0,03$) gesehen werden (Anhang Tabl. A10). Die Zunahme der AGE-spezifischen Serum-Fluoreszenzen um 26,2% ($p=0,024$) bei 330nm/405nm sowie 31,3% ($p=0,011$) bei 360nm/440nm waren in der gleichen Größenordnung wie nach drei Tagen Fütterung (Anhang Tabl. A9). Weiterhin waren CML und MDA im Serum der Tiere erhöht nachweisbar (Anhang Tabl. A11). CML stieg dabei signifikant um 13,3% ($p=0,04$) sowie MDA um 10% ($p=0,04$). Gleichzeitig konnte eine Senkung der Expression von Arg-Pyrimidin um 21,8% ($p=0,003$) beobachtet werden, während im Herzen Arg-Pyrimidin um 24,9% ($p=0,043$) erhöht war. Bei den mRNA-Expressionen der analysierten Gene zeigte sich nach vier Wochen Brotkrustendiät im Herzen der Tiere eine signifikante Zunahme von β -MHC um 14,8% ($p=0,015$), während Fibulin 5 mit einer Abnahme um 19,9% ($p=0,022$) reagierte (Anhang Tabl. A12).

3.3.3. Fettreiche Diät

Bei der fettreichen Diät wurden 60% der Energie aus Fett über einen Zeitraum von vier Monaten verabreicht. Hier sollte die Frage beantwortet werden, ob eine fettreiche Diät auch indirekt zu erhöhten AGE-Werten in vivo im Gewebe führen kann. Im Serum der Tiere zeigte sich infolge der fettreichen Ernährung eine signifikante Abnahme der AGE spezifischen Fluoreszenz bei 360nm/440nm um 14,4% ($p=0,04$) (Anhang Tabelle A13) sowie eine Verringerung des Gehaltes an Arg-Pyrimidin um 21% ($p=0,002$) bzw. 3-DG-Imidazolone um 16,6% ($p=0,034$) (Anhang Tabelle A15). Dagegen war im Herzen keine Änderung der AGE-Gehalte zu sehen. Gleichzeitig stieg der Gehalt an oxidativ veränderten Proteinen im Herzen um 48,6% ($p=0,0044$) sowie die Menge des Lipidperoxidationsproduktes MDA um 26,6% ($p=0,02$). Parallel dazu konnte eine Induktion in der Proteinexpression des antioxidativ wirksamen Enzyms Cu/ZnSOD um 29,1% ($p=0,0004$) beobachtet werden (Anhang Tabelle A14). Auf Genexpressionsebene konnte im Herzen weiterhin eine Zunahme von AGE-Rezeptor 1 um 17,5 % ($p=0,03$) sowie des AGE-Rezeptors 2 um 64,2% ($p=0,0001$) und des *Srb1* um 34,2% ($p=0,004$) beobachtet werden (Anhang Tabelle A16). Außerdem zeigte sich eine signifikante 22,4%-ige Verminderung ($p=0,04$) der Expression des Inflammationsmarkers Lipocalin 2.

3.4. Altersabhängige Unterschiede in den zu analysierenden Parametern

Neben der Verabreichung spezifischer Diäten sollte ebenfalls untersucht werden, ob der AGE-Gehalt im Herzen mittels der Intervention Sport beeinflussbar ist. Da laut Literatur die AGE-Gehalte in den meisten Geweben im Alter erhöht sind, wurden für die Versuche gezielt alte Mäuse eingesetzt. Ob die Versuchstiere tatsächlich eine AGE-Anreicherung mit steigendem Alter zeigen, wurde anhand des Vergleiches von jungen (4 Monate) und alten Tieren (24 Monate) überprüft. Gleichzeitig wurden die Tiere auf altersspezifische Unterschiede in den zu analysierenden Parametern untersucht. Betrachtet man die AGE-spezifischen Fluoreszenzen bei 330nm/405nm und 360nm/440nm, so zeigten die alten Tiere sowohl im Serum als auch im Herzen tatsächlich erhöhte Werte (Abb.3.3.). Dabei stieg die Fluoreszenz bei 330nm im Serum um 19,1% ($p=0,0008$) sowie im Herzen um 17,2% ($p=2,8 \cdot 10^{-5}$), verglichen mit den jungen Tieren (Anhang Tabelle A17). Bei 360nm konnte im Serum eine Zunahme von 19,4% beobachtet werden, während im Herzen die Fluoreszenz um 9,8% ($p=0,004$) stieg. Neben der erhöhten Fluoreszenz konnte im Serum auch eine verstärkte Expression von CML (40,7%; $p=0,01$), AGE (37,1%; $p=0,02$), Pentosidin (42,9%, $p=0,04$) und HNE (33,4; $p=0,05$) mit zunehmendem Alter beobachtet werden (Anhang Tabelle A19) während im Herzen lediglich eine Zunahme von AGE um 28,2% ($p=0,02$) gesehen werden konnte.

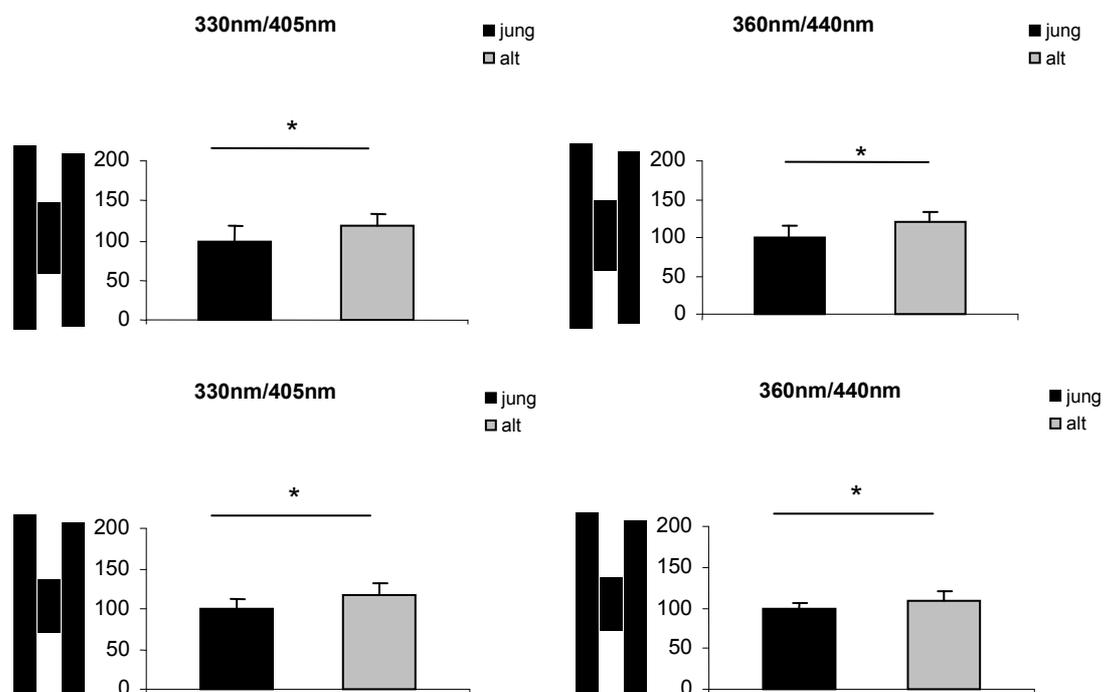


Abb.3.3: AGE-Fluoreszenz in Serum und Herz von jungen und alten C57Bl/6-Mäusen (WT) und RAGE-KO Mäusen MW \pm SD; * signifikant vs. Gruppe jung ($p < 0,05$)

Im Vergleich zu den jungen Versuchstieren, zeigten die alten Mäuse eine geringere Expression von MnSOD und Cu/ZnSOD (Anhang Tabelle A18). Dabei war die Expression der MnSOD signifikant um 28,1% ($p=0,023$) vermindert sowie die der Cu/ZnSOD um 27% ($p=0,04$).

Bei den Genexpressionsanalysen zeigte sich, dass die Expression des Altersmarkers p16 im Herzen von alten Mäusen erwartungsgemäß erhöht war. Dabei konnte ein Expressionsanstieg um 59,2% ($p=8,18 \cdot 10^{-5}$) verzeichnet werden (Anhang Tabelle A20). Weiterhin zeigte sich eine erhöhte Expression der Hypertrophiemarker α -Aktin um 30,1% ($p=0,03$) und β -MHC um 43,1% ($p=0,002$), während α -MHC signifikant um 11,6% ($p=0,044$) gesenkt wurde. Außerdem konnte eine um 60% ($p=0,0002$) signifikant erhöhte Expression des Inflammationsmarkers Lipocalin 2 beobachtet werden.

3.5. Einfluss von diätetisch verabreichten AGEs auf oxidativen Stress und den Gehalt an AGE-Modifikationen im Herz-Kreislaufsystem von C57BL/6- und RAGE-KO-Mäusen

Da Maillardprodukte in erheblichen Mengen über die Nahrung aufgenommen werden, stellt sich die Frage, ob diese zu einer Akkumulation von AGEs im Organismus beitragen können sowie AGE-vermittelte Effekte induzieren. Dass im Falle einer bereits vorliegenden Erkrankung, wie bei Diabetes mellitus oder eingeschränkter Nierenfunktion, die Nahrungs-AGEs zu zusätzlichen Anreicherungen beitragen, ist bekannt. Wie sich jedoch eine erhöhte Zufuhr an AGEs im gesunden Organismus, insbesondere im Herzen, auswirkt, ist weitestgehend ungeklärt. Erkenntnisse dazu sollten in der vorliegenden Arbeit gewonnen werden. Dazu wurden unterschiedliche Nahrungsquellen für die Zufuhr an AGEs sowie als Quelle für die endogene AGE-Bildung (Kaffee, Brotkruste, Fett) gewählt und deren Wirkungen im Herz-Kreislaufsystem untersucht.

3.5.1 Einfluss von diätetisch verabreichtem Kaffee

3.5.1.1. Gewichtsverlauf und Futteraufnahme

Für die Fütterung der Kaffeediät wurden C57Bl/6- (WT) und RAGE-KO-Mäuse im Alter von 15-16 Monaten eingesetzt. Abb.3.3. zeigt die Gewichte der Tiere über den Versuchszeitraum von drei Wochen.

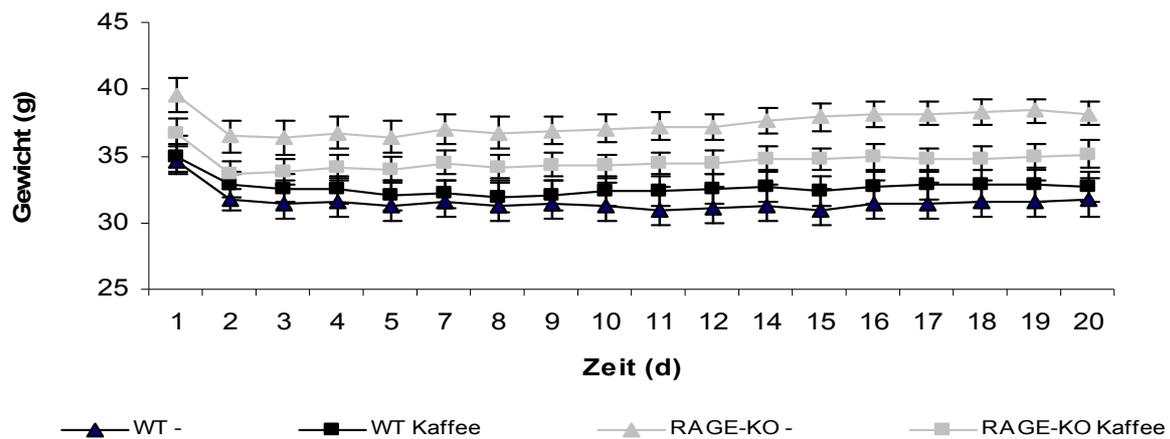
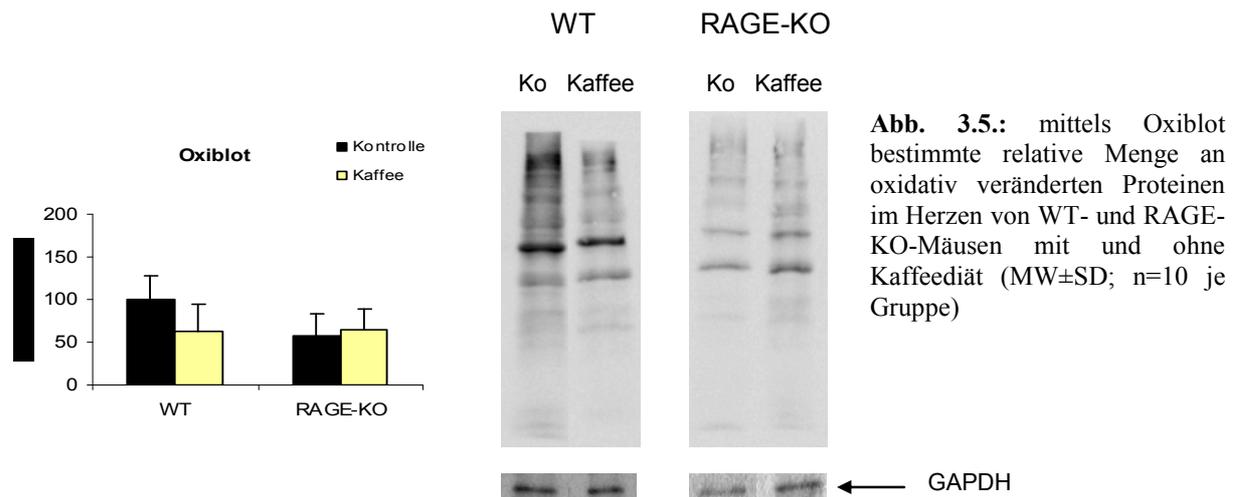


Abb. 3.4.: Gewichtsverlauf der C57Bl/6 (WT)- und RAGE-KO-Mäuse während Fütterung mit Kontroll- und Kaffeefutter über den Zeitraum von 14 Tagen (MW± SEM, n=10 je Gruppe)

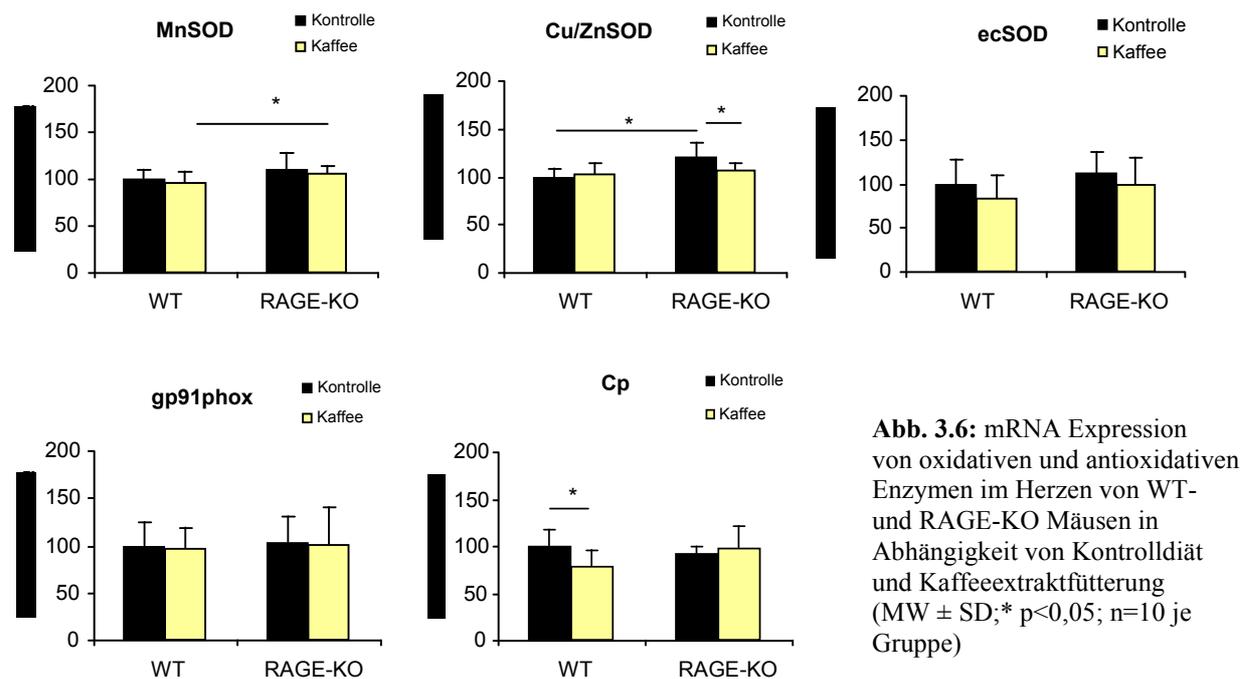
Zu Versuchsbeginn zeigten die RAGE-KO-Mäuse ein signifikant höheres Gewicht im Vergleich zu den WT-Mäusen. In den ersten ein bis zwei Tagen der Fütterung kam es zu einer leichten Gewichtsabnahme zwischen 2-4g als Folge der Umstellung von Standardfutter in Pelletform auf Futter in Pulverform. Aufgrund dessen wurden alle Tiere in Folge fünf Tage vor Versuchsbeginn auf Kontrollpulverfutter gesetzt, um die Umgewöhnung zu gewährleisten. Die täglich verabreichte Futtermenge von 7g orientierte sich an früheren Versuchen in der Arbeitsgruppe. Zur Kontrolle der Futteraufnahme wurde in den ersten Tagen das verbliebene Futter gegen gewogen. Dies konnte nach ein paar Tagen eingestellt werden, da das Futter von den Tieren vollständig verzehrt wurde. Nach der anfänglichen Gewichtsabnahme stellten sich die Tiere schnell auf ein Gewicht ein und hielten dieses über den Versuchszeitraum konstant. Somit kann ein Einfluss des Kaffeeextraktes auf das Gewicht ausgeschlossen werden.

3.5.1.2. Oxidative Stressparameter

Zur Beurteilung des oxidativen Status wurde der Gehalt an Carbonylgruppen als Maß für oxidierte Proteine bestimmt. Wie aus Abb. 3.5. zu entnehmen ist, führte die Kaffeediät nach zwei Wochen zu keiner Veränderung des kardialen Gehaltes an oxidativ veränderten Proteinen, weder bei den WT- noch bei den RAGE-KO-Mäusen.



Neben der Bestimmung oxidativ veränderter Proteine wurde die mRNA-Expression antioxidativer Enzyme (MnSOD, Cu/ZnSOD, EcSOD, Ceruloplasmin (Cp)) sowie der katalytische Untereinheit der NADPH-Oxidase gp91phox mittels RT-PCR bestimmt (Abb.3.6).



Die Kaffeextraktfütterung hatte sowohl bei den WT-Mäusen als auch RAGE-KO-Mäusen keinen Einfluss auf die Expression der MnSOD, ecSOD sowie gp91phox. Weiterhin zeigten die WT-Mäuse keine Veränderung der Cu/ZnSOD-Expression nach Kaffeeverzehr, während bei den RAGE-KO-Mäusen eine 13%-ige Senkung ($p=0,05$) der Cu/ZnSOD-mRNA-Expression nachweisbar war. Die Expression von Cp wurde bei den WT-Mäusen, infolge der Kaffeediät, um 21,3% ($p=0,01$) gesenkt, während die RAGE-KO-Mäuse keine Veränderung der Expression zeigten.

Neben der mRNA-Expression wurde auch die Expression der Enzyme MnSOD und Cu/ZnSOD auf Proteinebene ermittelt.

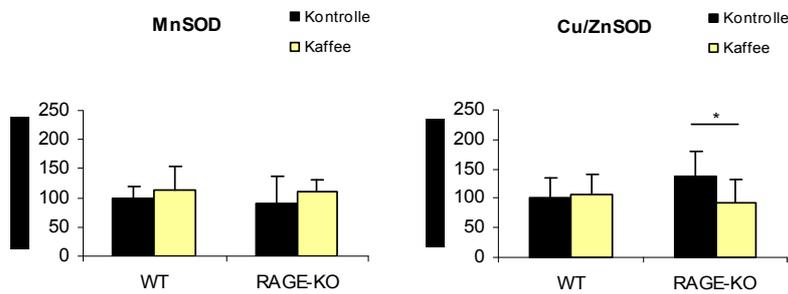
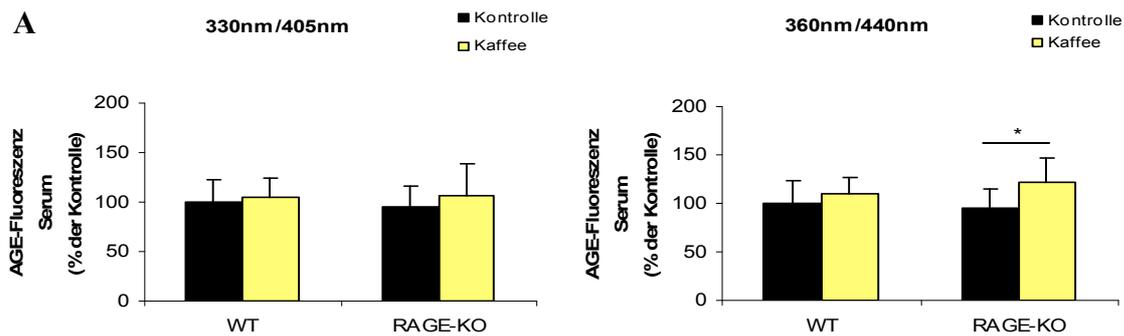


Abb. 3.7.: Proteinexpression der antioxidativen Enzym-systeme MnSOD und Cu/ZnSOD in den Herzen von WT- und RAGE-KO-Mäusen mit und ohne Kaffee fütterung (MW ± SD; * $p < 0,05$; $n = 10$ je Gruppe)

Abb.3.7. zeigt, dass die MnSOD durch Kaffeeextrakt weder bei den WT- noch bei den RAGE-KO-Mäusen beeinflusst wurde. Der Gehalt an Cu/ZnSOD konnte jedoch um 43,2% ($p = 0,046$) in den Herzen der RAGE-KO-Mäuse signifikant gesenkt werden. Dieser Effekt war bei den WT-Mäusen nicht zu beobachten.

3.5.1.3. AGE-spezifische Fluoreszenzen im Serum

Zur Überprüfung der Aufnahme und Anreicherung von AGEs aus dem Kaffeeextrakt, wurde die AGE-spezifische Fluoreszenz (330nm/405nm; 360nm/440nm) gemessen. In Abb.3.8. sind die AGE-Fluoreszenzen im Serum (A) und in den Herzen (B) der Tiere dargestellt.



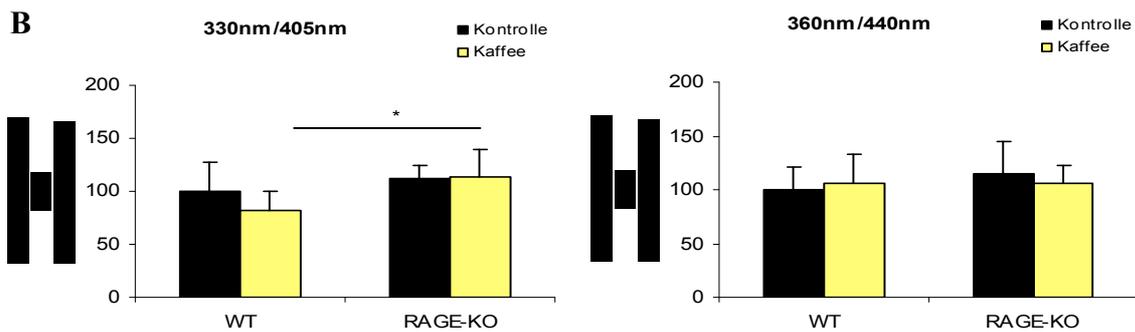


Abb. 3.8.: AGE-Fluoreszenzmessungen im Serum (A) und Herzen (B) der mit Kontroll- und Kaffeediät gefütterten WT-Mäuse und RAGE-KO Mäuse bei einer Extinktion/Emission von 330nm/405nm und 360nm/440nm (MW ± SD; * p<0,05; n=10 je Gruppe)

Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, konnte im Serum weder bei den WT- noch bei den RAGE-KO-Mäusen eine Änderung der Fluoreszenz bei 330nm/405nm nach Fütterung mit Kaffeeextrakt beobachtet werden (A). Bei einer Anregung/Emission von 360nm/440nm war nur bei den RAGE-KO-Mäusen eine signifikante Zunahme der AGE-Fluoreszenz im Serum um 28% zu beobachten (A).

In den Herzen der Mäuse konnte, infolge der Kaffeefütterung, weder bei einer Extinktion von 330nm noch bei 360nm eine Änderung der AGE-Fluoreszenz beobachtet werden (B).

3.5.1.4. AGE-Modifikationen in Serum und Herz

Neben der AGE-Fluoreszenz-Messung (3.1.2.) erfolgte mittels Dotblot und Western Blot auch der Nachweis spezifischer AGE-Modifikation im Serum und Herz der Mäuse.

In Tabelle 3.5. sind die mittels Dotblot gemessenen Gehalte der AGE-Modifikationen Carboxymethyllysin (CML), Malondialdehyd (MDA), Hydroxynonenal (HNE), AGE (Advanced Glycation Endproduct), Arg-Pyrimidin und 3-DG-Imidazolone

Durch Kaffeeextraktfütterung wurde der Gehalt an CML, MDA, HNE, AGE und 3-DG-Imidazolone im Serum der WT- und RAGE-KO-Mäuse nicht beeinflusst. Lediglich der Gehalt an Arg-Pyrimidin konnte infolge der Kaffeefütterung bei den RAGE-KO-Mäusen um 32% (p=0,015) signifikant erhöht werden. Dieser Effekt war bei den WT-Mäusen nicht zu beobachten.

Tabelle 3.5.: mittels Dotblot bestimmte Proteinexpression der untersuchten AGE-Modifikationen im Serum von WT- und RAGE-KO-Mäusen nach zwei Wochen Kaffee fütterung

Dotblot Serum	WT		RAGE-KO	
	Kontrolle	Kaffee	Kontrolle	Kaffee
AGE-Modifikation				
CML	1,00 ± 0,3	1,11 ± 0,3	0,96 ± 0,3	0,87 ± 0,2
MDA	1,00 ± 0,1	0,94 ± 0,2	0,77 ± 0,2*	0,74 ± 0,2
HNE	1,00 ± 0,1	1,03 ± 0,1	1,08 ± 0,2	1,00 ± 0,1
AGE (S006593)	1,00 ± 0,2	1,10 ± 0,2	1,13 ± 0,2	1,23 ± 0,2
Arg-Pyrimidin	1,00 ± 0,4	0,92 ± 0,3	1,22 ± 0,4	1,54 ± 0,3#
3-DG-Imidazolone	1,00 ± 0,2	0,90 ± 0,3	1,48 ± 0,7	1,48 ± 0,3

MW ± SD; * signifikanter Unterschied zur WT-Kontrollgruppe, # signifikanter Unterschied zur RAGE-KO-Kontrollgruppe (p<0.05); n=10 je Gruppe

Mittels Western Blot wurde der Einfluss der Kaffeediät auf den kardialen Gehalt von CML, HNE, MDA und AGE ermittelt (Tabelle 3.6.). Durch die Kaffeextraktdiät konnten die AGE-Modifikationen MDA (38,7 %; p=0,014) und HNE (52,9 %; p=0,039) in den Herzen der RAGE-KO-Mäuse signifikant erhöht werden, wohingegen CML und AGE keine Veränderungen zeigten. Bei den Wildtypmäusen zeigten sich ähnliche Änderungen, die jedoch nicht signifikant waren.

Tabelle 3.6.: mittels Western Blot bestimmte Proteinexpression der untersuchten AGE-Modifikationen im Herzen von WT- und RAGE-KO-Mäusen nach 2 Wochen Kaffee fütterung

Western Blot Herz	WT		RAGE-KO	
	Kontrolle	Kaffee	Kontrolle	Kaffee
AGE-Modifikation				
CML	1,00 ± 0,2	0,90 ± 0,1	0,84 ± 0,2	0,77 ± 0,3
MDA	1,00 ± 0,3	1,11 ± 0,3	0,95 ± 0,1	1,34 ± 0,2#
HNE	1,00 ± 0,2	1,31 ± 0,4	1,13 ± 0,1	1,66 ± 0,3#
AGE (S006593)	1,00 ± 0,3	0,78 ± 0,1	1,00 ± 0,2	0,79 ± 0,2

MW ± SD; * signifikanter Unterschied zur WT-Kontrollgruppe (p<0,05); # signifikanter Unterschied zur RAGE-KO-Kontrollgruppe (p<,05); n=10 je Gruppe

3.4.1.5. Kardiale mRNA-Expression von AGE-spezifischen Rezeptoren, Hypertrophie-, Fibrose- und Inflammationsmarkern

In Tabelle 3.7. sind die mittels PCR gemessenen mRNA-Expressionen der zu analysierenden Gene dargestellt.

Tabelle 3.7.: mRNA-Expression der untersuchten Gene in den Herzen von WT- und RAGE-KO-Mäusen mit und ohne Kaffeezufütterung

mRNA Expression	WT		RAGE-KO	
	Kontrolle	Kaffee	Kontrolle	Kaffee
AGE Rezeptoren				
AGER1	1,00 ± 0,3	1,00 ± 0,2	1,10 ± 0,1	1,10 ± 0,2
AGER2	1,00 ± 0,3	1,00 ± 0,2	0,90 ± 0,3	1,20 ± 0,3#
AGER3	1,00 ± 0,3	0,78 ± 0,2	1,00 ± 0,3	0,90 ± 0,2
SRB1	1,00 ± 0,3	1,00 ± 0,2	1,00 ± 0,2	1,00 ± 0,1
RAGE	1,00 ± 0,2	0,64 ± 0,3*	—	—
Hypertrophie				
α-MHC	1,00 ± 0,1	0,90 ± 0,2	1,10 ± 0,1	1,00 ± 0,1
β-MHC	1,00 ± 0,2	0,94 ± 0,2	1,20 ± 0,3	1,10 ± 0,1
ANF	1,00 ± 0,2	0,93 ± 0,2	1,10 ± 0,2	0,90 ± 0,1#
α-Aktin	1,00 ± 0,3	0,90 ± 0,2	1,10 ± 0,3	0,90 ± 0,2#
Tpm1	1,00 ± 0,1	1,00 ± 0,2	1,22 ± 0,1*	1,00 ± 0,2#
Fibrose				
Collagen 1a1	1,00 ± 0,2	1,02 ± 0,4	0,54 ± 0,2*	0,91 ± 0,4#
Collagen 3a1	1,00 ± 0,3	0,80 ± 0,4	1,10 ± 0,3	1,30 ± 0,3
Fibulin5	1,00 ± 0,2	0,90 ± 0,2	1,00 ± 0,2	0,90 ± 0,1
TGF-β1	1,00 ± 0,4	0,84 ± 0,4	0,67 ± 0,2*	0,94 ± 0,2#
TGF-β3	1,00 ± 0,3	0,91 ± 0,2	0,95 ± 0,2	0,97 ± 0,3
Inflammation				
Lipocalin2	1,00 ± 0,3	0,94 ± 0,3	0,93 ± 0,2	0,94 ± 0,3

MW ± SD; * signifikanter Unterschied zur WT-Kontrollgruppe ($p < 0,05$); # signifikanter Unterschied zur RAGE-KO-Kontrollgruppe ($p < 0,05$); n=10 je Gruppe

Zunächst wurde die Expression der verschiedenen AGE-Rezeptoren ermittelt, um zu überprüfen, ob diese in mögliche kaffeeinduzierte Effekte involviert sind. Durch die diätetische Verabreichung von Kaffee konnte eine Reduktion der Expression des RAGE-Rezeptors bei den WT-Mäusen um 36% ($p=0,022$), beobachtet werden. Die RAGE-KO-Mäuse zeigten erwartungsgemäß keine Expression des RAGE-Rezeptors. Keine Unterschiede waren in der mRNA-Expression von AGE-R1, AGE-R3 und *Srb1* festzustellen. Lediglich der AGE-R2 zeigte eine signifikante Erhöhung seiner Expression um 30% ($p=0,044$) bei den RAGE-KO-Tieren, während die C57Bl/6 (WT)-Mäuse keine Änderung zeigten.

Als Marker für Hypertrophie wurden die Expressionslevel von α -MHC, β -MHC, α -Actin, Tpm1 und ANF ermittelt. Die Expression der beiden MHC-Isoformen blieb nach Fütterung mit Kaffee unverändert. Auch ANF zeigte bei den C57Bl/6 (WT)-Tieren keine kaffeinduzierte Veränderung während bei den RAGE-KO-Tieren eine Senkung um 16% ($p=0,034$) gesehen wurde. Tpm1 und α -Aktin wurden ebenfalls nicht beeinflusst in den Herzen der C57Bl/6 (WT)-Mäuse, wohingegen bei den RAGE-KO-Tieren die Expression beider Gene signifikant gesenkt war - Tpm1 um 20% ($p=0,008$) und α -Aktin um 22% ($p=0,032$). Bei den untersuchten Fibrosemarker Collagen 3a1, Fibulin 5 und TGF- β 3 zeigten weder WT-Mäuse noch RAGE-KO-Mäuse nach Kaffeefütterung signifikante Änderungen. Die Expression von Collagen 1a1 wurde bei den WT-Mäuse ebenfalls nicht beeinflusst, während die RAGE-KO-Mäusen signifikanter Anstieg um 38% ($p=0,023$) verzeichneten. Ebenso war TGF- β 1 nach Kaffeefütterung signifikant um 27% ($p=0,011$) bei den RAGE-KO Mäusen vermindert, während die WT-Mäuse keine Änderung zeigten. Die Expression des Inflammationsmarker Lipocalin 2 wurde durch Kaffee nicht beeinflusst.

3.5.2. Einfluss von diätetisch verabreichter Brotkruste

Um Kurzzeit- und Langzeiteffekte zu erfassen, erfolgten im Rahmen der Brotkrustenfütterung zwei voneinander unabhängige Fütterungen, für drei Tage und vier Wochen. Für beide Versuche wurden C57Bl/6 (WT)-Mäuse (n=20) und RAGE-KO-Mäuse (n=20) im Alter von drei Monaten eingesetzt.

3.5.2.1. Gewichtsverlauf und Blutzuckerspiegel

In Abb.3.9. sind die Gewichtsverläufe der WT- und RAGE-KO-Mäuse während der Versuchszeiträume von drei Tagen (A) und vier Wochen (B) dargestellt.

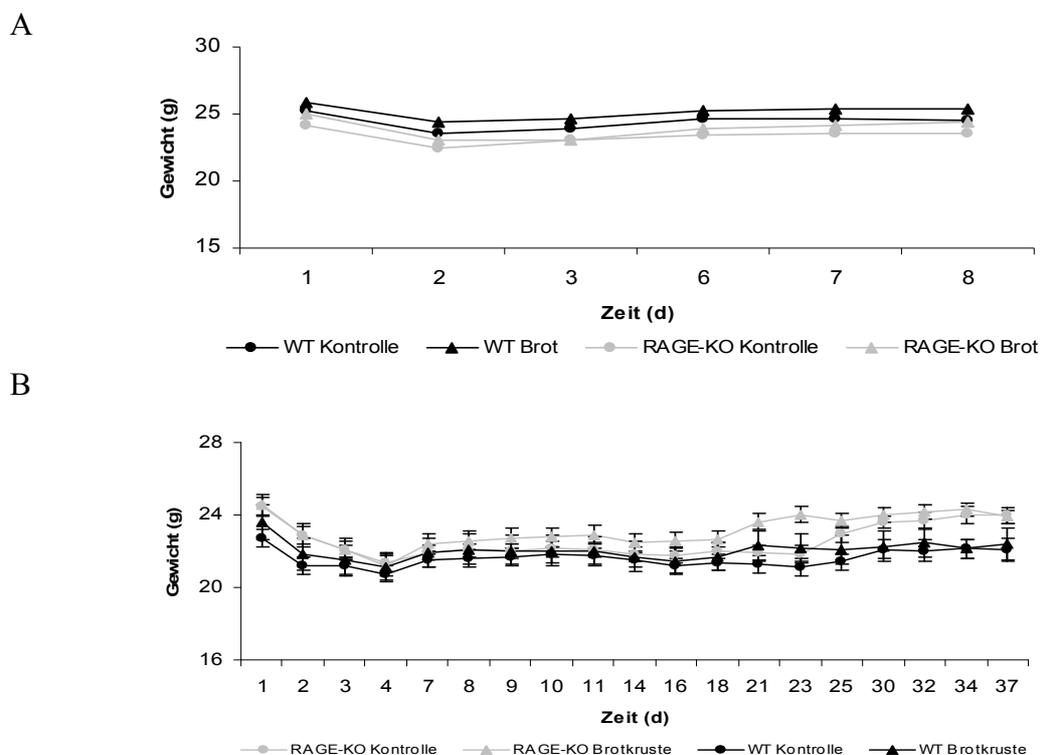


Abb. 3.9.: Gewichtsverlauf der WT- und RAGE-KO-Mäuse während der drei Tage (A) und vier Wochen (B) Brotkrustenfütterung (MW± SEM; n=10 je Gruppe)

Zur Gewöhnung an die Futterumstellung, von Pelletform in Pulverform, erhielten alle Tiere, wie bei der Kaffeediät, zu Versuchsbeginn fünf Tage das Kontrollpulverfutter. Anschließend erfolgte die zufällige Einteilung in Kontroll- und Brotgruppe. Abb.3.9. zeigt, dass bei Umstellung des Futters eine leichte Gewichtsabnahme zu beobachten war. Während des Versuchs normalisierte sich das Gewicht der Tiere und wurde durch die Diät nicht beeinflusst. Zum Zeitpunkt der Tötung erfolgte die Messung der Blutzuckerspiegel. Wie aus Abb.3.10. ersichtlich ist, wurde der Blutzuckerspiegel durch die 3-tägige Brotkrustenfütterung nicht

beeinflusst. Ebenso konnte nach 4 Wochen Brotkrustendiät keine Veränderung der Blutzuckerwerte beobachtet werden.

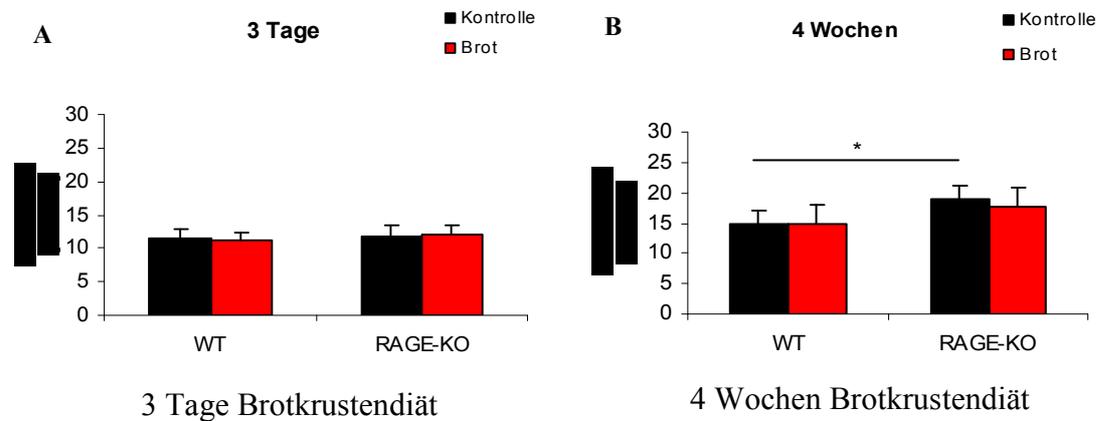


Abb. 3.10. Blutzuckerwerte der WT- und RAGE-KO-Mäuse zum Zeitpunkt der Tötung, nach drei Tagen (A) und vier Wochen (B) Brotkrustenfütterung (MW ± SD; * $p < 0,05$; $n = 10$ je Gruppe)

3.5.2.2. Oxidative Stressparameter

Zur Untersuchung des Einflusses einer Brotkrustenfütterung auf oxidativen Stress im Herz-Kreislaufsystem der WT- und RAGE-KO-Mäuse wurde der Gehalt an Carbonylgruppen als Zeichen oxidativer Veränderungen (Abb 3.11.) sowie die mRNA- und Proteinexpressionen verschiedener oxidativer und antioxidativer Enzyme (Abb. 3.12.A/B) im Herzen bestimmt.

Wie aus Abb. 3.11. ersichtlich ist, hatte die Brotkrustendiät sowohl nach 3 Tagen als auch 4 Wochen keinen Einfluss auf den Gehalt an oxidativ veränderten Proteinen in den Herzen der WT- und RAGE-KO-Mäuse.

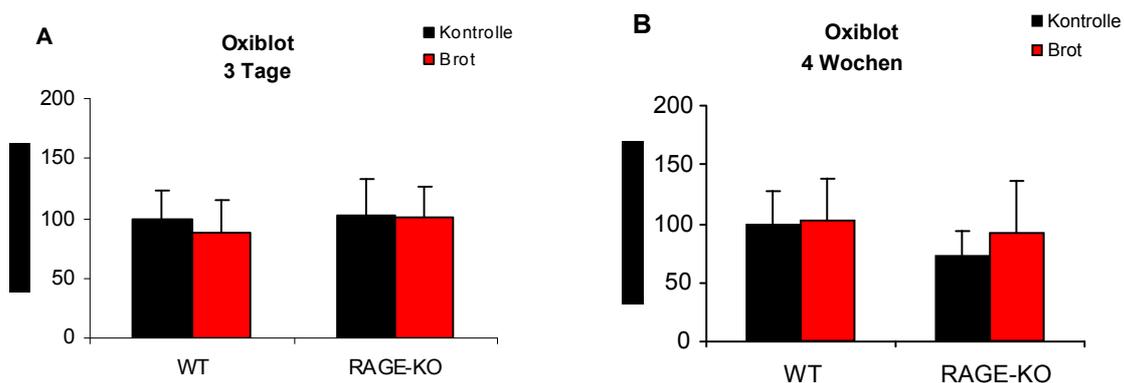


Abb. 3.11.: mittels Oxiblot bestimmte relative Mengen an oxidativ veränderten Proteinen in den Herzen von WT- und RAGE-KO-Mäusen nach drei Tagen (A) und vier Wochen (B) Brotdiät (MW ± SD; $n = 10$ je Gruppe)

Abb.3.12. zeigt die mittels PCR untersuchten mRNA-Expressionen der antioxidativen Enzyme MnSOD, Cu/ZnSOD, EcSOD, Ceruloplasmin (Cp) sowie der als oxidatives Enzym aktiven katalytischen Untereinheit der NADPH-Oxidase-gp91phox.

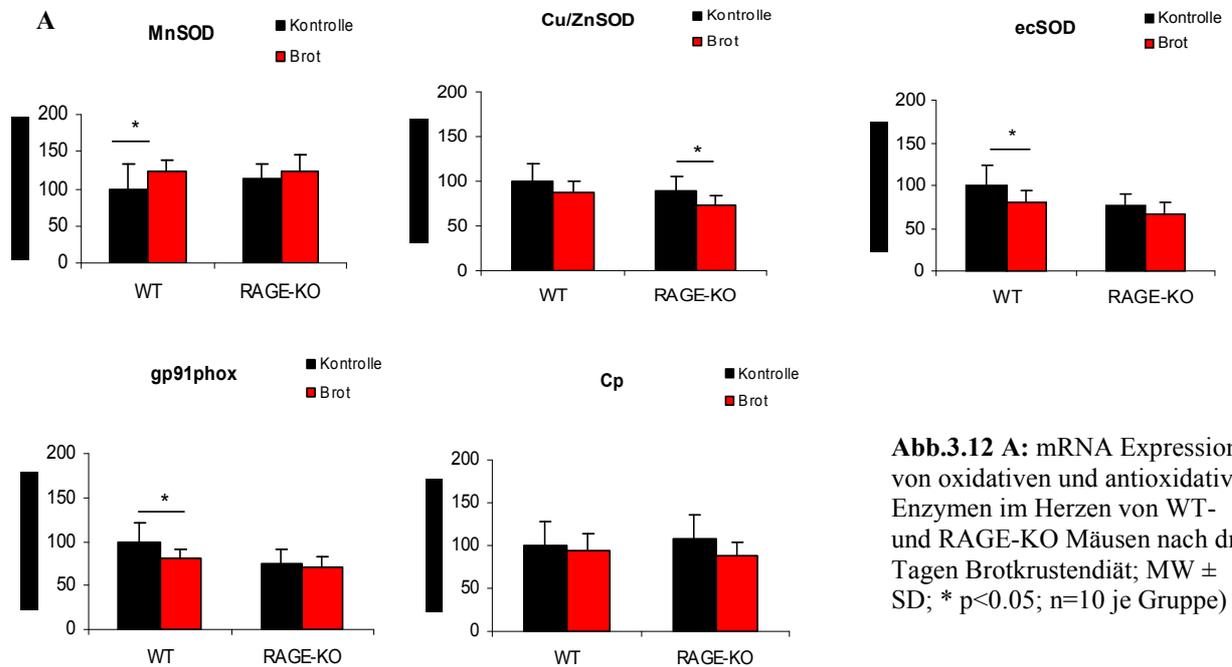
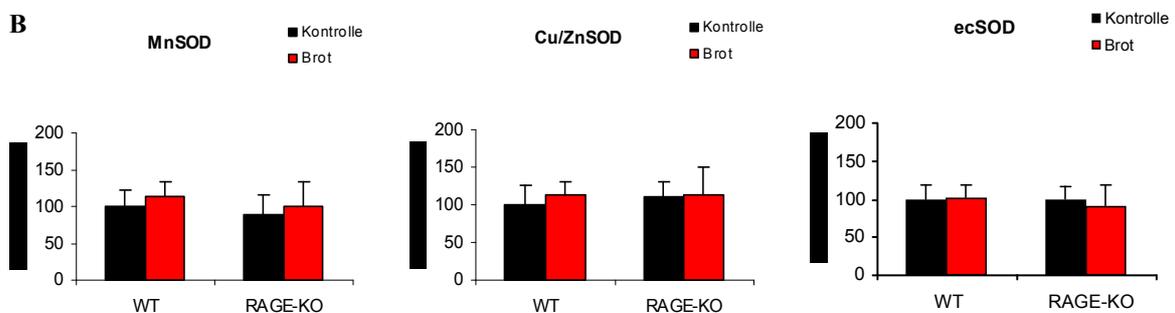


Abb.3.12 A: mRNA Expression von oxidativen und antioxidativen Enzymen im Herzen von WT- und RAGE-KO Mäusen nach drei Tagen Brotkrustendiät; MW ± SD; * p<0.05; n=10 je Gruppe)

Nach dreitägiger Brotkrustenfütterung zeigten die RAGE-KO-Mäuse eine signifikante Verminderung der mRNA-Expression der Cu/ZnSOD um 15,9%, während die Expression der anderen Enzyme unverändert blieb (A). In den Herzen der WT-Mäuse wurde ein signifikanter Anstieg der Expression der MnSOD um 23,2% ($p=0,04$) beobachtet. Bei der Expression der ecSOD sowie der gp91phox verhielt es sich umgekehrt- die Expression der ecSOD sank bei den WT-Mäusen signifikant um 18,8% ($p=0,03$) und die der gp91phox um 19,8% ($p=0,007$) (A). Die Expressionen der Cu/ZnSOD und Ceruloplasmin blieben dagegen unverändert.

Nach vier Wochen Brotkrustendiät zeigten weder die WT-Mäuse noch die RAGE-KO-Mäuse eine Veränderung in der mRNA-Expression der untersuchten Enzyme (B).



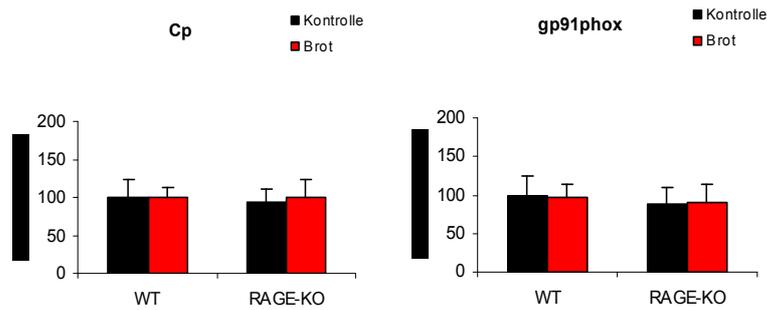


Abb.3.12 B: mRNA Expression von oxidativen und antioxidativen Enzymen im Herzen von WT- und RAGE-KO Mäusen nach vier Wochen Brotkrustendiät; MW \pm SD; * $p < 0,05$; $n = 10$ je Gruppe)

Auf Proteinebene war der Nachweis der Enzyme MnSOD und Cu/ZnSOD möglich. Abb.3.13.A zeigt, dass nach drei Tagen wie auf mRNA-Ebene die Expression der MnSOD bei den WT-Mäusen um 23% ($p = 0,029$) signifikant ansteigt, während die RAGE-KO-Mäuse keine Änderung zeigten. Gleiches konnte für die Cu/ZnSOD beobachtet werden. Auch hier wurde der Gehalt an Cu/ZnSOD bei den RAGE-KO-Mäusen um 22,6% ($p = 0,004$) signifikant gesenkt, während die WT-Mäuse keine Unterschiede zeigten. Ebenso wie auf mRNA-Ebene blieben auch nach vier Wochen Brotkrustendiät die Gehalte an MnSOD und Cu/ZnSOD bei beiden Mausstämmen unverändert (B).

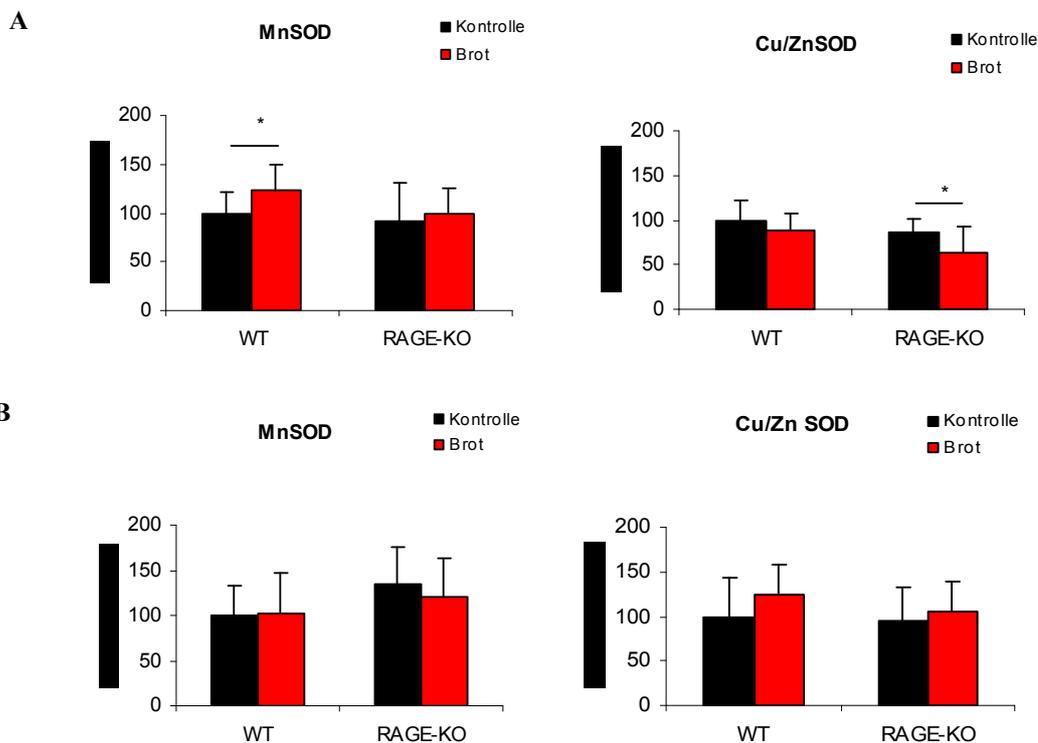


Abb. 3.13.: Proteinexpression der antioxidativen Enzymsysteme MnSOD und Cu/ZnSOD im Herzen von WT und RAGE-KO-Mäusen nach drei Tagen (A) und vier Wochen (B) Brotkrustenfütterung (MW \pm SD; * $p < 0,05$; $n = 10$ je Gruppe)

3.5.2.3. AGE-spezifische Fluoreszenz in Serum und Herz

Abb.3.14. (A-D) zeigt, die bei 330nm/405nm und 360nm/440nm gemessenen AGE-Fluoreszenzen im Serum und Herz der C57Bl/6 (WT)- und RAGE-KO-Mäusen nach drei Tagen und vier Wochen Brotkrustendiät.

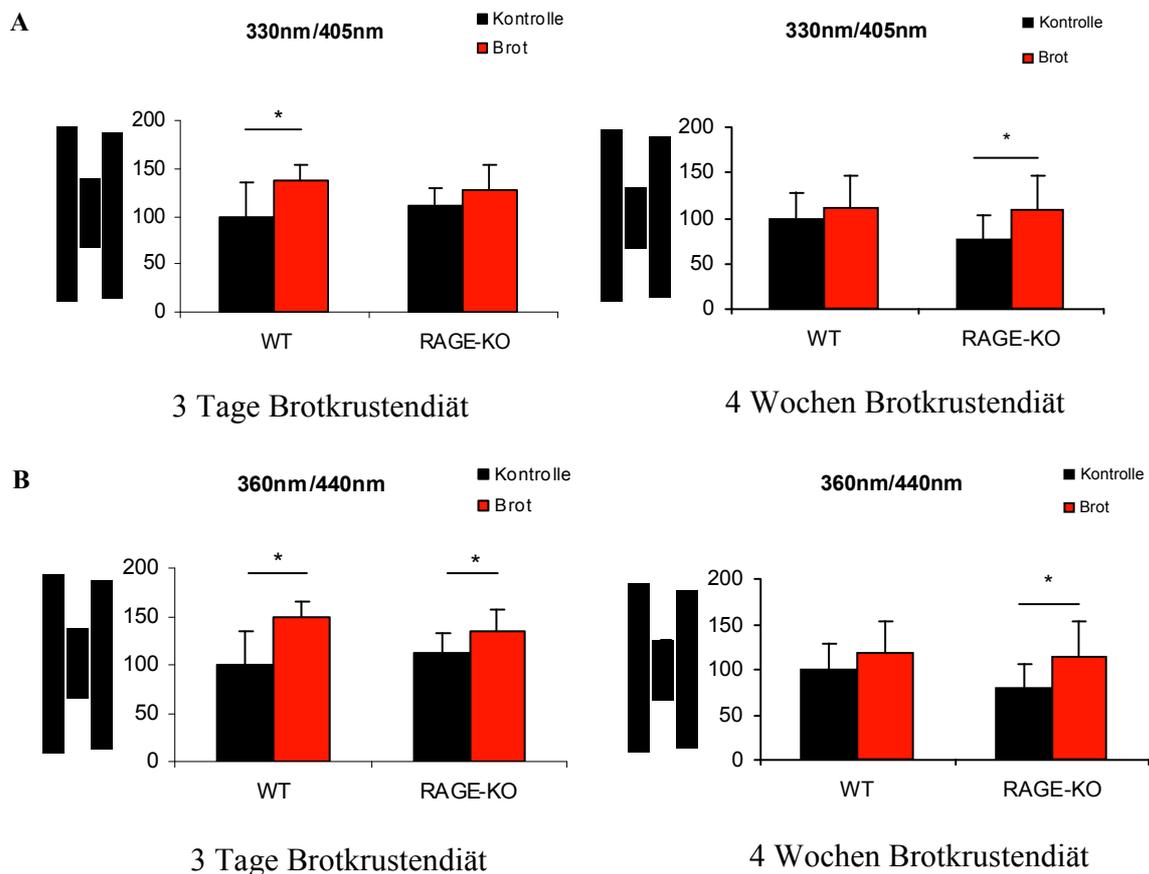


Abb.3.14 A/B.: Fluoreszenzmessung der im Serum enthaltenen AGEs bei 330nm/405nm (A) und 360nm/440nm (B) nach dreitägiger und vierwöchiger Brotkrustendiät (MW±SD; * p<0,05; n=10 je Gruppe)

Nach drei Tagen Brotkrustendiät konnte ein signifikanter Anstieg der AGE-Fluoreszenz bei 330nm/405nm im Serum der WT-Mäuse von 38% (p=0,001) beobachtet werden (A). Die RAGE-KO-Mäuse zeigten ebenfalls einen leichten, jedoch nicht signifikanten Anstieg. Eine signifikante Erhöhung der AGE-Fluoreszenz bei 360nm/440nm konnte im Serum beider Gruppen gemessen werden (A). Dabei stieg die Serum-Fluoreszenz bei den WT-Mäusen um 48,5% (p=0,0001) und bei den RAGE-KO-Mäusen um 21,4 % (p=0,038). Nach vier Wochen Brotfütterung konnte bei 330nm/405nm nur noch im Serum der RAGE-KO-Mäuse ein signifikanter Anstieg von 32,8% (p=0,023) verzeichnet werden (B). Ebenso zeigte sich bei

360nm/440nm eine signifikante Erhöhung nur bei den RAGE-KO-Mäusen um 34,5% ($p=0,034$) (B). Die WT-Mäuse zeigten lediglich einen nicht-signifikanten Anstieg von 18,9%.

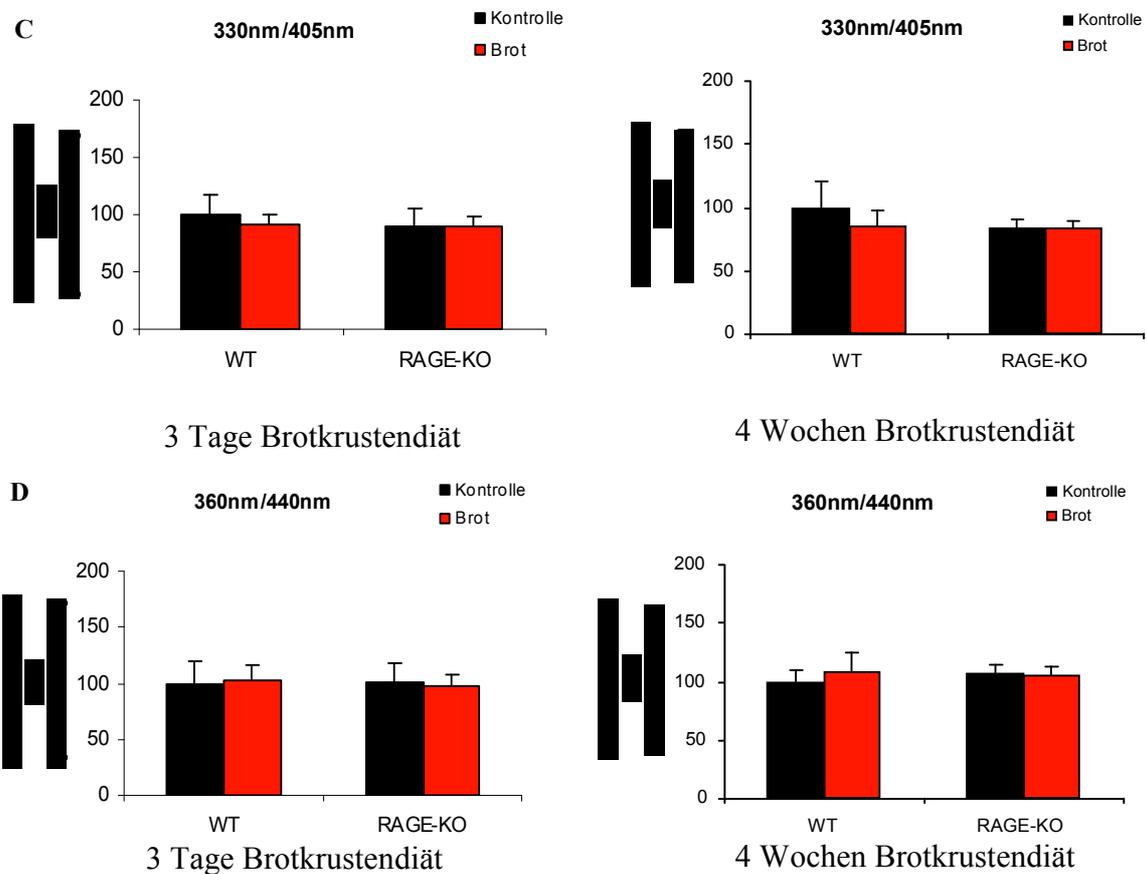


Abb.3.14 C/D.: Fluoreszenzmessung der im Herz enthaltenen AGEs bei 330nm/405nm (C) und 360nm/440nm (D) nach drei Tagen und vier Wochen Brotkrustendiät (MW±SD; * $p<0,05$; $n=10$ je Gruppe)

In den Herzen der WT- und RAGE-KO-Mäuse konnte nach dreitägiger Brotfütterung weder bei 330nm/405nm, noch bei 360nm/440nm eine signifikante Veränderung festgestellt werden (C). Ebenso zeigten sich keine Effekte nach vier Wochen Brotdiät bei Messung der kardialen AGE-Fluoreszenzen von 330nm/405nm und 360nm/440nm (D).

3.5.2.4. Immunohistochemischer Nachweis von Carboxymethyllysine (CML) im Herzgewebe von C57Bl/6-Mäusen nach dreitägiger Brotkrustenfütterung

Zum Nachweis, dass das diätetisch verabreichte Brotkrustenextrakt das Herzgewebe auch erreicht, wurde immunohistochemisch der Gehalt an CML im Herzgewebe der C57Bl/6 (WT)-Mäuse nach dreitägiger Fütterung nachgewiesen, stellvertretend für alle Untersuchungsgruppen. Die Färbung der Präparate erfolgt mittels DAB-Substrat, welches durch Oxidation der Peroxidase am sekundären Antikörper ein braunes Endprodukt bildet. Aus Abb.3.15. ist ersichtlich, dass die Tiere mit Brotkrustendiät (B) eine deutlich stärkere Braunfärbung zeigten, als die Kontrolltiere (A). Dies lässt, im Gegensatz zu den Fluoreszenzwerten (Abb. 3.14), auf einen höheren Gehalt an CML und somit eine Anreicherung aus der Brotkruste im Herzen schließen.

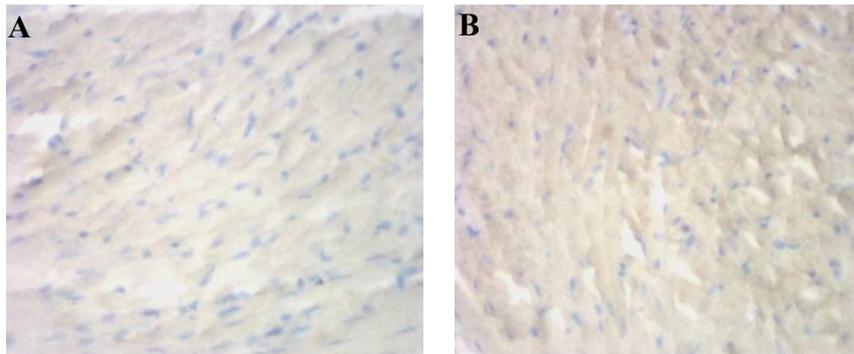


Abb.3.15: Immunohistochemischer Nachweis von CML im Herzen der WT-Mäuse nach drei Tagen Kontrolldiät (A) und Brotkrustendiät (B)

Zur Überprüfung des Einflusses der Brotkrustenfütterung auf den AGE-Gehalt im Serum (3.3.2.6.1.) und Herz (3.3.2.6.2.) wurde neben der Messung der AGE-Fluoreszenz auch die Expression definierter AGE-Modifikationen mittels Dotblot und Western Blot bestimmt.

3.5.2.5. AGE-Modifikationen in Serum und Herz

Im Serum der C57Bl/6 (WT) - und RAGE-KO-Mäuse wurde mittels Dotblot der Gehalt an CML, AGE, Arg-Pyrimidin und 3-DG-Imidazolone nach drei Tagen (Tab.3.8.) und vier Wochen (Tab.3.9.) Brotkrustendiät ermittelt.

Tabelle 3.8.: mittels Dotblot bestimmte Proteinexpression der untersuchten AGE-Modifikationen im Serum von WT- und RAGE-KO-Mäusen nach drei Tagen Brotkrustenfütterung

<i>Dotblot Serum</i>	WT		RAGE-KO	
Proteinexpression	Kontrolle	Brot	Kontrolle	Brot
AGE-Modifikation				
CML	1,00 ± 0,1	0,93 ± 0,2	0,95 ± 0,2	0,94 ± 0,2
AGE (S006593)	1,00 ± 0,1	1,05 ± 0,2	1,03 ± 0,2	1,20 ± 0,4*
Arg-Pyrimidin	1,00 ± 0,2	1,28 ± 0,3	1,15 ± 0,3	1,16 ± 0,4
3-DG-Imidazolone	1,00 ± 0,3	1,10 ± 0,3	1,27 ± 0,2*	1,43 ± 0,4*

MW ± SD; *signifikanter Unterschied zur WT-Kontrolle (p<0,05); # signifikanter Unterschied zur RAGE-KO-Kontrolle (p<0,05); n=10 je Gruppe

Nach drei Tagen Brotkrustendiät konnte weder bei den WT - noch bei den RAGE-KO-Mäusen eine Veränderung im Gehalt der untersuchten Modifikationen gesehen werden (Tab.3.8).

Tabelle 3.9.: mittels Dotblot bestimmte Proteinexpression der untersuchten AGE-Modifikationen im Serum von WT- und RAGE-KO-Mäusen nach vier Wochen Brotkrustenfütterung

<i>Dotblot Serum</i>	WT		RAGE-KO	
Proteinexpression	Kontrolle	Brot	Kontrolle	Brot
AGE-Modifikation				
CML	1,00 ± 0,2	1,13 ± 0,2	0,99 ± 0,1	1,12 ± 0,3
AGE (S006593)	1,00 ± 0,2	1,00 ± 0,2	1,13 ± 0,2	1,06 ± 0,2
Arg-Pyrimidin	1,00 ± 0,3	0,80 ± 0,1*	0,97 ± 0,2	0,79 ± 0,2#
3-DG-Imidazolone	1,00 ± 0,3	0,97 ± 0,4	0,75 ± 0,3*	0,87 ± 0,3

MW ± SD; *signifikanter Unterschied zur WT-Kontrolle (p<0,05); # signifikanter Unterschied zur RAGE-KO-Kontrolle (p<0,05); n=10 je Gruppe

Durch die Brotkrustendiät über vier Wochen wurde die Expression von Arg-Pyrimidin signifikant bei den WT-Mäusen (20,1%; p=0,05) und RAGE-KO-Mäusen (17,5%; p=0,04) gesenkt (Tab.3.9.). Keine Veränderung war in der Expression von CML, AGE und 3-DG-Imidazolone zu beobachten.

Im Herzen der Tiere wurde der Gehalt an spezifischen AGE-Modifikationen mittels Dotblot (Tab. 3.10.) und Western Blot (Tab. 3.11.) bestimmt.

Tabelle 3.10.: mittels Dotblot bestimmte Proteinexpression der untersuchten AGE-Modifikationen in Herzen der WT- und RAGE-KO-Mäusen nach drei Tagen Brotkrustenfütterung

<i>Dotblot Herz</i>	WT		RAGE-KO	
Proteinexpression	Kontrolle	Brot	Kontrolle	Brot
AGE-Modifikation				
CML	1,00 ± 0,1	1,02 ± 0,3	1,07 ± 0,3	1,04 ± 0,2
Arg-Pyrimidin	1,00 ± 0,2	0,72 ± 0,2*	0,70 ± 0,2*	0,63 ± 0,2*
3-DG-Imidazolone	1,00 ± 0,3	0,79 ± 0,2	0,75 ± 0,2	0,73 ± 0,2
MDA	1,00 ± 0,2	0,98 ± 0,2	0,83 ± 0,1	0,95 ± 0,2

MW ± SD; *signifikanter Unterschied zur WT-Kontrolle; # signifikanter Unterschied zur RAGE-KO-Kontrolle (p<0,05); n=10 je Gruppe

Mit Hilfe des Dotblots erfolgte der Nachweis der Modifikationen CML, Arg-Pyrimidin, 3-DG-Imidazolone und MDA in den Herzen der C57Bl/6 (WT)- und RAGE-KO-Mäuse nach drei Tagen (Tab.3.10.) und vier Wochen Brotkrustendiät (Tab.3.11.). Nach dreitägiger Brotkrustenfütterung zeigten die WT-Mäuse keine Veränderung in der kardialen Expression von CML, 3-DG-Imidazolone und MDA. Lediglich eine signifikante Abnahme in der Expression von Arg-Pyrimidin, um 28%, war zu beobachten. Bei den RAGE-KO Mäusen zeigte sich mittels Dotblot bei keiner der untersuchten Modifikationen eine Veränderung durch Brotkruste.

Tabelle 3.11.: mittels Dotblot bestimmte Proteinexpression der untersuchten AGE-Modifikationen in Herzen der WT- und RAGE-KO-Mäusen nach vier Wochen Brotkrustenfütterung

<i>Dotblot Herz</i>	WT		RAGE-KO	
Proteinexpression	Kontrolle	Brot	Kontrolle	Brot
AGE-Modifikation				
CML	1,00 ± 0,1	0,91 ± 0,1	1,20 ± 0,4	1,17 ± 0,3
Arg-Pyrimidin	1,00 ± 0,1	0,98 ± 0,1	1,14 ± 0,1	1,15 ± 0,3
3-DG-Imidazolone	1,00 ± 0,3	1,09 ± 0,4	1,02 ± 0,3	1,06 ± 0,3
MDA	1,00 ± 0,2	1,03 ± 0,3	1,09 ± 0,2	1,08 ± 0,1

MW ± SD; *signifikanter Unterschied zur WT-Kontrolle (p<0,05); # signifikanter Unterschied zur RAGE-KO-Kontrolle (p<0,05); n=10 je Gruppe

Nach vier Wochen Brotkrustenfütterung konnte weder bei den WT- noch bei den RAGE-KO-Tieren eine Veränderung in den analysierten Expressionen mittels Dotblot gemessen werden

(Tab.3.10.). Unterschiede in den Analysen mittels Histochemie und den folgenden Dot-Blot-Analysen könnten durch die notwendige Aufarbeitung der Proteine erklärt werden. Bei dieser verliert man große Teile an quervernetzten Matrixproteinen, die sich aber CML (AGE) – reich im Schnitt darstellen.

In Tabelle 3.12. und 3.13. sind die mittels Western Blot gemessenen Gehalte an CML, AGE, Arg-Pyrimidin, MDA und 3-DG-Imidazolone dargestellt.

Tabelle 3.12.: mittels Western Blot bestimmte Proteinexpression der untersuchten AGE-Modifikationen in Herzen der WT- und RAGE-KO-Mäuse nach drei Tagen Brotkrustenfütterung

Western Blot Herz	WT		RAGE-KO	
	Kontrolle	Brot	Kontrolle	Brot
AGE-Modifikation				
CML	1,00 ± 0,2	0,97 ± 0,4	1,56 ± 0,6	1,28 ± 0,4
AGE (S006593)	1,00 ± 0,3	0,94 ± 0,3	1,17 ± 0,4	1,15 ± 0,3
Arg-Pyrimidin	1,00 ± 0,3	1,42 ± 0,3*	1,73 ± 0,3*	1,53 ± 0,5*
3-DG-Imidazolone	1,00 ± 0,4	1,55 ± 0,5*	1,26 ± 0,6	1,71 ± 0,5*
MDA	1,00 ± 0,3	1,14 ± 0,4	1,30 ± 0,3	1,18 ± 0,3

MW ± SD; *signifikanter Unterschied zur WT-Kontrolle; # signifikanter Unterschied zur RAGE-KO-Kontrolle (p<0,05); n=10 je Gruppe

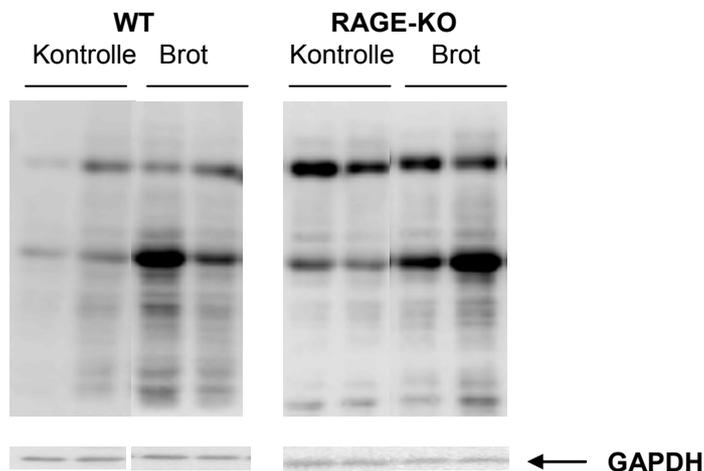


Abb. 3.16.: repräsentatives Bild für den Nachweis mittels Western Blot von 3-DG-Imidazolone im Herzen von WT- und RAGE-KO-Mäusen nach drei Tagen Brotkrustendiät. Dabei wurden die Proben auf GAPDH normiert

Nach drei Tagen Brotkrustenfütterung zeigten die WT-Mäuse einen signifikanten Anstieg der Expression von Arg-Pyrimidin um 42% und 3-DG-Imidazolone um 55% (Tab.3.12). Die Expression von CML, AGE und MDA blieb unverändert. Bei den RAGE-KO-Mäusen

unterschieden sich die Expressionen der gemessenen AGEs nach 3-tägiger Brotextraktdiät nicht von denen der Kontrollgruppe.

Tabelle 3.13.: mittels Western Blot bestimmte Proteinexpression der untersuchten AGE-Modifikationen in Herzen der WT- und RAGE-KO-Mäusen nach vier Wochen Brotkrustenfütterung

Western Blot Herz	WT		RAGE-KO	
	Kontrolle	Brot	Kontrolle	Brot
AGE-Modifikation				
CML	1,00 ± 0,3	1,30 ± 0,4	1,86 ± 0,5*	1,62 ± 0,3*
AGE (S006593)	1,00 ± 0,2	0,91 ± 0,3	1,05 ± 0,1	1,51 ± 0,3*#
Arg-Pyrimidin	1,00 ± 0,1	1,50 ± 0,4*	1,58 ± 0,3*	1,77 ± 0,3*
MDA	1,00 ± 0,2	0,89 ± 0,3	0,71 ± 0,2*	0,92 ± 0,1#

MW ± SD; *signifikanter Unterschied zur WT-Kontrolle; # signifikanter Unterschied zur RAGE-KO-Kontrolle (p<0,05); n=10 je Gruppe

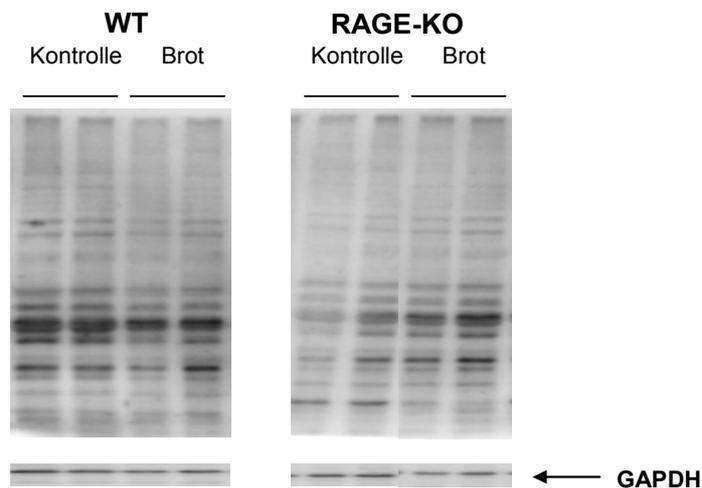


Abb. 3.17.: repräsentatives Bild für den Nachweis mittels Western Blot von MDA im Herzen von WT- und RAGE-KO-Mäusen nach 4 Wochen Brotkrustendiät. Dabei wurden die Proben auf GAPDH normiert

Nach vier Wochen Brotkrustendiät konnte keine Änderung im Gehalt an CML und Arg-Pyrimidin in den Gruppen beobachtet werden (Tab.3.13.). Der Gehalt an AGE (46%) und MDA (21%) wurde in den Herzen der RAGE-KO-Mäuse signifikant erhöht. Bei den WT-Mäusen war dies nicht zu sehen. Hier konnte lediglich eine signifikante Zunahme von Arg-Pyrimidin um 50% beobachtet werden.

3.5.2.5. Kardiale mRNA-Expression AGE-spezifischer Rezeptoren, Hypertrophie-, Fibrose- und Inflammationsmarker

Tabelle 3.14. und 3.15. zeigen die relativen mRNA-Expressionen der analysierten Gene, mit und ohne eine Brotkrustendiät, für drei Tage und vier Wochen.

Tabelle 3.14.: mRNA-Expression der untersuchten Gene in Herzen der WT- und RAGE-KO-Mäuse nach drei Tagen Brotkrustendiät

mRNA Expression	WT		RAGE-KO	
	Kontrolle	Brot	Kontrolle	Brot
AGE-Rezeptoren				
AGE-R1	1,00 ± 0,3	0,79 ± 0,2	0,75 ± 0,2*	0,73 ± 0,2*
AGE-R2	1,00 ± 0,1	0,75 ± 0,1*	0,81 ± 0,1	0,76 ± 0,1*
AGE-R3	1,00 ± 0,6	0,76 ± 0,4	0,77 ± 0,4	0,65 ± 0,4
Srb1	1,00 ± 0,2	0,83 ± 0,2*	0,86 ± 0,3	0,81 ± 0,1*
RAGE	1,00 ± 0,5	0,80 ± 0,4	-	-
Hypertrophie				
α MHC	1,00 ± 0,2	0,85 ± 0,1*	0,91 ± 0,2	0,87 ± 0,2*
β MHC	1,00 ± 0,3	0,96 ± 0,4	0,88 ± 0,3	0,87 ± 0,2
ANF	1,00 ± 0,3	0,81 ± 0,2*	1,00 ± 0,3	0,74 ± 0,1*#
Tpm1	1,00 ± 0,3	0,90 ± 0,2	1,02 ± 0,3	0,80 ± 0,1
α-Aktin	1,00 ± 0,6	0,57 ± 0,4*	0,45 ± 0,1*	0,56 ± 0,2*
Fibrose				
Collagen 1a1	1,00 ± 0,3	0,62 ± 0,2*	0,61 ± 0,2*	0,64 ± 0,1*
Collagen 3a1	1,00 ± 0,4	0,60 ± 0,2*	0,59 ± 0,2*	0,62 ± 0,1*
Fibulin 5	1,00 ± 0,3	0,78 ± 0,2*	0,73 ± 0,2*	0,74 ± 0,1*
TGF β1	1,00 ± 0,4	0,86 ± 0,2	0,86 ± 0,3	0,76 ± 0,2
TGF β3	1,00 ± 0,2	0,85 ± 0,1*	0,84 ± 0,2*	0,76 ± 0,1*
Inflammation				
Lipocalin2	1,00 ± 0,3	1,34 ± 0,3*	0,97 ± 0,2	1,02 ± 0,3

MW ± SD; * signifikant vs. WT-Kontrollgruppe; # signifikant vs. RAGE-KO-Kontrollgruppe (p<0,05); n=10 je Gruppe

Zur Überprüfung des Einflusses von Brotkrustenextrakt auf die Expression von AGE-bindenden Rezeptoren wurden die relativen mRNA-Konzentrationen von AGE-R1, AGE-R2, AGE-R3, Srb1 und RAGE bestimmt. Im Falle der 3-Tage-Fütterung konnte eine signifikante Senkung der mRNA-Expression von AGE-R2 (25%; p=0,02) sowie von Srb1 (17%; p=0,03) bei den WT-Mäusen beobachtet werden. Keine Änderung zeigten die WT-Mäuse in der kardialen Expression von AGE-R1, AGE-R3 sowie RAGE. Bei den RAGE-KO-Mäusen war keine Änderung in der Expression der untersuchten Rezeptoren zu finden. Wie erwartet, zeigten die RAGE-KO-Mäuse auch keine Expression des RAGE-Rezeptors. Nach vier Wochen Brotkrustendiät konnte lediglich eine Senkung der mRNA-Expression von RAGE, in Höhe von 33% (p=0,013), bei den WT-Mäusen beobachtet werden. Alle anderen AGE-Rezeptoren konnten weder bei den WT-Mäusen noch bei den RAGE-KO-Mäusen, durch die Brotkrustendiät verändert werden.

Als Marker für Hypertrophie wurden α-MHC, β-MHC, ANF, α-Aktin sowie Tpm1 bestimmt. Nach drei Tagen konnte eine signifikante Senkung von α-MHC (15%, p=0,05) und ANF

(19%; $p=0,049$) in den Herzen der WT-Mäuse beobachtet werden, wohingegen β -MHC unverändert blieb. Zusätzlich zeigten die WT-Mäuse eine signifikante Abnahme von α -Actin (43%; $p=0,04$), wohingegen *Tpm1* unverändert blieb. Bei den RAGE-KO-Mäusen konnte ebenfalls infolge der Brotkrustendiät die Expression von ANF signifikant um 26% ($p=0,026$) gesenkt werden, während α -MHC, β -MHC, α -Aktin und *Tpm1* unverändert blieben.

Tabelle 3.15.: mRNA-Expression der untersuchten Gene in Herzen der WT- und RAGE-KO-Mäuse nach vier Wochen Brotkrustendiät

mRNA Expression	WT		RAGE-KO	
	Kontrolle	Brot	Kontrolle	Brot
AGE-spezifische Rezeptoren				
AGE-Rezeptor 1	1,00 ± 0,2	1,00 ± 0,2	0,93 ± 0,1	0,84 ± 0,1*
AGE-Rezeptor 2	1,00 ± 0,1	1,03 ± 0,1	0,76 ± 0,2*	0,95 ± 0,2
AGE-Rezeptor 3	1,00 ± 0,3	0,91 ± 0,4	0,79 ± 0,3	0,82 ± 0,3
Srb1	1,00 ± 0,2	1,02 ± 0,3	0,91 ± 0,3	0,94 ± 0,2
RAGE	1,00 ± 0,3	0,67 ± 0,2*	-	-
Hypertrophie				
α -MHC	1,00 ± 0,2	1,31 ± 0,4*	1,07 ± 0,2	1,08 ± 0,2
β -MHC	1,00 ± 0,2	1,01 ± 0,1	0,90 ± 0,2	1,18 ± 0,2#
ANF	1,00 ± 0,3	0,78 ± 0,1	0,91 ± 0,2	1,01 ± 0,3
<i>Tpm1</i>	1,00 ± 0,2	1,02 ± 0,2	1,00 ± 0,2	0,90 ± 0,3
α -Aktin	1,00 ± 0,3	0,87 ± 0,4	0,91 ± 0,2	0,84 ± 0,3
Fibrose				
Collagen 1	1,00 ± 0,5	1,07 ± 0,4	0,44 ± 0,2*	0,67 ± 0,3
Collagen 3	1,00 ± 0,3	0,70 ± 0,2*	0,68 ± 0,2*	0,73 ± 0,4
Fibulin5	1,00 ± 0,2	0,80 ± 0,1*	0,84 ± 0,1	0,63 ± 0,2*
TGF β 1	1,00 ± 0,2	1,03 ± 0,3	0,78 ± 0,2	0,92 ± 0,4
TGF β 3	1,00 ± 0,1	0,99 ± 0,2	0,73 ± 0,2*	0,78 ± 0,2*
Inflammation				
Lipocalin 2	1,00 ± 0,4	1,4 ± 0,3	0,65 ± 0,1*	0,77 ± 0,3

MW±SD; * signifikant vs. WT Kontrollgruppe ($p<0,05$); # signifikant vs. RAGE-KO Kontrollgruppe ($p<0,05$); $n=10$ je Gruppe

Nach vier Wochen Brotkrustendiät stieg die Expression von α -MHC weiter um 31% ($p=0,03$) bei den WT-Mäusen an, während der Gehalt bei den RAGE-KO-Mäuse unverändert blieb. Allerdings zeigten die RAGE-KO-Mäuse einen signifikanten Anstieg in der Expression von β -MHC (28%; $p=0,009$).

Im Rahmen der Genexpressionsanalysen wurden ebenfalls die Expressionen verschiedener Fibrosemarker (Collagen1a1, Collagen3a1, Fibulin5, TGF- β 1, TGF- β 3) analysiert. So konnte nach dreitägiger Brotkrustendiät bei den WT-Mäusen eine signifikante Abnahme der Expression von Collagen1a1 (38%; $p=0,002$), Collagen3a1 (40%; $p=0,003$), Fibulin 5 (22%; $p=0,02$) und TGF- β 3 (15%; $P=0,03$) beobachtet werden, während TGF- β 1 unverändert blieb.

Im Gegensatz dazu, konnte bei den RAGE-KO-Mäusen keine Änderung der mRNA-Expression in den untersuchten Fibrosemarker gesehen werden. Nach vierwöchiger Brotkrustendiät war bei den WT-Mäusen nur noch eine signifikante Senkung der mRNA-Expression von Collagen 3a1 (30%; $p=0,03$) und Fibulin 5 (20%) zu beobachten. Bei den RAGE-KO-Mäusen waren keine Veränderungen in der mRNA-Expression der Fibrosemarker zu erkennen. Die kardiale mRNA-Expression des Inflammationsmarkers Lipocalin 2 konnte bei den WT-Mäusen nach drei Tagen Brotkrustendiät um 34% ($p=0,03$) erhöht werden, während die RAGE-KO-Mäuse keine Änderung zeigten. Nach vier Wochen blieb die Lipocalin2 Expression unverändert.

3.5.3. Einfluss einer fettreichen Diät

Im Rahmen der Fettstudie erhielten die C57Bl/6 (WT-)Mäuse und RAGE-KO-Mäuse über einen Zeitraum von vier Monaten eine Diät mit 60% Energie aus Fett. Mittels der Diät sollte der Einfluss einer fettreichen Ernährung auf die endogene AGE-Bildung und -Anreicherung untersucht werden. Zu Studienbeginn waren die Tiere im Alter von vier Monaten.

3.5.3.1. Gewichtsverlauf, Organgewichte, Blutzucker, Insulin, Cholesterin und Triglyzeride (TG)

In Tabelle 3.16. sind die Gewichte der WT- und RAGE-KO-Mäuse zu Beginn und bei Beendigung der viermonatigen Studie dargestellt.

Zu Versuchsbeginn hatten die WT-Mäuse und RAGE-KO-Mäuse ein ähnliches Gewicht. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen konnte sowohl bei den WT- als auch RAGE-KO-Mäuse mit der Fettdiät vergleichbare und signifikant höhere Gewichte bei Versuchsende erzielt werden.

Tabelle 3.16.: Gewicht zu Versuchsbeginn und Versuchsende

	WT		RAGE-KO	
	Kontrolle	Fett	Kontrolle	Fett
Gewicht(g)				
Versuchsbeginn	25,1 ± 2,4	24,7 ± 2,2	24,6 ± 0,8	25,7 ± 1,3
Versuchsende	28,5 ± 1,8	44,4 ± 3,7*	29,7 ± 2,9	45,0 ± 2,8*

MW ± SD; * signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle ($p<0.05$)

Neben dem Körpergewicht wurden zum Zeitpunkt der Tötung ebenfalls die Gewichte von Herz, Lunge, Leber und Niere ermittelt. Um einen Einfluss der fettreichen Diät auf die Organgewichte zu überprüfen, wurde das Verhältnis von Organgewicht zu Körpergewicht berechnet (Tabelle 3.17.). Das Verhältnis von Herz, Lunge und Niere zum Körpergewicht war nach fettreicher Fütterung in beiden Tiergruppen signifikant gesenkt. Die Senkung ergibt sich aus einer Zunahme des Körpergewichtes. Das Verhältnis von Lebergewicht zu Körpergewicht war hingegen bei den WT-Mäusen, infolge der Fettfütterung, unverändert und bei den RAGE-KO-Mäusen sogar signifikant erhöht. Dies zeigt, dass neben dem Körpergewicht auch das Lebergewicht durch die fettreiche Ernährung ansteigt.

Tabelle 3.17.: Verhältnis von Organgewicht/KG, Blutzucker, Serumgehalte an Insulin, Cholesterin, Triglyceriden von WT- und RAGE-KO-Mäusen, mit und ohne Fettdiät

	WT		RAGE-KO	
	Kontrolle	Fett	Kontrolle	Fett
Organgewicht/KG				
Herz/KG(g)	0,0047 ± 0,0006	0,0030 ± 0,0004*	0,0043 ± 0,0003	0,0032 ± 0,0002 #
Lunge/KG(g)	0,0060 ± 0,0006	0,0046 ± 0,0007*	0,0063 ± 0,0004	0,0047 ± 0,0006 #
Niere/KG(g)	0,0129 ± 0,0016	0,0085 ± 0,0009*	0,0116 ± 0,0010	0,0084 ± 0,0015 #
Leber/KG(g)	0,0440 ± 0,0080	0,0380 ± 0,0100	0,0430 ± 0,0030	0,0610 ± 0,0120 #
Blutzucker (mmol/l)	13,3 ± 2,1	16,1 ± 2,5*	13,9 ± 1,3	16,5 ± 2,2 #
Insulin (µg/l)	0,380 ± 0,07	0,689 ± 0,24*	0,411 ± 0,07	2,875 ± 1,77 #*
Cholesterin (mg/dl)	104,4 ± 25,3	158,5 ± 28,5*	145,1 ± 30,3*	237,3 ± 34,5 #*
Triglyceride (mg/dl)	64,2 ± 14,8	94,7 ± 23,3*	73,8 ± 9,4	90,1 ± 16,6 #

MW ± SD; * signifikanter Unterschied vs. WT-Kontrolle; # signifikanter Unterschied vs. RAGE-KO-Kontrolle (p<0,05); KG=Körpergewicht

Des Weiteren führte die fettreiche Diät sowohl bei den WT- als auch RAGE-KO-Mäuse zu signifikant erhöhten Blutzuckerwerten. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen konnte auch ein signifikanter Anstieg der Insulinwerte im Serum, infolge der Fettfütterung, in beiden Gruppen beobachtet werden. Dieser fiel bei den RAGE-KO-Mäusen (2,875µg/l) vierfach höher aus als bei den WT-Mäusen (0,689µg/l).

Zur Untersuchung des Einflusses der fettreichen Diät auf den Fettstoffwechsel wurden die Konzentrationen von Cholesterin und Triglyceriden (TG) im Serum der Tiere bestimmt. Die Fütterung mit Fett führte bei den WT-Mäusen zu einem Anstieg der Triglyceridkonzentration im Serum um 48%; bei den RAGE-KO-Tieren lediglich zu einem Anstieg von 25%. In der Serum-Cholesterinkonzentration unterschieden sich WT- und RAGE-KO-Mäuse bereits signifikant in den Kontrollgruppen voneinander. Dabei hatten die WT-Mäuse eine Cholesterinkonzentration von 104,4mg/dl, während bei den RAGE-KO-Mäusen 145,1mg/ml

gemessen werden konnte. Beide zeigten nach fettreicher Diät einen signifikanten Anstieg in der Cholesterinkonzentration, der bei den RAGE-KO-Mäusen mit 92% stärker ausfiel als bei den WT-Mäusen (54%).

3.5.3.2. Oxidative Stressparameter

Zur Untersuchung des Einflusses der fettreichen Ernährung auf den oxidativen Status im Herzen wurde auch hier der Gehalt an oxidativ veränderten Proteinen in den Herzen bestimmt. Abb.3.18. zeigt, dass durch die fettreiche Diät der Gehalt an oxidativ veränderten Proteinen im Herzen der WT- als auch der RAGE-KO-Mäuse signifikant ansteigt. Bei den WT Mäusen betrug der prozentuale Anstieg 55% ($p=0,037$), bei den RAGE-KO-Mäusen 36% ($p=0,046$).

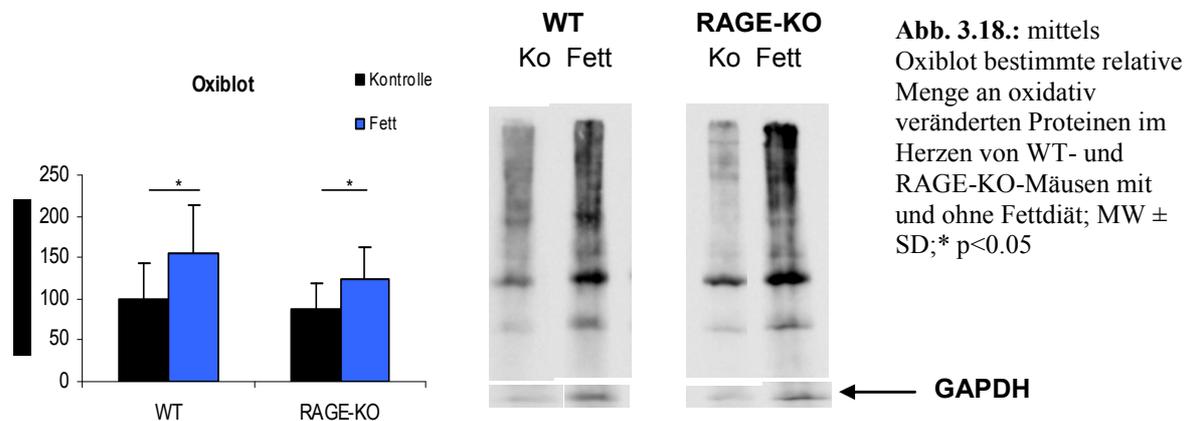


Abb. 3.18.: mittels Oxiblot bestimmte relative Menge an oxidativ veränderten Proteinen im Herzen von WT- und RAGE-KO-Mäusen mit und ohne Fettdiät; MW \pm SD; * $p<0.05$

Neben dem Gehalt an oxidativ veränderten Proteinen wurde in den Herzen der Tiere auch die mRNA-Konzentrationen der Enzyme MnSOD, Cu/ZnSOD, ecSOD, Ceruloplasmin (Cp) sowie NADPH-Oxidase-Untereinheit gp91phox mittels quantitativer PCR ermittelt (Abb.3.19.). MnSOD (12%; $p=0,03$) sowie Cu/ZnSOD (15%; $p=0,007$) zeigten bei den WT-Mäusen eine signifikante Expressionsabnahme infolge der fettreichen Diät. Dagegen reagierten die RAGE-KO-Mäuse mit einer signifikanten Expressionszunahme der MnSOD um 10% ($p=0,002$) und der Cu/ZnSOD um 11% ($p=0,03$) auf die Fetternährung. Die mRNA-Expression von Ceruloplasmin und EcSOD wurde durch die fettreiche Diät nicht beeinflusst. Bei der kardialen Expression der gp91phox zeigten nur die RAGE-KO-Mäuse einen signifikanten Anstieg um 24,6% ($p=0,04$) nach Fettdiät.

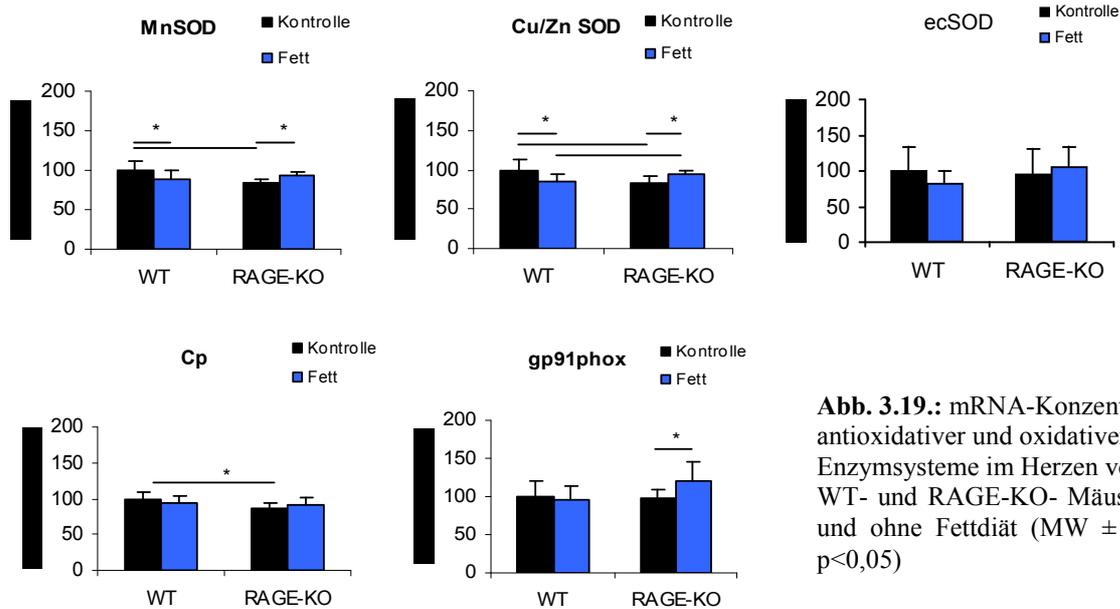


Abb. 3.19.: mRNA-Konzentration antioxidativer und oxidativer Enzymsysteme im Herzen von WT- und RAGE-KO-Mäusen mit und ohne Fettdiät (MW \pm SD; * $p < 0,05$)

Die Expression der Enzyme MnSOD und Cu/ZnSOD wurde ebenfalls auf Proteinebene bestimmt (Abb. 3.20.).

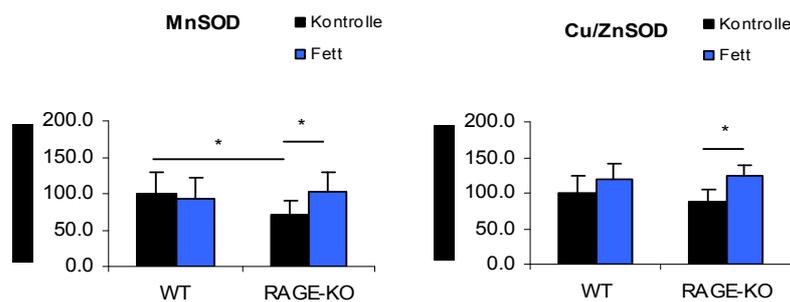


Abb. 3.20.: Proteinexpression der antioxidativen Enzymsysteme MnSOD und Cu/ZnSOD im Herzen von WT- und RAGE-KO-Mäusen mit und ohne Fettdiät (MW \pm SD; * signifikant vs. Kontrollgruppe ($p < 0,05$))

Die C57Bl/6 (WT)-Mäuse zeigten hier infolge der fettreichen Diät keine Veränderung in der Expression von MnSOD und Cu/ZnSOD. Bei den RAGE-KO-Mäusen war jedoch entsprechend den mRNA Daten ein signifikanter Anstieg in der Expression beider Enzyme zu beobachten (MnSOD 32%; Cu/ZnSOD 36%).

3.5.3.3. AGE-spezifische Fluoreszenz in Serum und Herz

Zur Überprüfung des Einflusses der fettreichen Diät auf die Serum-AGE-Gehalte wurden die AGE-spezifischen Fluoreszenzen ermittelt. In Abb. 3.21. (A) sind die bei 330nm/405nm und 360nm/440nm gemessenen Fluoreszenzen im Serum der C57Bl/6 (WT)- und RAGE-KO-Mäuse, mit und ohne fettreiche Diät, dargestellt.

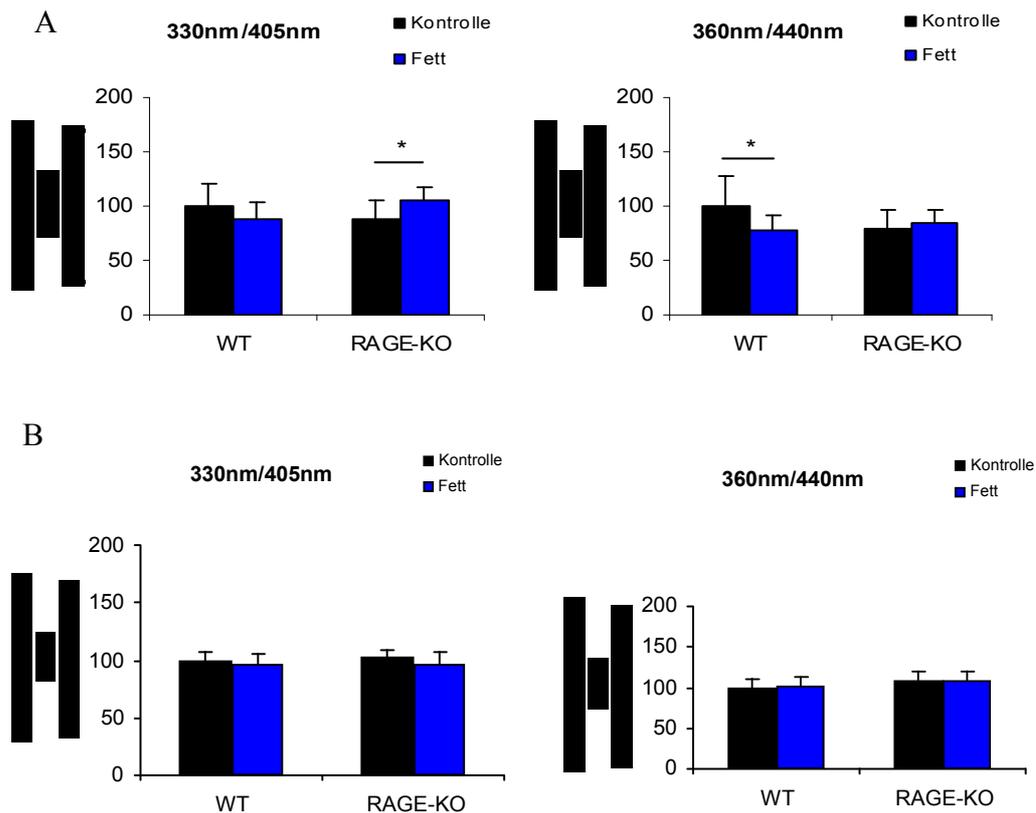


Abb. 3.21: AGE-Fluoreszenz bei 330nm/405nm und 360nm/440nm im Serum (A) und Herzen (B) von WT-Mäusen und RAGE-KO Mäusen mit und ohne Fettdiät (MW \pm SD; * $p < 0,05$)

Daraus ist ersichtlich, dass die AGE-Fluoreszenz bei 330nm/405nm im Serum der WT-Mäuse unverändert war, jedoch bei den RAGE-KO-Mäusen signifikant um 16% in der Fettgruppe anstieg (A). Bei 360nm/440nm wurde durch die Fettdiät die Serum-Fluoreszenz der WT-Mäuse signifikant um 23% gesenkt (A), während die RAGE-KO-Mäuse keine Änderung zeigten. Nach drei Monaten fettreicher Ernährung zeigte sich in den Herzen der WT- und RAGE-KO-Mäuse keine Veränderung der AGE-Fluoreszenzen bei 330nm/405nm und 360nm/440nm (B).

3.5.3.4. AGE-Modifikationen in Serum und Herz

Mittels Dotblot wurden die AGE-Modifikationen CML, MDA, HNE, AGE, Arg-Pyrimidin und 3-DG-Imidazolone im Serum der C57Bl/6 (WT)- und RAGE-KO-Mäuse, mit und ohne Fettdiät nachgewiesen (Tab.3.18.).

Die Verfütterung der fettreichen Diät führte zu keiner Beeinflussung der Serumgehalte an CML, MDA, HNE, AGE und 3-DG-Imidazolone. Interessanterweise sank unter Fettfütterung

der Gehalt an Arg-Pyrimidin signifikant im Serum der WT-Mäuse (21%; $p=0,031$) und der RAGE-KO-Mäuse (23%; $p=0,01$).

Tabelle 3.18.: mittels Dotblot bestimmte Proteinexpression der untersuchten AGE-Modifikationen im Serum der WT- und RAGE-KO-Mäusen nach vier Monaten Fettdiät

Dotblot	WT		RAGE-KO	
	Kontrolle	Fett	Kontrolle	Fett
AGE-Modifikation				
CML	1,00 ± 0,2	1,00 ± 0,2	1,09 ± 0,1	0,97 ± 0,1
MDA	1,00 ± 0,1	0,98 ± 0,1	0,90 ± 0,1	0,94 ± 0,1
HNE	1,00 ± 0,1	0,97 ± 0,1	0,94 ± 0,1	0,98 ± 0,1
AGE (S006593)	1,00 ± 0,2	0,98 ± 0,3	1,12 ± 0,1	1,10 ± 0,1
Arg-Pyrimidin	1,00 ± 0,2	0,79 ± 0,2*	1,03 ± 0,2	0,80 ± 0,2#
3-DG-Imidazolone	1,00 ± 0,2	0,82 ± 0,3	0,84 ± 0,2	0,71 ± 0,2

MW ± SD; *signifikanter Unterschied zur WT-Kontrolle; # signifikanter Unterschied zur RAGE-KO-Kontrolle ($p<0,05$); $n=8-12$ je Gruppe

Im Herzen der Mäuse wurde die Expression der AGE-Modifikationen CML, MDA, HNE, AGE, Arg-Pyrimidin und 3-DG-Imidazolone mittels Dotblot (3.19) und Western Blot (3.20) analysiert.

Mittels Dotblot konnten infolge der Fettfütterung keine Veränderungen in der Expression der untersuchten Modifikationen bei C57Bl/6 (WT)- und RAGE-KO-Mäusen beobachtet werden (Tab.3.19.).

Tabelle 3.19.: mittels Dotblot bestimmte Proteinexpression der untersuchten AGE-Modifikationen in Herzen der WT- und RAGE-KO-Mäusen nach vier Monaten Fettdiät

Dotblot	WT		RAGE-KO	
	Kontrolle	Fett	Kontrolle	Fett
AGE-Modifikation				
CML	1,00 ± 0,2	1,03 ± 0,1	0,82 ± 0,2	0,83 ± 0,2*
MDA	1,00 ± 0,1	1,02 ± 0,2	0,96 ± 0,2	1,01 ± 0,2
HNE	1,00 ± 0,1	0,97 ± 0,1	1,01 ± 0,1	0,98 ± 0,1
AGE (S006593)	1,00 ± 0,1	1,03 ± 0,1	1,00 ± 0,2	0,95 ± 0,2
Arg-Pyrimidin	1,00 ± 0,1	0,96 ± 0,2	0,83 ± 0,1*	0,87 ± 0,1*
3-DG-Imidazolone	1,00 ± 0,1	0,95 ± 0,2	0,84 ± 0,1*	0,92 ± 0,2

MW ± SD; *signifikanter Unterschied zur WT-Kontrolle; ($p<0,05$); $n=8-12$ je Gruppe

Im Western Blot waren bei den RAGE-KO-Mäusen ebenfalls nach Fettfütterung keine der untersuchten Modifikationen verändert (Tab.3.20.). Die WT-Mäuse zeigten jedoch signifikant

verminderte Gehalte an HNE (23,8%; $p=0,031$) und 3-DG-Imidazolone (35,4%; $p=0,031$) im Herzen, wohingegen CML, MDA, AGE und Arg-Pyrimidin nicht beeinflusst wurden.

Tabelle 3.20.: mittels Western Blot bestimmte Proteinexpression der untersuchten AGE-Modifikationen in Herzen der WT- und RAGE-KO-Mäusen nach vier Monaten Fettdiät

Western Blot	WT		RAGE-KO	
	Kontrolle	Fett	Kontrolle	Fett
AGE-Modifikation				
CML	1,00 ± 0,3	0,83 ± 0,2	0,75 ± 0,3	0,93 ± 0,3
MDA	1,00 ± 0,4	0,78 ± 0,3	0,91 ± 0,4	0,55 ± 0,3*
HNE	1,00 ± 0,3	0,74 ± 0,1*	0,85 ± 0,2	0,77 ± 0,2
AGE (S006593)	1,00 ± 0,4	0,97 ± 0,2	1,03 ± 0,6	1,14 ± 0,5
Arg-Pyrimidin	1,00 ± 0,2	0,97 ± 0,3	0,79 ± 0,3	1,01 ± 0,3
3-DG-Imidazolone	1,00 ± 0,5	0,65 ± 0,1*	0,87 ± 0,4	1,21 ± 0,6

MW ± SD; * signifikanter Unterschied zur WT-Kontrolle; ($p<0,05$); $n=8-12$ je Gruppe

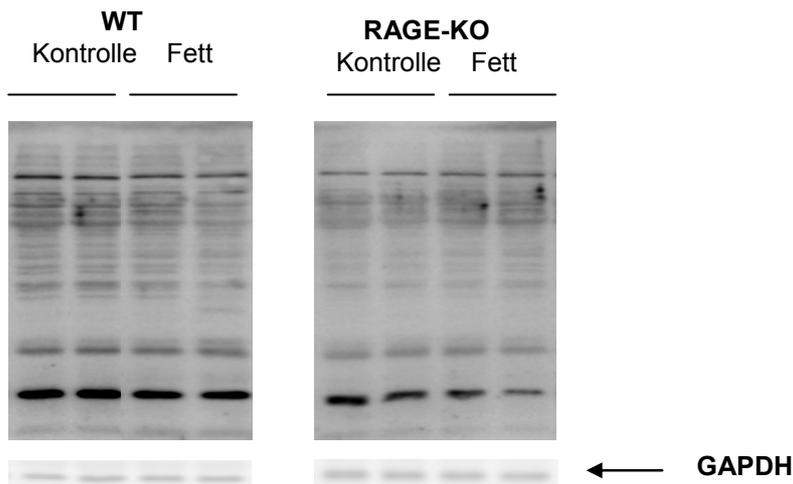


Abb. 3.22.: repräsentatives Bild für den Nachweis mittels Western Blot von HNE in Herzen von WT- und RAGE-KO-Mäusen nach Fettdiät. Dabei wurden die Proben auf GAPDH normiert

3.5.3.5. Kardiale mRNA-Expression AGE-spezifischer Rezeptoren, Hypertrophie-, Fibrose- und Inflammationsmarker

In Tabelle 3.21. sind die mittels RT-PCR bestimmten mRNA-Konzentrationen der zu untersuchenden Gene der AGE-Rezeptoren, Hypertrophiemarker, Fibrosemarker und Inflammationsmarker dargestellt.

Auch im Falle der fettreichen Ernährung sollte ein Einfluss auf die verschiedenen AGE-Rezeptoren mittels Analyse ihrer mRNA-Expressionen überprüft werden. Die Expression von AGE-R1 und *Srb 1* bleibt bei den C57Bl/6 (WT)-Mäusen im Herzen unverändert, wohingegen die RAGE-KO-Mäuse einen signifikanten Anstieg des AGE-R1 ($p=0,029$) um 29% und *Srb1* um 42% ($p=0,02$) zeigten. Die Expression von AGE-R2 konnte in beiden Fettgruppen signifikant erhöht werden. Dabei zeigten die WT-Mäuse einen Anstieg von 70% ($p=0,04$), während die Expression bei den RAGE-KO-Mäusen nur um 54% ($p=0,012$) erhöht war. Keine Änderung war in der Expression von AGE-R3 zu sehen.

Keine Änderung in der Expression von α -MHC, α -Aktin und *Tpm1* konnte durch die fettreiche Diät beobachtet werden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe blieb die Expression von β -MHC in Herzen von WT-Mäusen der Fettgruppe unverändert, während die RAGE-KO-Mäuse einen signifikanten Anstieg der β -MHC-Konzentration um 16% ($p=0,02$) zeigten. Ebenfalls konnte bei den RAGE-KO-Mäusen eine Erhöhung der mRNA-Konzentration von ANF um 22% ($p=0,034$) gesehen werden, während die WT-Mäuse mit einer signifikanten Senkung um 30% ($p=0,007$) reagierten. Auf die mRNA-Expression der Fibrosemarker *Fibulin 5* und TGF- $\beta 3$ hatte die fettreiche Ernährung in beiden Gruppen keinen Einfluss. Die Expression von *Collagen 1a1* (36%; $p=0,009$) und *3a1* (52%; $p=0,032$) konnte durch Fett signifikant bei den RAGE-KO-Mäusen erhöht werden, wohingegen die WT-Mäuse keine Änderung zeigten. Keinen Einfluss auf die Expression von *Lipocalin 2*, hatte die fettreiche Diät bei den RAGE-KO-Tieren. Die WT-Mäuse wiesen jedoch eine signifikante Senkung der *Lipocalin 2*-Expression um 40% ($p=0,002$) auf.

Tabelle 3.21.: mRNA-Expression der untersuchten Gene in den Herzen der WT- und RAGE-KO-Mäuse nach viermonatiger Fettdiät

mRNA Expression	WT		RAGE-KO	
	Kontrolle	Fett	Kontrolle	Fett
AGE-spezifische Rezeptoren				
AGE-Rezeptor 1	1,00 ± 0,2	1,06 ± 0,2	0,80 ± 0,2	1,09 ± 0,2#
AGE-Rezeptor 2	1,00 ± 0,4	1,70 ± 0,5*	0,92 ± 0,3	1,46 ± 0,4*#
AGE-Rezeptor 3	1,00 ± 0,4	0,80 ± 0,3	0,92 ± 0,3	1,04 ± 0,3
Srb1	1,00 ± 0,3	1,18 ± 0,3	0,86 ± 0,3	1,28 ± 0,2*#
RAGE	1,00 ± 0,3	0,93 ± 0,2	-	-
Hypertrophie				
α-MHC	1,00 ± 0,2	0,93 ± 0,1	1,00 ± 0,2	1,09 ± 0,2
β-MHC	1,00 ± 0,2	0,88 ± 0,1	1,02 ± 0,1	1,18 ± 0,1*#
ANF	1,00 ± 0,3	0,70 ± 0,1*	0,73 ± 0,1	0,94 ± 0,3#
Tpm1	1,00 ± 0,1	0,95 ± 0,2	0,89 ± 0,2	1,06 ± 0,2
α-Actin	1,00 ± 0,6	0,85 ± 0,3	1,16 ± 0,7	1,09 ± 0,5
Fibrose				
Collagen 1	1,00 ± 0,3	0,82 ± 0,2	0,81 ± 0,2	1,17 ± 0,2#
Collagen 3	1,00 ± 0,9	1,05 ± 0,8	0,93 ± 0,5	1,45 ± 0,3#
Fibulin5	1,00 ± 0,1	0,93 ± 0,1	1,03 ± 0,2	1,04 ± 0,1
TGF β1	1,00 ± 0,2	0,86 ± 0,2	0,98 ± 0,2	1,13 ± 0,2
TGF β3	1,00 ± 0,2	0,91 ± 0,1	0,88 ± 0,1	1,01 ± 0,3
Inflammation				
Lipocalin 2	1,00 ± 0,3	0,60 ± 0,2*	0,56 ± 0,2	0,67 ± 0,2*

MW±SD; * signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe WT (p<0,05); # signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe RAGE-KO (p<0,05); n=8-12 je Gruppe

3.6. Einfluss von Laufradtraining auf den AGE-Gehalt in alten C57Bl/6- und RAGE-KO-Mäusen

Da AGEs mit zunehmendem Alter im Organismus angereichert und mit einer Reihe von altersspezifischen Erkrankungen assoziiert werden, sollte analysiert werden, ob durch Sport die AGE-Gehalte modifiziert bzw. gesenkt werden können. Sport wurde in Form eines freiwilligen Laufradtrainings durchgeführt. Für den Versuch wurden WT-Mäuse (n=18) und RAGE-KO-Mäuse (n=20) im Alter von durchschnittlich 24 Monaten gewählt. Da die mittlere Lebenserwartung der C57Bl/6-Mäuse bei 27 Monaten liegt, ist das gewählte Alter vergleichbar mit einem hohen Menschenalter (89).

3.6.1. Gewichtsentwicklung und Laufverhalten

Bei den für den Versuch eingesetzten Tieren zeigten die RAGE-KO-Mäuse zu Versuchsbeginn und Versuchsende signifikant niedrigere Körpergewichte als die WT-Mäuse (Abb.3.23.).

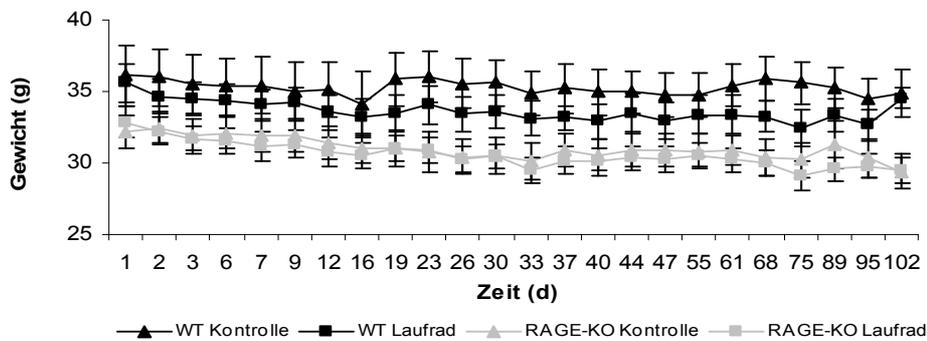


Abb. 3.23.: Gewichtsverlauf der WT-Mäuse und RAGE-KO-Mäuse aus Kontroll- und Laufgruppe während des 4-monatigen Versuchszeitraum (MW \pm SEM)

Weder in der Kontrollgruppe noch in der Laufgruppe zeigten die Tiere eine signifikante Änderung der Körpergewichte während des Versuchszeitraumes. Aufgrund des hohen Alters der Versuchstiere traten während der viermonatigen Versuchsdauer Verluste durch Tod und Erkrankungen auf. Aufgrund dessen kam es zu einer Verringerung der ursprünglichen Versuchstierzahl. Bei den WT-Mäusen waren dabei sechs Tiere betroffen sowie bei den RAGE-KO-Mäusen drei Tiere.

Zur Erfassung des Laufverhaltens, war jedes Laufrad mit einem Sensor gekoppelt, welcher über 24 Stunden online die Umdrehungen des Laufrades pro Minute erfasste. Daraus ergaben sich drei messbare Parameter: mittlere Geschwindigkeit (m/sec), Strecke (m) und prozentualer Anteil an Pausen länger als 10min (Abb.3.24.).

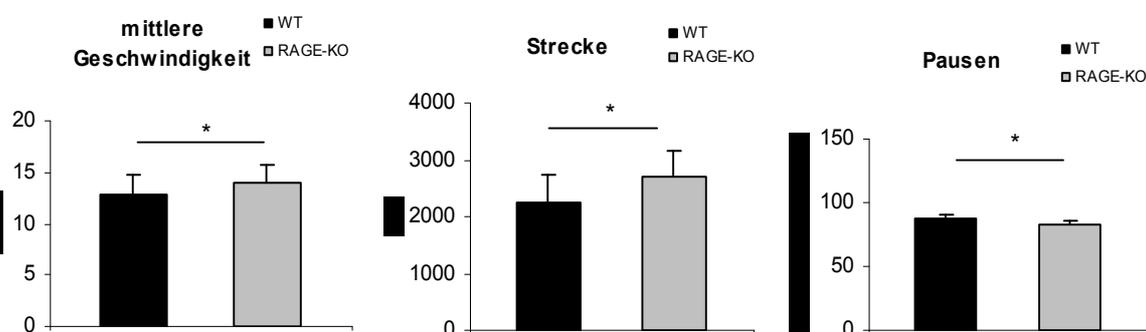


Abb. 3.24.: Erfasste Laufparameter zur Ermittlung des Laufverhaltens der WT- und RAGE-KO-Mäuse über den Zeitraum von vier Monaten. (MW \pm SD; * signifikant vs. Kontrollgruppe ($p < 0,05$); n=5 in WT-Kontrollgruppe, n=6 in WT-Laufradgruppe, n=8 in RAGE-KO-Kontrollgruppe, n=9 in RAGE-KO-Laufradgruppe)

Die RAGE-KO-Mäuse zeigten während des Versuchszeitraumes eine höhere Laufbereitschaft als die WT-Mäuse. Gekennzeichnet war diese durch eine signifikant höhere mittlere Geschwindigkeit und geringere Anzahl an langen Pausen. Die RAGE-KO-Mäuse liefen mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 13,9m/sec, während die WT-Mäuse nur eine Geschwindigkeit von 12,7m/sec erreichten. Resultierend daraus legten die RAGE-KO Tiere (2,7km/d) im Vergleich zu den WT-Mäusen (2,3km/d) signifikant größere Strecken pro Tag zurück ($p=1,57 \cdot 10^{-8}$). Dabei zeigten die Tiere ein spezifisches Laufmuster, welches sich an den vorgegebenen 12h-Tag-Nacht-Rhythmus anpasste und dem nachtaktiven Verhalten der Tiere entspricht. Abb.3.25. zeigt den 24-stündigen Verlauf der aufgezeichneten Bewegungen des Laufrades. Dabei ist ersichtlich, dass mit Ausschalten des Lichtes um 19 Uhr sofort die aktive Phase beginnt, welche mit Einschalten des Lichtes um 7 Uhr abrupt endet.

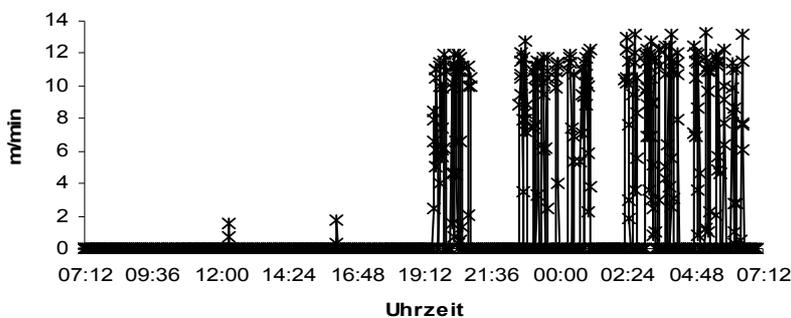


Abb. 3.25.: Beispiel eines Laufprofils einer RAGE-KO-Maus über 24 Stunden

3.6.2. Oxidative Stressparameter

Zur Überprüfung des Einfluss von Laufradtraining auf den oxidativen Status wurden auch hier der Oxiblot sowie die Expressionen oxidativer und antioxidativer Enzyme ermittelt.

Nach dem Laufradtraining konnte der Gehalt an Carbonylgruppen im Herzprotein von RAGE-KO-Mäusen signifikant um 40% ($p=0,027$) gesenkt werden. Die C57Bl/6(WT)-Mäuse zeigten ebenfalls eine Reduktion um 27% infolge der dreimonatigen Laufradintervention, welche jedoch statistisch nicht signifikant war (Abb.3.26.).

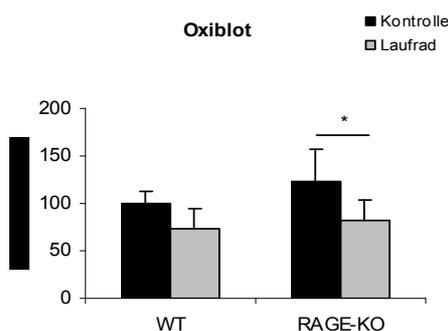


Abb. 3.26.: mittels Oxiblot bestimmte relative Menge an oxidativ veränderten Proteinen im Herzen von WT- und RAGE-KO-Mäusen mit und ohne Laufradintervention (MW \pm SD; * $p<0,05$)

In Abb.3.24. sind die durch RT-PCR ermittelten mRNA-Konzentrationen der antioxidativen Enzymsysteme MnSOD, Cu/ZnSOD, ecSOD sowie Ceruloplasmin (Cp) und dem oxidativen Enzymsystem gp91phox dargestellt. Die WT-Kontrollen wurden 100% gesetzt.

Es war weder bei den WT-Mäusen, noch bei den RAGE-KO-Mäusen ein signifikanter Unterschied in der kardialen mRNA-Konzentration der Enzymsysteme durch das Laufradtraining beobachtet werden.

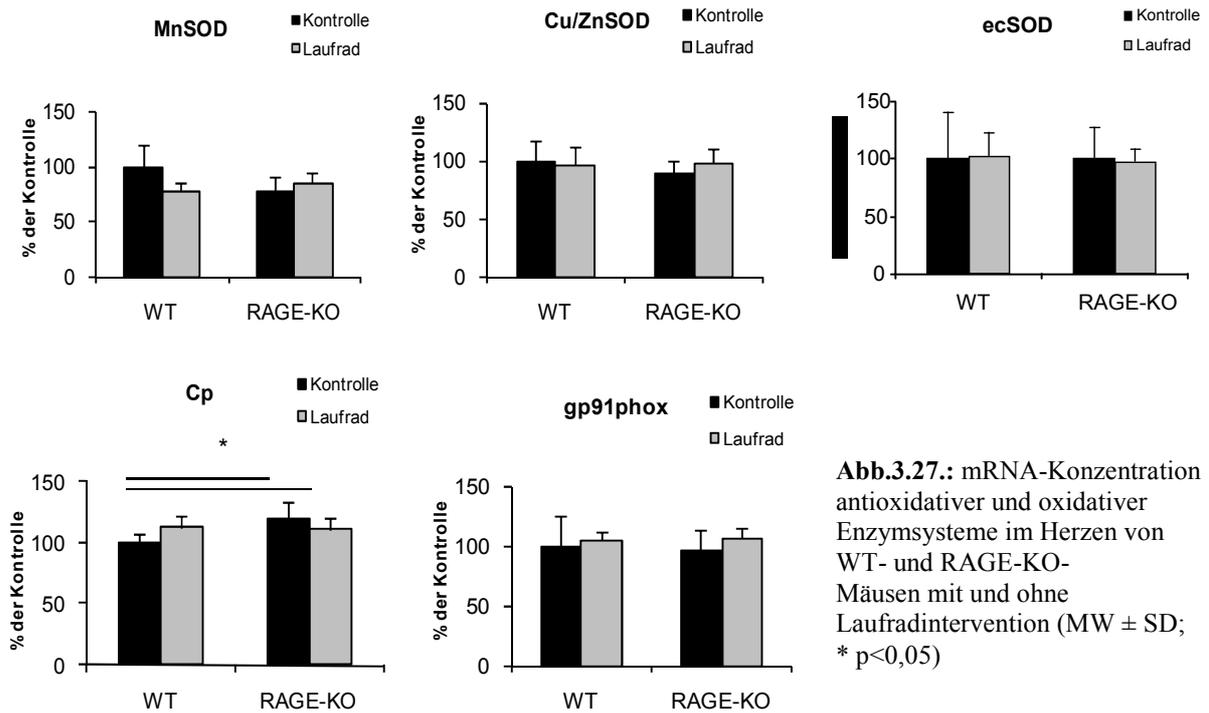


Abb.3.27.: mRNA-Konzentration antioxidativer und oxidativer Enzymsysteme im Herzen von WT- und RAGE-KO-Mäusen mit und ohne Laufradintervention (MW \pm SD; * $p < 0,05$)

Die Expressionen von MnSOD und Cu/ZnSOD wurden ebenfalls auf Proteinebene mittels Western Blot bestimmt. Abb.3.28. zeigt, dass auch auf Proteinebene C57Bl/6 (WT)- und RAGE-KO-Mäuse keine Änderung in der Expression von Cu/ZnSOD zu beobachten war. Bei der MnSOD konnte lediglich bei den RAGE-KO-Mäuse im Gegensatz zu den mRNA Daten ein signifikanter Anstieg in der Expression um 48,2 % ($p = 0,02$) gesehen werden.

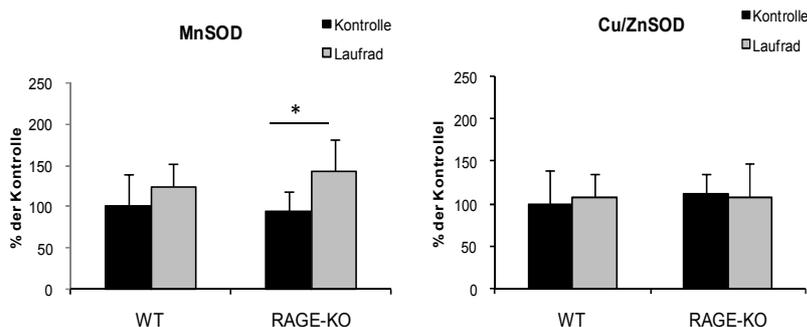


Abb.3.28.: Proteinexpression der antioxidativen Enzymsysteme MnSOD und Cu/ZnSOD im Herzen von WT- und RAGE-KO-Mäusen mit und ohne Laufradtraining (MW \pm SD; * $p < 0,05$)

3.6.3. AGE-spezifische Fluoreszenz in Serum und Herz

Zur Überprüfung des Einflusses des Laufradtrainings auf den AGE-Gehalt in Serum und Herz wurden die AGE-spezifischen Fluoreszenzen bei einer Anregung/Emission von 330nm/405nm und 360/440nm gemessen. Infolge des Laufradtrainings zeigten beide Tiergruppen eine signifikante Senkung der AGE-Fluoreszenz im Serum bei 330nm/405nm, wobei die RAGE-KO Mäuse (25%; $p=0,009$) eine stärkere Reduktion vorwiesen als die WT-Mäuse (16%; $p=0,04$) (Abb.3.29.B). Ebenso konnte die Serum-AGE-Fluoreszenz bei 360nm/440nm signifikant durch Laufradtraining in beiden Gruppen gesenkt werden. Auch hier zeigten die RAGE-KO Mäuse mit 28% ($p=0,0005$) eine stärkere Abnahme im Vergleich zu den WT-Mäusen mit 22% ($p=0,015$).

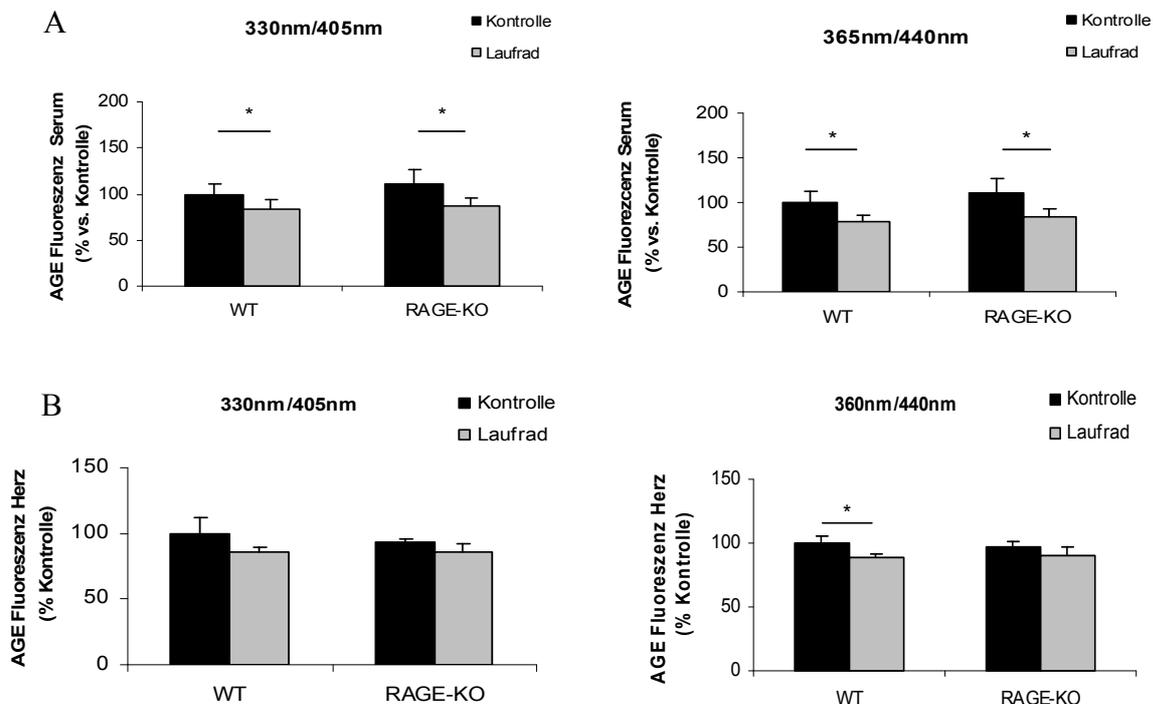


Abb.3.29: AGE-Fluoreszenz in Serum (A) und Herzen (B) WT -Mäusen und RAGE-KO Mäusen mit und ohne Laufradtraining (MW \pm SD; * signifikant $p < 0,05$; $n=5$ in WT Kontrollgruppe, $n=6$ in WT-Laufradgruppe, $n=8$ in RAGE-KO-Kontrollgruppe, $n=9$ in RAGE-KO-Laufradgruppe)

Nach vier Monaten mit freiem Zugang zu einem Laufrad zeigten weder WT-Mäuse noch RAGE-KO-Mäuse eine Änderung der Fluoreszenz bei 330nm/405nm im Herzen (3.23.B). Ebenso zeigten die RAGE-KO-Mäuse keine Änderung der kardialen AGE-Fluoreszenz bei 360nm/440nm, während bei den WT-Mäusen eine signifikante Senkung um 11,8% ($p=0,048$) im Herzen zu sehen war.

3.6.4. AGE-Modifikationen in Serum und Herz

Die Expression verschiedener AGE-spezifischer Modifikationen (CML, MDA, HNE, AGE, Arg-Pyrimidin, 3-DG-Imidazolone, Pentosidin) im Serum wurde mittels Dotblotanalyse bestimmt.

Tabelle 3.22.: mittels Dotblot bestimmte Proteinexpression der untersuchten AGE-Modifikationen im Serum von WT- und RAGE-KO-Mäusen nach drei Monaten Laufradintervention

Dotblot	WT		RAGE-KO	
	Kontrolle	Laufrad	Kontrolle	Laufrad
AGE-Modifikation				
CML	1,00 ± 0,1	1,01 ± 0,1	0,93 ± 0,1	0,92 ± 0,1
MDA	1,00 ± 0,1	0,96 ± 0,2	1,08 ± 0,3	1,06 ± 0,2
HNE	1,00 ± 0,2	1,16 ± 0,4	1,01 ± 0,2	1,04 ± 0,4
AGE (S006593)	1,00 ± 0,3	1,04 ± 0,3	1,17 ± 0,3	1,07 ± 0,4
Arg-Pyrimidin	1,00 ± 0,3	1,44 ± 0,6	0,90 ± 0,6	1,21 ± 0,2
3-DG-Imidazolone	1,00 ± 0,4	1,31 ± 0,4	0,74 ± 0,4	0,92 ± 0,3
Pentosidin	1,00 ± 0,2	1,00 ± 0,4	0,93 ± 0,3	0,97 ± 0,3

MW ± SD; * vs. Kontrollgruppe WT; # signifikanter Unterschied zur RAGE-KO-Kontrolle (p<0,05); n=5 in WT-Kontrollgruppe, n=6 in WT-Laufradgruppe, n=8 in RAGE-KO-Kontrollgruppe, n=9 in RAGE-KO-Laufradgruppe

Tabelle 3.22. zeigt, dass keine Unterschiede in der Expression der oben genannten Modifikationen im Serum von WT-Mäusen und RAGE-KO-Mäusen, mit und ohne Laufradtraining, zu sehen waren.

Der Einfluss der Laufradintervention auf AGE-Modifikationen im Herzen wurde mittels Dotblot (Tab. 3.23.) und Western Blot (Tab. 3.24.) analysiert.

Tabelle 3.23.: mittels Dotblot bestimmte Proteinexpression der untersuchten AGE-Modifikationen in Herzen der WT- und RAGE-KO-Mäusen nach 3 Monaten Laufradintervention

Dotblot	WT		RAGE-KO	
	Kontrolle	Laufrad	Kontrolle	Laufrad
AGE-Modifikation				
CML	1,00 ± 0,1	1,02 ± 0,1	1,05 ± 0,1	0,94 ± 0,1
MDA	1,00 ± 0,1	1,08 ± 0,1	1,07 ± 0,1	0,99 ± 0,1
AGE (S006593)	1,00 ± 0,1	1,08 ± 0,1	1,20 ± 0,3	1,02 ± 0,3
Arg-Pyrimidin	1,00 ± 0,3	1,06 ± 0,4	0,99 ± 0,3	0,90 ± 0,3
3-DG-Imidazolone	1,00 ± 0,3	0,90 ± 0,2	1,00 ± 0,3	0,90 ± 0,3

MW ± SD; * vs. Kontrollgruppe WT (p<0,05); # signifikanter Unterschied zur RAGE-KO-Kontrolle (p<0,05); n=5 in WT-Kontrollgruppe, n=6 in WT-Laufradgruppe, n=8 in RAGE-KO-Kontrollgruppe, n=9 in RAGE-KO-Laufradgruppe

Durch das Laufradtraining konnten mittels Dotblot keine Veränderungen in der Expression der analysierten AGE-Modifikationen CML, MDA, AGE, Arg-Pyrimidin und 3-DG-Imidazolone in den Herzen von WT- und RAGE-KO-Mäusen festgestellt werden.

Tabelle 3.24.: mittels Western Blot bestimmte Proteinexpression der untersuchten AGE-Modifikationen in den Herzen der WT- und RAGE-KO-Mäusen nach 4 Monaten Laufradintervention

Western Blot	WT		RAGE-KO	
	Kontrolle	Laufrad	Kontrolle	Laufrad
AGE-Modifikation				
CML	1,00 ± 0,3	0,83 ± 0,4	0,62 ± 0,2	0,60 ± 0,3
MDA	1,00 ± 0,4	1,13 ± 0,4	1,25 ± 0,4	1,29 ± 0,2
HNE	1,00 ± 0,2	1,38 ± 0,4*	1,60 ± 1,0	1,44 ± 0,4
AGE (S006593)	1,00 ± 0,3	1,04 ± 0,2	0,81 ± 0,2	0,91 ± 0,2
Arg-Pyrimidin	1,00 ± 0,1	1,50 ± 0,4	0,87 ± 0,2	0,86 ± 0,2
3-DG-Imidazolone	1,00 ± 0,3	1,13 ± 0,2	1,05 ± 0,3	1,23 ± 0,1
Pentosidin	1,00 ± 0,3	1,08 ± 0,3	1,34 ± 0,5	1,29 ± 0,3

MW ± SD; * vs. Kontrollgruppe WT (p<0,05); # signifikanter Unterschied zur RAGE-KO-Kontrolle (p<0,05); n=5 in WT-Kontrollgruppe, n=6 in WT-Laufradgruppe, n=8 in RAGE-KO-Kontrollgruppe, n=9 in RAGE-KO-Laufradgruppe

Mittels der Western Blot-Analysen wurde im Herzen der Tiere die Expression von CML, MDA, HNE, AGE, Arg-Pyrimidin, 3-DG-Imidazolone und Pentosidin bestimmt. Dabei hatte das Laufradtraining keinen Einfluss auf die Expression von CML, Arg-Pyrimidin, AGE, MDA, 3-DG-Imidazolone und Pentosidin in den Herzen der WT- und RAGE-KO-Mäuse. Die WT-Mäuse zeigten jedoch einen signifikanten Anstieg der kardialen HNE-Expression um 38% (p=0,0002), welcher bei den RAGE-KO-Mäusen nicht beobachtet werden konnte.

3.6.5. Kardiale mRNA-Expression spezifischer AGE-Rezeptoren, Hypertrophie-, Fibrose- und Inflammationsmarker

Die relativen mRNA-Konzentrationen der AGE-Rezeptoren sowie der Marker für Hypertrophie, Fibrose und Inflammation sind in Tabelle 3.24. dargestellt.

Es konnten keine Änderungen nach viermonatigem Laufradtraining in der Expression von AGE-R1, AGE-R2, Srb1 sowie RAGE, bei den WT- Mäusen und RAGE-KO-Mäusen beobachtet werden. Ebenso zeigten die RAGE-KO-Mäuse keinen Unterschied in der Konzentration von AGE-R3, wohingegen die WT-Mäuse mit einer signifikanten Senkung von 25% (p=0,009) reagierten.

Als Hypertrophiemarker wurden die mRNA-Expressionen von α - und β -MHC, ANF, α -Aktin sowie Tpm1 bestimmt. Nach der Laufradintervention zeigten weder WT-Mäuse noch die RAGE-KO-Mäuse eine Veränderung in der kardialen mRNA-Expression von α -MHC, ANF, α -Aktin und Tpm1. Eine signifikante Erhöhung der β -MHC Expression um 26% ($p=0,018$) konnte in den Herzen der RAGE-KO-Mäuse beobachtet werden. Diese war bei den WT-Mäusen nicht zu sehen.

Zur Überprüfung der Entstehung fibrotischer Veränderung infolge des Laufradtrainings wurde die relative mRNA-Konzentration der in Tabelle 3.25. dargestellten Faktoren Collagen1a1, Collagen 3a1, Fibulin 5, sowie TGF- β 1/3 ermittelt. Keine Veränderung in der Expression von Collagen 3a1, Fibulin 5 sowie TGF- β 1 und 3 konnte gesehen werden. Infolge der viermonatigen Laufradintervention zeigten lediglich die RAGE-KO-Mäuse einen signifikanten Anstieg in der mRNA-Expression von Collagen 1a1 um 39% ($p=0,046$).

Der Inflammationsmarker Lipocalin2 wurde durch das Training um 51,3% ($p=0,02$) bei den WT-Mäusen erhöht, während die RAGE-KO-Mäuse keine Veränderungen zeigten.

Tabelle 3.25.: mRNA-Expression der untersuchten Gene in Herzen der WT- und RAGE-KO-Mäuse nach dreimonatiger Laufradintervention

mRNA Expression	WT		RAGE-KO	
	Kontrolle	Laufrad	Kontrolle	Laufrad
AGE Rezeptoren				
AGER 1	1,00 ± 0,2	0,90 ± 0,1	0,85 ± 0,1	0,90 ± 0,1
AGER 2	1,00 ± 0,1	0,86 ± 0,3	0,68 ± 0,2	0,76 ± 0,2
AGER 3	1,00 ± 0,1	0,75 ± 0,1*	0,83 ± 0,3	0,84 ± 0,2
SRB1	1,00 ± 0,2	1,15 ± 0,2	1,10 ± 0,3	1,10 ± 0,1
RAGE	1,00 ± 0,4	0,90 ± 0,4	-	-
Hypertrophie				
α-MHC	1,00 ± 0,4	0,97 ± 0,2	0,92 ± 0,2	0,95 ± 0,2
β-MHC	1,00 ± 0,1	0,96 ± 0,1	0,84 ± 0,1*	1,00 ± 0,2#
ANF	1,00 ± 0,2	0,93 ± 0,1	0,88 ± 0,1	1,00 ± 0,2
α-Aktin	1,00 ± 0,4	0,98 ± 0,2	1,10 ± 0,3	0,94 ± 0,3
Tpm1	1,00 ± 0,1	1,00 ± 0,1	1,25 ± 0,3	1,10 ± 0,2
Fibrose				
Collagen 1a1	1,00 ± 0,4	1,10 ± 0,1	0,61 ± 0,2	1,00 ± 0,4#
Collagen 3a1	1,00 ± 0,2	0,84 ± 0,1	0,60 ± 0,3*	0,72 ± 0,2*
Fibulin5	1,00 ± 0,2	0,87 ± 0,2	0,86 ± 0,1	0,85 ± 0,1
TGF β1	1,00 ± 0,1	1,20 ± 0,5	0,88 ± 0,2	0,90 ± 0,3
TGF β3	1,00 ± 0,3	0,85 ± 0,1	0,83 ± 0,3	0,78 ± 0,2
Inflammation				
Lipocalin 2	1,00 ± 0,3	1,50 ± 0,3*	1,50 ± 0,5	1,20 ± 0,4

MW ± SD; * vs. Kontrollgruppe WT; # signifikanter Unterschied zur RAGE-KO-Kontrolle (p<0,05); n=5 in WT-Kontrollgruppe, n=6 in WT-Laufradgruppe, n=8 in RAGE-KO-Kontrollgruppe, n=9 in RAGE-KO-Laufradgruppe

4. Diskussion

AGEs gehören zu den so genannten Maillardprodukten und werden über die Nahrung in verhältnismäßig großen Mengen aufgenommen. Bisher ist immer noch unklar, welchen Anteil die aufgenommenen im Vergleich zu endogen gebildeten AGEs an den AGE-assoziierten pathophysiologischen Prozessen haben. Dass im Fall von Patienten mit Diabetes mellitus und Nierenerkrankungen AGE-reiche Nahrung sich negativ auswirken kann, wurde mehrfach gezeigt (90,91). Ob sich jedoch im gesunden Organismus eine AGE-reiche Ernährung im Herz-Kreislaufsystem negativ oder positiv auswirkt, wurde bisher kaum untersucht. Ziel der Arbeit war es, die Effekte einer AGE-reichen Ernährung auf das Herz eines gesunden Organismus zu untersuchen. Dazu wurden Fütterungsstudien mit dem Tiermodell Maus durchgeführt. Als Nahrungsmittelquellen für AGEs wurden Kaffee, Brotkruste sowie eine fettreiche Diät verwendet. Ob mögliche Wirkungen der diätetisch verabreichten AGEs in Abhängigkeit von RAGE, dem Rezeptor für AGEs, ablaufen, sollte anhand der Verwendung einer RAGE-Knockout-Mauslinie gezeigt werden. Zusätzlich sollte analysiert werden, ob Sport, im hohen Alter beginnend, auf die mit zunehmendem Alter angereicherten AGEs im Herzen einen positiven Einfluss hat.

4.1. Charakterisierung der C57Bl/6- und RAGE-KO-Mäuse bezüglich der zu analysierten Parameter

WT- und RAGE-KO-Tiere unterscheiden sich nicht in oxidativen Stressparametern

Oxidativer Stress entsteht bei einem Ungleichgewicht von Radikalbildung und antioxidativer Abwehr. Eine verstärkte ROS-Produktion kann durch die erhöhte Aktivität intrazellulärer Enzyme wie Oxidasen, Cyclooxygenasen und Lipidoxygenasen verursacht werden (92). Der größte Produzent von ROS in Säugetieren ist die NADPH-Oxidase (93). Es handelt sich um ein Enzym, bestehend aus 5 Komponenten: zwei zytosolische Einheiten (gp47phox, gp67phox), zwei membrangebundene Einheiten (gp91phox, p22phox) sowie ein G-Protein Rac (94,95). Eine der bekannten Wirkungen der AGEs ist die Bildung von ROS. Über die Bindung an RAGE und anschließender Aktivierung der NADPH-Oxidase können sie die Produktion von ROS steigern (96,97). So zeigten Waultier et al. in murinen Makrophagen, dass mit dem Fehlen der gp91phox NADPH-Oxidase Untereinheit die AGE-induzierte ROS-Produktion gehemmt wird (98). Andererseits gibt es zum Schutz vor Radikalen im Organismus zahlreiche Schutzsysteme, wie die Superoxiddismutasen, Katalase, Glutathionperoxidase, Glutathionreduktase (99). Die Superoxiddismutasen (SOD) initiieren

den ersten Schritt der Radikaleliminierung durch die Umwandlung von Superoxidanionen zu H_2O_2 , welches im Anschluss durch Katalase und Glutathionperoxidase zu Wasser transformiert wird (100,101). Drei Formen der SOD sind bekannt: die mitochondriale MnSOD, die cytoplasmatische Cu/ZnSOD und die extrazelluläre SOD (EcSOD). Kommt es jedoch zu einer übermäßigen Anhäufung freier Radikale, sind diese in der Lage, verschiedene Moleküle zu oxidieren, wobei Proteine eines der Hauptziele der reaktiven Spezies darstellen (100). Konsequenz der Oxidation ist die Bildung von Carbonylgruppen in den Seitenketten der Proteine, welche durch Derivatisierung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazon im sogenannten Oxiblot nachgewiesen werden können. Für die Untersuchungen zum oxidativen Stress wurden in der Arbeit die Expressionen der genannten oxidativen und antioxidativen Enzyme sowie die Carbonylgehalte der Proteine im Herzen ermittelt. Da die AGE-RAGE-Interaktion zu erhöhten ROS-Produktion führt, konnte vermutet werden, dass mit Fehlen des RAGE-Rezeptors die Produktion von ROS und Oxidation von Proteinen vermindert ist. Allerdings zeigten sich zwischen den WT- und RAGE-KO-Mäusen in den analysierten oxidativen/antioxidativen Stressparametern keine Unterschiede im Herzen. Möglicherweise sind natürlich vorhandene, geringe AGE-Mengen bei den jungen Tieren sowie die geringe endogene kardiale RAGE-Expression bei den WT-Mäusen ursächlich für keine messbaren Unterschiede. Eine direkte AGE-RAGE-induzierte ROS-Produktion konnte bisher auch nur bei Vorhandensein hoher Mengen an AGEs gemessen werden (102). Allerdings könnten in der vorliegenden Arbeit die geringeren Gehalte an MDA im Serum der RAGE-KO-Mäuse auf eine verminderte Lipidperoxidation hinweisen.

RAGE-KO-Mäusen zeigen höhere Gehalte an AGEs in Serum und Herz

Aufgrund der einfachen Handhabung hat sich die Fluoreszenzmessung als häufig genutzte Methode zur Messung von AGE-Gehalten etabliert (103,104). Bei der Messung der beiden AGE-spezifischen Fluoreszenzen (330/405nm, 360/440nm) unterschieden sich die WT- und RAGE-KO-Mäuse nicht voneinander, weder im Serum noch im Herzen. Allerdings konnten bei den RAGE-KO-Mäusen bei der Analyse spezifischer AGE-Modifikationen erhöhte Gehalte an AGE und Pentosidin im Serum sowie erhöhte kardiale Arg-Pyrimidin-Gehalte im Vergleich zu den WT-Tieren beobachtet werden. Bisher sind keine Daten in der Literatur über unterschiedliche AGE-Vorkommen in Serum- und Herz bei WT- und RAGE-KO-Mäusen publiziert worden. Thikellis et al. konnten in Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit bei der Analyse von CML im Herzen von WT- und RAGE-KO-Mäusen keine Unterschiede finden (105). Möglicherweise ist bei Fehlen des RAGE-Rezeptors die Aufnahme von AGEs

in die Organe eingeschränkt, was die höheren Gehalte im Serum, jedoch nicht im Herzen, erklären würde.

RAGE-KO-Mäuse zeigen eine verminderte kardiale AGE-Rezeptor 2-Expression sowie niedrigere Gehalte an Collagen 1a1, Fibulin5 und Lipocalin2

Im Zusammenhang mit der Ausschaltung des RAGE-Rezeptor zeigten die RAGE-KO-Mäuse eine Senkung der AGE-Rezeptor 2-Expression im Herzen. Allerdings ist der AGE-Rezeptor 2 bis dato im RAGE-knockout Modell nicht weiter untersucht worden. Lediglich Soro-Paavonen et al. analysierten in der Aorta von Apo-E- und RAGE-defizienten Mäusen die AGE-Rezeptor 2-Expression, konnten aber keine veränderte Expression von AGE-Rezeptor 2 beobachten (102). Neben der verminderten kardialen Expression des AGE-Rezeptors 2 war bei den RAGE-KO-Mäusen die Expression der Fibrosemarker TGF- β 1, Collagen I und Fibulin 5 im Vergleich zu den WT-Mäusen vermindert. Ähnliche Beobachtungen machten Tikellis et al., die ebenfalls signifikant geringere Expressionen von Collagen I/IV in Herzen der RAGE-KO-Mäuse, verglichen mit den WT-Tieren, zeigten (105). Durch Bindung an RAGE können AGEs über die Induktion von TGF- β 1 zu fibrotischen Veränderungen, wie der vermehrten Produktion von extrazellulärer Matrix, beitragen (106,107). Aufgrund des Knockout von RAGE scheint die durch AGEs induzierte und TGF- β 1 vermittelte Collagenexpression vermindert. Da die AGE-RAGE-Interaktion ebenso zu inflammatorischen Veränderungen führen kann, scheint ein verminderter Gehalt an Inflammationsmarkern bei den RAGE-KO-Mäusen theoretisch vorstellbar (108). So konnte für RAGE-KO-Mäuse in den Analysen tatsächlich eine verminderte kardiale Expression des Inflammationsmarkers Lipocalin2 beobachtet werden. Allerdings gibt es bis zum jetzigen Zeitpunkt keine publizierten Untersuchungen über einen Zusammenhang von RAGE und Lipocalin 2.

4.2. Altersassoziierte Veränderungen der zu analysierenden Parameter

Die Mäuse zeigen eine altersassoziierte Zunahme der AGE-spezifischen Fluoreszenz

Die Untersuchungen zur Messung der Fluoreszenz in Serum und Herzen der jungen und alten Mäuse bestätigen die Annahme einer Zunahme von AGE-Gehalten mit steigendem Alter. Sowohl im Serum als auch im Herzen konnte eine signifikante Zunahme der AGE-spezifischen Fluoreszenzen (330/405nm; 360/440nm) beobachtet werden. Li et al. konnten bei FVB-Albinomäusen ebenfalls mit zunehmendem Alter im Herzen erhöhte AGE-Gehalte beobachten (109), jedoch deutlich stärker ausgeprägt. Möglicherweise spielen dabei genetische Unterschiede der Mauslinien eine Rolle. Andererseits wurde eine andere

Messmethodik verwendet. In dem Versuch von Li et al. wurde der AGE-Gehalt mittels Elisa gegen CML bestimmt, wobei die Proteine vor der Messung verdaut werden. Während in der vorliegenden Arbeit mit der Methodik zur Proteinisolation wahrscheinlich primär modifizierte, große Matrixproteine verloren gehen. Beim Nachweis definierter Modifikationen mittels Dotblot der Tiere zeigte sich im Serum, übereinstimmend zu den Fluoreszenzdaten, eine signifikante Zunahme der Modifikationen CML, AGE, Pentosidin und HNE. Im Herzen dagegen wurde lediglich im Western Blot eine Zunahme von modifikationsunspezifischen AGEs gesehen. In anderen Studien konnte im Herzen mit steigendem Alter jedoch auch die Zunahme von CML beobachtet werden (110,111), allerdings durch Nachweis der CML-Modifikation mittels immunohistochemischen Methoden und HPLC. Demnach zeigen die C57BL/6- und RAGE-KO-Mäuse mit Zunahme des Alters auch eine Zunahme der Modifikationen in Serum und Herz.

Mit zunehmendem Alter nimmt antioxidativen Abwehr ab und die Inflammation zu

Mit zunehmendem Alters kommt es zu einer Zunahme des oxidativen Stresses (109). Als ursächlich dafür wird eine Abnahme der antioxidativen Abwehr postuliert, insbesondere aufgrund der verminderten Expression und Aktivität von antioxidativen Enzymen (112). Auf RNA-Ebene zeigten sich in dieser Arbeit keine Unterschiede in der kardialen Expression von MnSOD und Cu/ZnSOD, während Edwards et al. eine verminderte Expressionen der Gene in Herzen von 25 Monate alten C57Bl/6-Mäusen beobachten konnten (112). Auf Proteinebene konnte jedoch eine signifikant gesenkte Expression beider Enzyme im Vergleich zu den jungen Tieren gesehen werden, wie auch bei Edwards et al.. Aufgrund des erhöhten oxidativen Stresses kommt es mit zunehmendem Alter auch zu einer verstärkten Inflammation. So zeigten Sato et al., im Vergleich zu jungen Tieren, in alten C57Bl6-Mäusen eine verstärkte IL-6-Induktion nach Endotoxin-Abwehr (113). Erwartungsgemäß zeigte sich ein Anstieg in der kardialen Expression des Inflammationsmarkers Lipocalin 2 mit steigendem Alter. Neben oxidativen Veränderungen kommt es im Alter auch zu Veränderungen in der Zusammensetzung der Herzproteine. Dies wird sichtbar in einem Shift der Myosin Heavy Chains von α -MHC zu β -MHC (114). Da die MHCs bei Säugetieren zu 90% aus α -MHC bestehen, wird der Shift zu β -MHC als sensibler Marker für die Ausbildung einer Hypertrophie angesehen (115,116). Die in der Arbeit eingesetzten Versuchstiere zeigten erwartungsgemäß eine Abnahme von α -MHC bei gleichzeitiger Zunahme von β -MHC und somit den Hinweis auf die Ausbildung einer altersbedingten Hypertrophie. Neben der Veränderung der MHCs zeigte sich auch eine Zunahme der Expression des

Hypertrophiemarkers α -Aktin. Fibrotische Veränderungen konnten mit Zunahme des Alters nicht beobachtet werden.

4.3. Einfluss von diätetisch verabreichtem Kaffee auf oxidativen Stress und AGE-Modifikationen im Herz-Kreislaufsystem

Kaffee zeigte sowohl bei 330nm als auch 360nm eine erhöhte Fluoreszenz im Vergleich zum AGE-freien PBS. Nach 14 Tagen Kaffee fütterung konnte nur eine erhöhte Fluoreszenz im Serum bei 360nm/440nm nachgewiesen werden. Dies weist jedoch auf eine Aufnahme von AGE-Strukturen aus dem Kaffee hin. Obwohl Kaffee auch eine erhöhte Fluoreszenz bei 330nm/405nm zeigte, welche als spezifisch für Pentosidin und Arg-Pyrimidin beschrieben wurde (103), konnten mittels spezifischer Antikörper Pentosidin und Arg-Pyrimidin im Kaffee nicht nachgewiesen werden (117). Dies lässt vermuten, dass es weitere AGE-Strukturen mit einer spezifischen Fluoreszenz bei 330nm/405nm im Kaffee zu geben scheint, die wahrscheinlich vom Organismus Maus nicht oder in anderer Form aufgenommen werden.

Kurzzeit-Kaffeeextraktfütterung führt zu keiner Anreicherung von AGEs im Herzen

Dass AGEs nicht nur über die Nahrung aufgenommen werden, sondern sich auch im Körper anreichern, konnte bereits von Somoza et al. gezeigt werden (118). Nach 15-tägiger Fütterung von Ratten mit Pronyllysine und Malz konnten erhöhte AGE-Gehalte in den Nieren der Tiere gesehen werden. Nach 14-tägiger Kaffeeextraktfütterung konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit weder eine Anreicherung von fluoreszierenden AGEs noch der nicht-fluoreszierenden Modifikationen CML und AGE in der Proteinfraction des Herzens gesehen werden. Demnach scheint die Fütterung mit Kaffee zu keiner vermehrten AGE-Anreicherung im Herzen zu führen. Möglicherweise war der Fütterungszeitraum für eine Akkumulation im Herzen nicht ausreichend. Allerdings spricht eine Studie von Bartling et al. dagegen, die nach 14-tägiger Fütterung des identischen Kaffeeextraktes eine Anreicherung von unspezifischen AGEs im Lungengewebe von Ratten zeigen konnten (119). Ursächlich dafür könnte die im Vergleich zum Herzen hohe Expression von RAGE in der Lunge sein, die zur Aufnahme der AGEs führen könnte. Parallel dazu wäre eine beschleunigte Ausscheidung der AGEs in gesunden Organismen möglich. Dafür spricht eine Studie von Bergmann et al., welche die Verteilung von radioaktiv markiertem CML und CEL nach Injektion im Körper von Ratten untersuchten (120). Dabei zeigte sich nach 5 min eine starke Anreicherung von CML und CEL in der Niere und Leber. Bei erneuter Messung nach 120min konnten 90% der verabreichten Dosen im Urin wieder gefunden werden, was auf eine fast vollständige Ausscheidung schließen lässt.

Allerdings müssen die AGEs für die Ausscheidung die komplette Zirkulation durchlaufen. Folglich erreichen sie mit dem Blutstrom auch das Herz und können auch ohne Anreicherung über Bindung an Rezeptoren zelluläre Effekte ausüben, die zu einer eventuellen Schädigung oder auch zum Schutz des Herzens beitragen können. So führte Kaffee nach Fütterung zu einer gesteigerten kardiale Lipidperoxidation in Form von erhöhten Gehalten an MDA und HNE. In der Literatur wird Kaffee als Hemmer der Lipidperoxidation beschreiben (121,122). Allerdings wird diese Wirkung vor allem dem Inhaltsstoff Koffein zugesprochen (123). Der in der Arbeit verwendete Kaffee lag jedoch in entkoffeiniertes Form vor. Somit scheint der schützende Effekt wegzufallen und die übrigen Inhaltsstoffe eher eine gegenteilige Wirkung zu vermitteln.

Kaffeeextrakt hemmt antioxidative Enzyme und steigert Gehalt an Lipidperoxidationsprodukten in Herzen der RAGE-KO-Mäuse

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress in die Entstehung von Herz-Kreislaufkrankungen involviert ist. Auch AGEs können durch Bindung an RAGE möglicherweise zu einer ROS-bedingten Schädigung beitragen. In der Literatur wird den Melanoidinen im Kaffee jedoch eher eine antioxidative Wirkung sowie die Eigenschaft eines Metall-Chelatbilders zugeschrieben (124,125). Mit einer aus Kaffee isolierten Melanoidinfraktion konnte eine Hemmung der Lipidperoxidation beobachtet werden (71). Somoza et al. zeigten sowohl in vitro als auch in einem Fütterungsversuch mit Ratten für das in der vorliegenden Arbeit verwendete Kaffeeextrakt antioxidative Aktivität (126). In der Kaffee-Fütterungsstudie der vorliegenden Arbeit wurde lediglich in den Herzen der RAGE-KO-Mäuse eine signifikante Senkung der Expression der Cu/ZnSOD sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene beobachtet. Diese verminderte Expression der Schutzenzyme könnte auf verminderten oxidativen Stress hindeuten. Allerdings konnte gleichzeitig in den Herzen der RAGE-KO-Tiere eine signifikante Erhöhung der Lipidperoxidationsprodukte MDA und HNE nach Kaffee-Fütterung beobachtet werden. Da eine Hauptkomponente im Kaffee Lipide darstellen, könnten beim Röstungsprozess vermehrt Lipidperoxidationsprodukte wie MDA und HNE entstanden sein, die durch die Nahrungsaufnahme im Organismus angereichert werden (127). Allerdings erklärt dies nicht, warum die WT-Mäuse keine adäquaten Anreicherungen zeigten. Möglicherweise ist hier die Anzahl der Tiere der limitierende Faktor, denn die WT-Mäuse zeigen eine nicht-signifikante Zunahme von MDA um 11% und HNE um sogar 31%. Die durch Kaffeemelanoide verursachte Herunterregulierung der Cu/ZnSOD-Expression in den RAGE-KO-Mäusen könnte ebenfalls durch mangelnden Schutz zur verstärkten Lipidperoxidation beitragen. Jedoch ist unklar, warum dieser Effekt in

Abwesenheit von RAGE auftreten sollte. Möglicherweise könnte die AGE-induzierte Bildung von ROS bei Ausschalten des RAGE-Rezeptors auch über einen anderen Rezeptor für AGEs vermittelt werden. So konnte bei den RAGE-KO-Mäusen auf mRNA-Expressionsebene nach Verabreichung von Kaffeeextrakt eine Erhöhung der Expression von AGE-Rezeptor 2 um 30% beobachtet werden.

Kaffeeextrakt senkt die Expression von Hypertrophie markern und steigert die Expression von Fibrose markern in Herzen der RAGE-KO-Mäuse

Kardiale Hypertrophie ist gekennzeichnet durch eine Vergrößerung des Herzens infolge der Zunahme des Zellvolumens ohne Zellteilung, um sich an eine physiologische Mehrbelastung oder pathologische Überbelastung anzupassen (128). Gleichzeitig erfolgen zahlreiche Änderungen in der Genexpression. So ist typischerweise bei einer Hypertrophie die Expression von β -MHC, α -Actin, Tropomyosin (Tpm) und ANF erhöht, wohingegen die Expression von α -MHC vermindert ist (129,130). Im Rahmen der Hypertrophie sind häufig auch fibrotische Veränderungen zu beobachten, gekennzeichnet durch eine vermehrte Bildung von perivaskulärem und intestinellen Collagen resultierend in einer zunehmenden Versteifung des Herzens (131). An der Entstehung der Fibrose sind neben Dehnungsreizen auch Mediatoren wie Angiotensin II und TGF- β 1 beteiligt. TGF- β 1 induziert die Transformation von Fibroblasten zu Myofibroblasten, welche daraufhin verstärkt Kollagen produzieren (132). In den Versuchen zeigten die RAGE-KO-Mäuse auf der einen Seite eine Abnahme der mRNA-Expression von ANF, α -Actin und Tropomyosin und auf der anderen Seite einen signifikanten Anstieg der Fibrose marker TGF- β 1 und Collagen 1a1. Somit scheint der verwendete Kaffee einer Hypertrophie entgegenzuwirken und andererseits profibrotisch zu wirken. Eine potentiell schützende Wirkung von AGEs gegen Hypertrophie ist bis jetzt nicht beschrieben worden. Dass AGEs möglicherweise Einfluss auf die Entstehung einer Fibrose haben können, ist bereits bekannt. So führte die Inkubation von renalen mesengialen Zellen mit AGE-BSA zu einer vermehrten Kollagenproduktion (133). Ähnliche Effekte zeigten sich nach Injektion von AGE-BSA in Rattennieren, die zu einer gesteigerten Expression von Collagen IV und TGF- β 1 führten (134). Dass auch im Herzen AGEs auf fibrotische Vorgänge einen Einfluss haben könnten, lassen Vergleiche von diabetischen und somit hohen AGE-Gehalten und gesunden Rattenherzen vermuten (135). In den diabetischen Herzen konnten erhöhte Expressionen von Collagen und TGF- β 1 im Vergleich zu den gesunden Kontrollen gefunden werden, was durch Einsatz der AGE-Crosslink-Breaker ALT-711 und C36 verhindert wurde. Interessant ist jedoch, warum all die genannten Veränderungen nur in Abwesenheit von RAGE auftreten. Ursächlich könnte eine unterschiedliche Futteraufnahme

sein. Dagegen spricht die beobachtete Senkung der RAGE-mRNA-Expression durch Kaffee in den Herzen der WT-Mäuse. Hierbei könnte es sich um einen Schutzmechanismus des Herzen handeln, der durch Senkung der RAGE-Expression eine Aufnahme oder Wirkung von AGEs aus dem Kaffee verhindert. Wenn RAGE jedoch bereits fehlt, kann das Herz nicht mit einer Senkung als AGE-Antwort reagieren und die aufgenommenen AGEs können andere Reaktionsmechanismen auslösen. Für eine genaue Aussage fehlen jedoch die Expressionsgehalte von RAGE auf Proteinebene.

4.4. Einfluss von diätetisch verabreichter Brotkruste auf oxidativen Stress und AGE-Modifikationen im Herz-Kreislaufsystem

Bei der Messung der AGE-spezifischen Fluoreszenzen im Serum zeigten sich Unterschiede in Abhängigkeit von der Fütterungsdauer

Bei Analyse der Fluoreszenzen im Serum konnten nach Brotkrustenfütterung für drei Tage und auch vier Wochen signifikante Zunahmen der Fluoreszenzen beobachtet werden, was auf eine Aufnahme von AGEs aus der Brotkruste hinweist. Dies entspricht den Ergebnissen der Dotblot-Analysen von Ruhs (117) bezüglich der AGE-Modifikationen im Kaffee- und Brotkrustenextrakt. Im Brotkrustenextrakt konnte im Gegensatz zum Kaffee Pentosidin nachgewiesen werden. Da Pentosidin eine spezifische Fluoreszenz bei 330nm hat, liegt die Vermutung nahe, dass im Serum der Tiere nach drei Tagen bzw. vier Wochen sich Pentosidin angereichert hat. Entsprechend der Vermutung waren nach drei Tagen Fütterung die Serum-Gehalte von Pentosidin erhöht. Auf der anderen Seite hat auch Arg-Pyrimidin mit 330nm/405nm eine mit Pentosidine vergleichbare Fluoreszenzcharakteristik. In Dotblot-Analysen war Arg-Pyrimidin im Serum nach drei Tagen Brotkrustenfütterung jedoch unverändert und nach vier Wochen sogar vermindert. Auch die Gehalte der nicht-fluoreszierenden AGEs im Serum (CML, AGE) zeigten mittels Dotblot keine Veränderung nach drei Tagen, obwohl diese Verbindungen nachweislich im Brotkrustenextrakt vorhanden waren (136). Dagegen konnte eine Zunahme der Gehalte an 3-DG-Imidazolone nach drei Tagen gesehen werden. Nach vier Wochen Brotdiät waren im Serum vermehrte Gehalte an CML und MDA zu sehen, während die Arg-Pyrimidingehalte vermindert war. Ähnliches beobachteten auch Somoza et al. mit einer Abnahme des renalen CML-Gehaltes bei gleichzeitiger Zunahme des MDA-Gehaltes nach sechs Wochen Brotkrustenfütterung (137).

Vier Wochen Brotkruste führt zu einer kardialen geringen AGE-Anreicherung

Der Nachweis von AGE-Modifikationen im Herzen erfolgte zum einen mittels Messung AGE-spezifischer Fluoreszenzen sowie AGE-spezifischer Antikörper. Da im Western Blot die Gefahr besteht, große Proteine beim Transfer aus dem Gel auf die Membran zu verlieren, wurde zusätzlich auch der Dotplot zum Nachweis von Modifikationen im Herzen gewählt. Interessanterweise zeigte sich im Dotplot nach drei Tagen eine Abnahme von Arg-Pyrimidin im Herzen bei der WT- als auch RAGE-KO-Mäusen, während im Western Blot für WT-Mäuse die Zunahme von Arg-Pyrimidin zu sehen war. Obwohl die AGE-Fluoreszenz im Serum nachweislich erhöht war, konnte eine Anreicherung von fluoreszierenden AGEs im Herzen nicht beobachtet werden, weder nach drei Tagen noch nach vier Wochen. Dies steht im Widerspruch zu Ergebnissen von Bartling et al., die nach Brotkrustenfütterung in den Lungen von Ratten mittels Dot Blot eine Anreicherung von unspezifischen AGEs, CML, und Arg-Pyrimidin sehen konnten (119). Jedoch erfolgte hier die Fütterung über einen Zeitraum von zwei Wochen. Ebenso konnten Somoza et al. eine Anreicherung von AGE, CML und Pentosidin in der Niere, gemessen mittels Dotplot, nach 15-tägiger Brotkrustenfütterung beobachten (118). Dass von dem aufgenommenen Brotkrustenextrakt aber tatsächlich im Herzen etwas ankommt, zeigten die immunohistochemischen Untersuchungen nach 3 Tagen Brotkruste. Bei den WT-Mäusen konnte im Vergleich zur Kontrolle eine eindeutig stärkere CML-Färbung im Schnitt gesehen werden. Möglicherweise ist ein längerer Fütterungszeitraum notwendig für die Modifikation von großen Proteinen. So zeigte sich bei den Dotplot-Analysen nach vier Wochen Fütterung eine Zunahme von Arg-Pyrimidin. Bei den RAGE-KO-Mäusen konnte außerdem eine Zunahme von AGE und MDA im Herzen beobachtet werden. Ursächlich für eine kaum sichtbare CML-Anreicherung mittels Western Blot und Dotplot im Herzen könnte wiederum eventuell die Präparationsmethode zur Proteinisolation aus dem Gewebe sein. So muss davon ausgegangen werden, dass bei der angewendeten Technik vor allem große Proteine wie Collagen, und dabei insbesondere AGE-modifizierte quervernetzte Proteine, bei der Präparation verloren gehen. Eventuell besitzt das Herz aber auch, im Vergleich zu anderen Organen, Schutzmechanismen vor der übermäßigen Anreicherung von AGEs im Herzen, wie die Senkung der RAGE-Expression.

Die Ergebnisse zeigen, dass AGEs aus der Brotkruste vom Organismus aufgenommen werden, jedoch führen drei Tage noch zu keiner nennenswerten Anreicherung von AGEs im Herzen. Erst nach 4 Wochen kommt es zu ersten erhöhten Einlagerungen.

Kurzzeitfütterung der Brotkruste zeigt eine antioxidative Wirkung

In einer Studie von Lindenmeier et al. konnten in vitro antioxidative und chemopräventive Eigenschaften der Brotkruste nachgewiesen werden (138). Im Rahmen derselben Studie konnte Pronyllysin als verantwortliche Hauptkomponente für die schützenden Eigenschaften identifiziert werden. Somoza et al. gelang es schließlich auch, in vitro den Nachweis für die protektiven Effekt der Brotkruste zu erbringen (118). So konnte eine Induktion von chemopräventiven Enzymen nach 15-tägiger Brotkrustendiät in der Leber von Ratten beobachtet werden sowie eine erhöhte antioxidative Kapazität in der Niere. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass Brotkruste auch im Herzen antioxidativ wirksam ist. Nach drei Tagen Fütterung konnte im Herzen eine signifikante Zunahme der MnSOD-Expression, bei gleichzeitiger Abnahme der Expression von Cu/ZnSOD, ecSOD und gp91phox beobachtet werden. Die Zunahme der MnSOD und Abnahme der Cu/ZnSOD konnten auch auf Proteinebene bestätigt werden. Demnach scheint Brotkruste nach drei Tagen die ROS-Bildung durch Minderung der Expression der NADPH-Untereinheit gp91phox zu senken und gleichzeitig die Expression des Schutzzyms MnSOD zu steigern. Dass die Expression der Cu/ZnSOD und ecSOD gleichzeitig gesenkt wurde, könnte auf eine Brotkrusten-bedingte Senkung des oxidativen Stresses hinweisen. Erstaunlicherweise sind die Effekte nach vier Wochen Brotkrustenfütterung nicht mehr sichtbar. Lediglich die gesteigerte MnSOD-Expression ist noch messbar. Möglicherweise handelt es sich um einen Adaptationsmechanismus des Herzens, um das Gleichgewicht von ROS und antioxidativer Abwehr wieder herzustellen.

Vier Wochen Brotkrustendiät führen zu einem Anstieg des Nüchternblutzuckers bei den WT-Mäusen

Nach vier Wochen Brotkrustenfütterung hatten nur die WT-Mäuse signifikant höhere Blutzuckerspiegel im Vergleich zu den Kontrollen, was nach drei Tagen nicht beobachtet werden konnte. Erhöhte Blutzuckerspiegel treten im Rahmen von Diabetes mellitus auf. Ursachen sind dabei eine verminderte Insulinproduktion durch die β -Zellen des Pankreas oder eine herabgesetzte Wirkung von Insulin in der Peripherie (139). Dass AGEs möglicherweise einen Einfluss auf die Entstehung oder Ausprägung einer Insulinresistenz haben, zeigten Versuche von Hofmann et al. (140). Durch eine AGE-arme Ernährung konnte in einem Mausmodell für Übergewicht und Diabetes die Insulinsensitivität verbessert werden. Dass der Effekt nicht schon nach drei Tagen sichtbar war, könnte an der Dauer der Intervention liegen, die noch nicht ausreichend zur Ausprägung der erhöhten Blutzuckerspiegel war. Da AGEs über die Bindung an RAGE eine verstärkte Expression zahlreicher proinflammatorischer

Moleküle und die Produktion von ROS induzieren, könnte erklären, warum die RAGE-KO-Mäuse keine erhöhten Blutzuckerspiegel zeigten. So zeigten Lim et al. in Pankreaszellen eine Induktion der Apoptose durch AGEs, die nach Blockierung von RAGE gehemmt war (141). Aufgrund des Fehlens des RAGE-Rezeptors bei Knockout-Tieren bleibt möglicherweise die Schädigung durch ROS und Inflammation aus.

Nur die WT-Mäuse zeigen kurzfristige anti-fibrotische Veränderungen

Brotkruste scheint einen kurzfristigen antifibrotischen Effekt auf das Herz auszuüben, der wahrscheinlich in Abhängigkeit von RAGE auftritt. So zeigten die WT-Mäuse im Gegensatz zu den RAGE-KO-Mäusen nach drei Tagen Fütterung signifikant verminderte Expressionen von Collagen I und III, Fibulin 5, α -Aktin, und ANF. Die Expressionssenkung der Fibrosemarker durch Brotkruste konnte bereits in vitro beobachtet werden (74). Nach Inkubation von primären kardialen Fibroblasten aus Herzen von C57Bl/6-Mäusen führte Brotkruste zu einer verminderten Expression von Collagen I/III, Fibulin 5 und α -Aktin. Allerdings handelt es sich dabei wahrscheinlich nur um einen Kurzeffekt, denn die fibrotischen Veränderungen waren in vivo nach vier Wochen nicht mehr vollständig zu sehen. Lediglich die Senkung der Expression von Collagen III und Fibulin 5 war noch bei den WT-Mäusen zu beobachten, während die RAGE-KO-Tiere wiederum keine Veränderung zeigten. Die RAGE-KO-Mäuse zeigten jedoch bereits niedrigere Expressionen von Collagen 1 α 1 und Fibulin ohne Behandlung mit Brot. Allerdings war nach vier Wochen Fütterung auch eine signifikante Senkung der RAGE-Expression bei den WT-Mäusen zu beobachten. Möglicherweise handelt sich hier um einen Adaptationsmechanismus, denn nach drei Tagen Fütterung war die RAGE-Expression der WT-Mäuse unverändert.

4.5. Einfluss einer fettreichen Diät auf oxidativen Stress und AGE-Modifikationen im Herz-Kreislaufsystem

Das metabolische Syndrom und seine Folgen stellt eines der wachsenden Probleme in der modernen Gesellschaft dar (142,143). Besonders das zunehmende Übergewicht der Bevölkerung und daraus resultierende Erkrankungen, wie Diabetes mellitus, stellen das Gesundheitssystem vor ein schwerwiegendes, kostenintensives Problem. Als ursächlich für die zunehmende Zahl der übergewichtigen Menschen wird der so genannte Western Lifestyle gesehen, gekennzeichnet durch mangelnde Bewegung und eine Ernährung mit hohem Gehalt an Fett und Kohlenhydraten (144). Auch eine erhöhte endogene AGE-Bildung, resultierend aus der Aufnahme der Fette, wird durch die fettreiche Diät induziert (145).

Möglicherweise spielen AGEs, neben den Fettsäuren, auch eine entscheidende Rolle bei der Entstehung einer Insulinresistenz. So zeigten Hofmann et al. eine verbesserte Insulinsensitivität in db/db-Mäusen nach Senkung der AGE-Aufnahme (146).

Die hochkalorische, fettreiche Diät führte zur Ausprägung eines metabolischen Syndroms

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass eine so genannte Hoch-Fett-Diät bei C57Bl/6-Mäusen zu einer signifikanten Gewichtszunahme führt (147,148). Dabei konnte bereits nach nur sechs Wochen Diät das Gewicht der Tiere signifikant erhöht werden (149). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte nach vier Monaten Diät eine signifikante Gewichtszunahme beobachtet werden. Dabei unterschieden sich C57Bl/6 (WT)- und RAGE-KO-Mäuse nicht in der Gewichtszunahme. Dagegen beobachteten Tikellis et al. bei den RAGE-KO-Mäusen eine signifikant höhere Gewichtszunahme im Vergleich zu den C57Bl/6-Mäusen (105). Allerdings war der Fettgehalt (21% der Gesamtenergie aus Fett) der dort verwendeten Diät weitaus geringer. Demnach scheint RAGE in der vorliegenden Arbeit keinen Einfluss auf die Gewichtszunahme durch eine hochkalorische Diät zu haben. Neben dem Körpergewicht wurden auch die Organengewichte (Herz, Leber, Lunge, Niere) ermittelt. Dabei zeigte sich für die Leber eine Zunahme des Gewichtes durch die fettreiche Diät. So war die Ratio Lebergewicht/Körpergewicht bei den WT-Mäusen unverändert und bei den RAGE-KO-Mäusen sogar erhöht im Vergleich zur Kontrolle. Eine Zunahme der Lebergewichte nach fettreicher Diät wurde bereits in der Literatur beschrieben (150,151). Dass sich dabei die Gewichtszunahme auf die Leber beschränkt, konnten auch Costford et al. bei C57Bl/6-Mäusen beobachten (152). Die Zunahme der Lebergewichte weist auf eine Einlagerung von Fett in dem Organ hin. Jedoch wurden im Rahmen der Arbeit keine Untersuchungen zum Fettgehalt der Leber durchgeführt, somit kann auch keine eindeutige Aussage dazu erfolgen. Verbunden mit der Gewichtszunahme tritt bei der Ausbildung des metabolischen Syndroms meist auch eine Zunahme der Blutzucker- sowie Insulinspiegel im Plasma auf, was auf eine gesteigerte Insulinsekretion und verminderte Insulinsensitivität schließen lässt und damit ursächlich für die Ausbildung von Diabetes mellitus ist (149,150,153). Dabei konnten Rahe et al. schon nach neun Tagen Diät mit 60% Energie aus Fett signifikant erhöhte Blutzucker- und Insulinwerte im Plasma von C57Bl/6-Mäusen beobachten (154). Erwartungsgemäß zeigten auch die WT- und RAGE-KO-Mäuse signifikant erhöhte Blutzuckerspiegel nach viermonatiger Fettdiät. Ebenso zeigten beide signifikant erhöhte Insulinspiegel nach Fettdiät, allerdings erreichten die RAGE-KO-Mäuse der Fettgruppe vierfach höhere Insulinlevel als die WT-Mäuse. Zum einen lassen die erhöhten Blutzuckerspiegel, bei gleichzeitig erhöhten Insulingehalten, auf eine Insulinresistenz der Tiere infolge der fettreichen Diät schließen. Zum

anderen scheint RAGE hier im Gegensatz zur Brotfütterung einen Einfluss auf die Ausprägung einer Insulinsensitivität zu haben. Für genauere Aussagen bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.

Ein weiteres Merkmal des metabolischen Syndroms ist das Auftreten einer Dyslipidämie (155,156). Gekennzeichnet ist diese durch eine Hypertriglyceridämie, erhöhte LDL-Cholesterin- sowie verminderte HDL-Cholesteringehalte (157,158). Aufgrund dessen wurden im Rahmen der Arbeit die Plasmakonzentrationen von Triglyceriden (TG) und Gesamtcholesterin der Tiere ermittelt. Dabei zeigten sowohl WT- als auch RAGE-KO-Mäuse signifikant erhöhte TG- und Cholesterinkonzentrationen nach Fettdiät im Vergleich zu ihren Kontrollen. Die als Triglyceridnormwert angegeben 71mg/dl für die von Jackson Laboratory bezogenen C57Bl/6-Mäuse wurden nach Fettfütterung in beiden Gruppen mit 90-94mg/dl eindeutig überschritten und weisen damit auf die Entstehung einer Hypertriglyceridämie hin (159). Auch bei Bestimmung des Gesamtcholesterins im Plasma der Tiere zeigte sich bei beiden Tiergruppen eine signifikante Zunahme infolge der Fettdiät. Allerdings hatten die RAGE-KO-Tiere bereits in der Kontrollgruppe signifikant höhere Cholesterinwerte als die WT-Mäuse. Nicht nur die Kontrollen der RAGE-KO-Mäuse hatten höhere Gehalte, sondern auch nach Fettfütterung zeigten die Tiere einen viel stärkeren Anstieg der Cholesterinkonzentrationen im Vergleich zu den WT-Mäusen. Demnach scheint RAGE neben dem Insulinstoffwechsel auch im Cholesterinstoffwechsel eine Rolle zu spielen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl die WT- als auch die RAGE-KO-Mäuse nach Vier Monaten Fettdiät ein deutliches metabolisches Syndrom entwickeln, welches gekennzeichnet ist durch Adipositas, Insulinresistenz und Dyslipidämie. Die RAGE-KO-Mäuse zeigten dabei eine stärkere Ausprägung der Symptome, was auf einen möglichen Einfluss von RAGE bei der Entstehung des metabolischen Syndroms schließen lässt.

Die Fettdiät führte zu keiner erhöhten AGE-Aufnahme und messbaren kardialen AGE-Anreicherung

Gegen eine direkte Aufnahme von AGEs aus der fettreichen Diät spricht zum einen die nach Diät im Serum gefundene paradoxe Abnahme der AGE-spezifischen Fluoreszenz bei 330nm/405nm und zum anderen auch die Abnahme der Gehalte an Arg-Pyrimidin und 3-DG-Imidazolone. Ebenso führt die Diät trotz des langen Fütterungszeitraumes zu keiner Anreicherung von messbaren AGEs im Herzen. Im Gegensatz zur hiesigen Studie zeigten Ratten nach 12 Wochen *high-fat*-Diät eine signifikant erhöhte Serum-AGE-Fluoreszenz bei 350nm/450nm, sowie erhöhte AGE-Gehalte im Herzen und der Leber (145). Allerdings lässt sich eine AGE-Aufnahme und auch AGE-Anreicherung nicht vollkommen ausschließen, da

eventuell auch noch nicht identifizierte und nachweisbare AGE-Strukturen aufgenommen werden können. Ebenso könnte auch hier die Probengewinnung ursächlich für eine nicht nachweisbare AGE-Anreicherung im Herzen sein. Auch die Einlagerung der AGEs im Fettgewebe, als Schutzmechanismus vor einer Einlagerung im Herzen, wäre denkbar. Allerdings wurden im Fettgewebe keine Untersuchungen zur AGE-Akkumulation durchgeführt. Was jedoch auf eine vermehrte AGE-Anreicherung hindeutet, ist die Zunahme der Expression von drei AGE-bindenden Rezeptoren: AGE-Rezeptor 1 und 2 sowie Scavenger Rezeptor 1 (Srb1). Es ist bekannt, dass die Rezeptorexpression mit den AGE-Gehalten korreliert und eine Zunahme der AGEs auch zu einer Zunahme der Expression dieser Rezeptoren führt (160,161). Diesen Rezeptoren wird im Gegensatz zu RAGE aber eher eine Funktion bei der Detoxifizierung und Beseitigung von AGEs zugesprochen (162,163,164). Vor allem der AGE-R1 soll die AGE-vermittelte ROS-Bildung und Inflammation hemmen (165,166). So zeigten AGE-R1-Überexpressionsmäuse nach fettreicher Diät verminderte Serum-AGE-Gehalte, verstärkte antioxidative Reserven und waren resistent gegenüber Hyperglykämie im Vergleich zu ihren Kontrolltieren (167). Möglicherweise erklärt dies, dass sich keine AGEs im Herzen anreichern, da sie direkt über die AGE-Rezeptoren wieder eliminiert wurden.

Die fettreiche Diät führt zu oxidativen Veränderungen unabhängig von RAGE

Zahlreiche Studien zeigen, dass eine fettreiche Ernährung und damit verbundene Adipositas zu einer erhöhten myokardialen Lipidperoxidation und oxidativen Schädigungen führt (168,169). So weisen auch in der vorliegenden Arbeit die gesteigerte Expression der Cu/ZnSOD, die vermehrte Carbonylgruppenbildung und die erhöhten MDA-Gehalte im Herzen auf erhöhten oxidativen Stress hin. Eine erhöhte Carbonylformation im Herzen, nach einer *high-fat* Diät konnten Ballal et al. ebenfalls bei Wistar-Ratten beobachten (170). Vincent et al. konnten zeigen, dass für die gesteigerte myokardiale Lipidperoxidation eine gesteigerte Herztätigkeit und damit ROS-Produktion sowie erhöhte Lipidgehalte als Substrate für die Lipidperoxidation ursächlich sind (169). Da in den vorliegenden Experimenten keine AGE-Anreicherung nach Fütterung der Fettdiät zu sehen war, bleibt die Frage offen, ob auch in der Diät enthaltene oder endogen gebildete AGEs über eine Interaktion mit RAGE zum Anstieg des oxidativen Stresses beitragen oder nicht. Der Theorie entsprechend, hätte man für die RAGE-KO-Mäuse keinen erhöhten oxidativen Stress erwartet, wenn AGEs über Bindung an RAGE zu der gesteigerten ROS-Produktion beitragen. Wahrscheinlich ist die vermehrte ROS-Produktion eher eine Folge der gesteigerten β -Oxidation durch die erhöhte Lipidaufnahme. Bei den Expressionsanalysen der antioxidativen Enzyme zeigten sich unterschiedliche

Ergebnisse für WT- und RAGE-KO-Mäuse. Während die WT-Mäuse mit einer signifikanten Abnahme der Expression von MnSOD und Cu/ZnSOD reagierten, zeigte sich bei den RAGE-KO-Mäusen ein Anstieg der beiden Enzymexpressionen, der ebenfalls auf Proteinebene zu sehen war. Was verantwortlich für dieses Auftreten ist, ist unklar, denn beide zeigten erhöhten oxidativen Stress in Form des Anstieges der Carbonylgruppen im Herzen, was zunächst auf eine Induktion der antioxidativen Schutzsysteme schließen lässt. Allerdings werden in der Literatur beide Ereignisse beschrieben. So konnte nach Cortisongabe in Rattenherzen eine erhöhte Protein- und Lipidoxidation bei gleichzeitiger Abnahme der SOD-Aktivität beobachtet werden (171). Auch infolge einer fettreichen Diät zeigten Ratten eine Zunahme des kardialen oxidativen Stresses mit gleichzeitiger verminderter SOD-Aktivität (172). Wohingegen in einem Rattenmodell für Übergewicht im linken Ventrikel die Aktivität der MnSOD bei gleichzeitiger Zunahme der Lipidperoxidation erhöht war (168).

Gesteigerte Inflammation tritt infolge von erhöhtem oxidativen Stress auf. So konnte auch für den Inflammationsmarker Lipocalin 2 eine Induktion der kardialen Expression bei Mäusen in Folge von erhöhtem oxidativen Stress durch Ionen-Bestrahlung gezeigt werden (173). Neben erhöhtem oxidativen Stress wurde auch im Falle der Herzinsuffizienz eine gesteigerte kardiale Lipocalin 2-Expression gezeigt (174). Obwohl es im Falle der hier gefütterten Fettdiät zur Induktion von oxidativen Stress kommt, zeigte sich eine paradoxe Abnahme der Lipocalin 2 Expression.

RAGE-KO-Mäuse zeigen nach Fettdiät fibrotische Veränderungen im Herzen

Bekannt ist, dass bei einem durch fettreiche Ernährung induzierten metabolischen Syndroms auch kardiovaskuläre Veränderungen auftreten können. So kam es bei Ratten nach achtwöchiger *high-fat* Diät zum Auftreten einer myokardialen perivaskulären Fibrose (175). Ebenso zeigten C57Bl/6-Mäuse nach sechs Monaten fettreicher Ernährung eine kardiale Fibrose mit vermehrter Collagenproduktion (176). Tikelis et al. konnten nach Fettdiät ebenfalls signifikant erhöhte Expressionen von Collagen I und IV bei den C57Bl/6-WT-Mäusen zeigen, welche allerdings bei den RAGE-KO-Mäusen nicht zu sehen waren (105). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich das gegenteilige Bild. Vor allem die RAGE-KO-Mäuse reagierten auf die fettreiche Ernährung mit einer Expressionserhöhung von Collagen I und III und einem Anstieg der β -MHC-Expression. Neben der β -MHC-Expressionssteigerung konnte bei den RAGE-KO-Mäusen auch eine erhöhte Expression von ANF gesehen werden. Eine erhöhte Expression von ANF bei kardialer Hypertrophie konnte bereits in früheren Studien beobachtet werden (177). Demnach zeigen die RAGE-KO-Mäuse im Gegensatz zu den WT-Mäusen, neben einer pro-fibrotischen, auch hypertrophe Veränderungen unter Fettdiät.

4.6. Einfluss von Laufradtraining auf oxidativen Stress und AGE-Modifikationen im Herz-Kreislaufsystem von alten C57Bl/6 und RAGE-KO-Mäusen

Da AGEs irreversibel gebildet werden, kommt es mit zunehmendem Alter zu einer Anreicherung im Organismus. Besonders Proteine mit einem geringen Turnover, wie Collagen und Laminin, sind von AGE-Modifikationen betroffen. Durch die Ausbildung von so genannten *Crosslinks*, führen AGEs in Organen mit hohem Anteil an langlebigen Proteinen, wie dem Herz, zu einer zunehmenden Versteifung und verminderter Elastizität, resultierend in einer eingeschränkten Funktion. Demnach kann vermutet werden, dass mit Senkung des AGE-Gehalts auch eine altersbedingte Versteifung des Herzens vermindert werden kann. Dass dies prinzipiell möglich ist, zeigten Studien mit Aminoguanidin. Durch Behandlung mit dem Inhibitor der AGE-Bildung, konnte eine altersbedingte Versteifung der Aorta verhindert werden (178). Da bekannt ist, dass auch sportliche Aktivität zu einer verbesserten Herzfunktion beiträgt (179), sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob Sport im hohen Alter eine mögliche Intervention zur Reduktion von AGE-Gehalten in Serum und Herzen darstellt.

RAGE-KO-Mäuse sind aktiver im Vergleich zu den C57Bl/6 (WT)-Mäusen

Ein weitläufig verwendetes Model zur Untersuchung des Einflusses von körperlicher Aktivität ist der Einsatz eines Laufrads (180,181). Dazu werden die Tiere in Einzelhaltung gesetzt und ihr natürlicher Laufimpuls durch das Vorhandensein eines Laufrades angeregt. Die 24 Monate alten WT-Mäuse legten am Tag durchschnittlich eine Strecke von 2,3km zurück, wohingegen die RAGE-KO-Mäuse ca. 2,7km/d liefen. Netea et al. zeigten, dass weibliche C57Bl/6-Mäuse im Alter von 6-8 Monaten durchschnittlich 3,2 km/d liefen, während de Waard et al. bis 7km/d für ihre 12 Wochen alte WT-Tiere beobachteten (182,183). Da mit zunehmendem Alter der Tiere auch ihre Leistungsfähigkeit abnimmt, könnte dies die verhältnismäßig geringen Strecken erklären (184). Durrant et al. konnten bei jungen B6D2F1-Mäusen eine durchschnittlich gelaufenen Strecke von sogar 12km/d messen, während alte Mäuse gerade einmal 1km/d absolvierten (185). Neben der durchschnittlich längeren Strecke, zeigten die RAGE-KO-Mäuse im Mittel auch eine höhere Laufgeschwindigkeit als die WT-Mäuse und scheinen somit aktiver zu sein. Das bestätigen auch die Ergebnisse von Sakatani et al., die mittels verschiedener Standardtest zur Überprüfung des Verhaltens C57Bl/6- und RAGE-KO-Mäuse verglichen haben (186). Dabei

wurde ebenfalls eine höhere Aktivität für die RAGE-KO-Mäuse beobachtet, besonders in der Dunkelphase des 12 Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus. Durch die Laufradintervention wurde das Körpergewicht nicht beeinflusst, was die Ergebnisse von Durrant et al. bestätigt, wonach bei B6D2F1-Mäusen nach 14 Wochen Laufradtraining ebenfalls keine Änderung des Körpergewichtes zu sehen war.

AGEs reichern sich im Alter an und können durch Sport vermindert werden

Durch die Messung der AGE-spezifischen Fluoreszenz in Serum und Herzen der Mäuse konnte die Annahme einer altersbedingten Zunahme der AGE-Gehalte bestätigt werden. Sowohl im Herzen als auch im Serum zeigten die alten Tiere eine erhöhte AGE-spezifische Fluoreszenz im Vergleich zu den Jungtieren. Nach viermonatigem Laufradtraining konnten die AGE-Gehalte im Serum sowohl bei den WT- als auch bei den RAGE-KO-Mäusen signifikant gesenkt werden. Ähnliche Ergebnisse erzielten Boor et al. in adipösen Zucker-Ratten. Nach zehn Wochen Laufbandtraining zeigten diese eine Senkung der Plasma-AGE-Fluoreszenz (187). Durch das Training konnten außerdem die AGE-Gehalte in der Niere vermindert werden, wohingegen bei der vorliegenden Studie lediglich die WT-Mäuse eine signifikante Senkung der kardialen AGE-Fluoreszenz bei 360nm/440nm zeigten. Allerdings konnte auch bei den RAGE-KO-Mäusen eine Tendenz zur Abnahme beobachtet werden. Möglicherweise spielt die Art des Trainings eine Rolle. Die Tiere im Versuch liefen freiwillig, wohingegen die Ratten ein gezieltes und möglicherweise effizienteres Programm absolvierten. So scheint jedoch bereits eine moderate Bewegung zur Senkung der AGE-Gehalte im hohen Alter beizutragen. Jedoch ist die AGE-Senkung gemessen mittels Fluoreszenz, nicht beim Nachweis von spezifischen Modifikationen (CML, AGE, Arg-Pyrimidin, 3-DG-Imidazolone, Pentosidin, MDA) im Dotplot sowie Western Blot nachvollziehbar. Da es jedoch eine unerschöpfliche Anzahl an Modifikationen gibt, aber nur für einen Bruchteil Antikörper zur Identifizierung zur Verfügung stehen, besteht die Möglichkeit, dass mittels Fluoreszenz die Abnahme zahlreicher unbekannter Modifikationen nachgewiesen wurde.

WT und RAGE-KO-Mäuse zeigen moderate oxidative Reaktionen auf das Laufradtraining

Bekannt ist, dass Sport zu Beginn zu einer vermehrten Produktion von ROS führt (188), während es bei einer längerfristigen Bewegung zur Aktivierung von Abwehrsystemen, wie den SODs, kommt und damit zur Abnahme des oxidativen Stresses (Hormesis-Theorie) (190). So konnte bei den RAGE-KO-Mäusen eine signifikante Senkung der Carbonylgehalte im Herzen beobachtet werden infolge der dreimonatigen Laufradintervention. Die WT-Mäuse zeigten ebenfalls eine Abnahme, die womöglich aufgrund der geringen Versuchstieranzahl

nicht signifikant war. Im Gegensatz dazu zeigten die WT-Mäuse einen Anstieg der HNE-Addukte im Herzen. Die Expression der antioxidativen Enzyme wurde durch den Sport kaum beeinflusst. Lediglich die MnSOD-Expression stieg signifikant in den Herzen der RAGE-KO-Mäuse an. Auch die WT-Mäuse zeigten eine nicht signifikante Zunahme von 25%. Ähnliche Beobachtungen machten Lawler et al. mit alten Ratten, bei denen nach 12 Wochen Laufbandtraining in Herzen eine erhöhte MnSOD-Expression ohne Änderung der Cu/ZnSOD-Expression nachgewiesen werden konnte (189). Gleichzeitig nahm der Gehalt an Hydroxiden und HNE-Addukten ab, was auf verminderten oxidativen Stress hinweist. Die Abnahme der oxidativen Veränderungen ist möglicherweise auch eine Folge der geringen Trainingsintensität. Die Tiere konnten nach eigenem Ermessen ohne vorgeschriebenes Trainingsprogramm laufen, was letztlich als moderate Form der Bewegung bewertet werden kann. So demonstrierten Lovlin et al., dass intensives Laufbandtraining die Gehalte an MDA ansteigen lässt, während bei moderater Bewegung die Gehalte unverändert waren und Training mit geringer Intensität sogar eine Abnahme bewirkte (191).

Eine verstärkte Inflammation wird ebenfalls im Zusammenhang mit Sport postuliert. Da auch eine Aktivierung von RAGE zu akuter Inflammation führen kann, lag die Vermutung nahe, dass RAGE-KO-Mäuse keine Inflammation durch körperliche Aktivität zeigen (192). Die Vermutung wird erhärtet durch Untersuchungen von Mäusen mit Streptozotzin-induziertem Diabetes und doppeltem Knockout von ApoE und RAGE (193). Die Mäuse ohne RAGE zeigten niedrigere Gehalte an proinflammatorischen Markern, wie VCAM-1 und MCP-1. Zur Überprüfung der Hypothese wurde die Expression des Inflammationsmarkers Lipocalin 2 bestimmt. Dabei zeigte sich eine Induktion der Expression im Herzen der WT-Mäuse nach viermonatigem Laufradtraining, welche bei den RAGE-KO-Mäusen nicht beobachtet werden konnte. Demnach scheint auch hier die erhöhte Inflammation über RAGE vermittelt zu werden. Allerdings ist Lipocalin 2 bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht als RAGE-induzierbares Gen bekannt.

Ein häufig auftretendes Phänomen bei Ausdauersportlern ist das Auftreten einer physiologischen Hypertrophie (194). Gekennzeichnet ist diese vor allem durch eine Vergrößerung des Herzens. In der vorliegenden Arbeit, wurden zur Überprüfung einer Sport-induzierten Veränderung am Herzen der Tiere, Genexpressionen spezifischer Hypertrophie- und Fibrosemarker ermittelt. Die WT-Mäuse zeigten dabei keine Änderung in der Expression der untersuchten Marker, wohingegen die RAGE-KO-Mäuse einen Anstieg der Expressionen von β -MHC und Collagen 1 zeigten. Ähnliche Beobachtungen machten Thomas et al., welche einen Anstieg in der Expression von Collagen I und III in Rattenherzen nach zehn Wochen

Training auf dem Laufband zeigten (195). In einer weiteren Studie mit Ratten konnte auch die Zunahme der Expression der MHCs nach acht Wochen Laufbandtraining beobachtet werden (196). Allerdings ist unklar, warum nur die RAGE-KO-Mäuse die genannten Veränderungen zeigten. Eine mögliche Erklärung könnte die Tatsache der größeren Laufbereitschaft sein. Möglicherweise ist dies mit einer höheren Trainingsintensität gleichzusetzen und somit mit größeren Trainingseffekten. Da aufgrund des hohen Alters jedoch die Versuchstierzahl begrenzt war und während des Versuchszeitraumes ein Teil der Tiere verstorben ist, kann auch eine zu geringe Tierzahl statistisch signifikante Ergebnisse verhindern. Denn die Anzahl der Tiere in den WT-Gruppen lag zwischen fünf und sechs, während die RAGE-KO-Gruppen acht bis neun Tiere beinhalteten. Außerdem zeigten die RAGE-KO-Mäuse bereits im Ruhezustand signifikant geringere Gehalte an Collagen1 und β -MHC und erreichten nach dem Sport erst das Genexpressionsniveau der WT-Kontrolltiere.

Ausblick

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die AGE-Zufuhr über die drei gewählten Nahrungsquellen in den Versuchszeiträumen zu keiner übermäßigen AGE-Akkumulation im Herzen des gesunden Organismus beiträgt. Um auszuschließen, dass eine AGE-Anreicherung methodisch-bedingt nicht nachweisbar war, wären anschließende Arbeiten mit anderen Proteinpräparationsmethoden sinnvoll, um den Verlust großer Proteine zu minimieren sowie immunohistochemische Untersuchungen zum AGE-Gehalt. Ferner könnte eine Fütterung über einen längeren Zeitraum (sechs Monate) angedacht werden, um eine Langzeitaufnahme von hohen AGE-Mengen zu symbolisieren. Weiterführende Arbeiten zur antioxidativen Wirksamkeit der Kurzzeitfütterung mit Brotkruste wären ebenfalls denkbar. Möglicherweise könnte die Brotkrustengabe *in vivo* eine Intervention zum Schutz vor oxidativen Stress in Form von Ischämie/Reperfusion bei Operationen am Herzen darstellen.

5. Zusammenfassung

Advanced glycation endproducts (AGEs) entstehen bei der nicht-enzymatischen Reaktion von reduzierenden Zuckern mit freien Aminogruppen von Proteinen oder Lipiden. Eine Akkumulation von AGEs findet mit zunehmendem Alter und unter pathophysiologischen Zuständen (Diabetes mellitus, Nierenerkrankung) statt. Dies resultiert durch die Ausbildung von sog. *Crosslinks* in einer Versteifung von intestinalem und vaskulärem Gewebe. Ebenso sind AGEs, nach Interaktion mit dem *Receptor for advanced glycation endproducts* (RAGE), in der Lage, zu einer vermehrte ROS-Produktion und Induktion proinflammatorischer Zytokine und damit Entwicklung einer eingeschränkten Herzfunktion beizutragen. Dass auch eine exogene AGE-Zufuhr über die Nahrung zu erhöhten AGE-Gehalten im kranken Organismus beitragen, konnte mehrfach beobachtet werden. Ob jedoch im Herz-Kreislaufsystem des gesunden Organismus Nahrungs-AGEs zu einer Akkumulation und somit Funktionsbeeinträchtigung beitragen, ist bisher nicht bekannt. Zur Beantwortung der Fragestellung wurden in der vorliegenden Arbeit unterschiedliche Nahrungsquellen für die Aufnahme und endogene Bildung von AGEs (Kaffee, Brotkruste, Fett) gewählt und diese über verschiedene Zeiträume gesunden C57Bl/6 (WT)- und RAGE-KO-Mäusen diätetisch verabreicht. Die mit dem Alter auftretende Akkumulation von AGEs wird ebenfalls mit der Entstehung einer eingeschränkten Herzfunktion assoziiert. Ob diese Anreicherung mittels der Intervention Sport beeinflusst werden kann, sollte in einem vierten Versuchsansatz durch Lauftradtraining von alten Mäusen untersucht werden.

Im **Versuchansatz 1** erfolgte eine 14-tägige Fütterung einer mit AGE-reichem Kaffee angereicherten Diät an 15 Monate alten C57Bl/6 (WT)- und RAGE-KO-Mäusen. Die Fütterung führte zu keiner Akkumulation von AGEs im Herzen der Tiere. Lediglich bei den RAGE-KO-Mäusen konnte die Aufnahme von AGEs im Serum durch eine erhöhte Fluoreszenz bei 360/440nm und einen Anstieg der Arg-Pyrimidingehalte beobachtet werden. Ebenso zeigten sie eine erhöhte kardiale Lipidperoxidation (MDA, HNE) bei verminderter Cu/ZnSOD Expression sowie Anzeichen für fibrotische Veränderung, gekennzeichnet durch eine Expressionssteigerung von TGF- β 1 und Collagen 1a1. Gleichzeitig konnte eine Senkung der Expression der Hypertrophiemarker ANF, α -Aktin und Tropomyosin 1 bei den RAGE-KO-Mäusen beobachtet werden. Die C57Bl/6 (WT)-Mäuse zeigten lediglich eine Abnahme der RAGE-Expression, als möglichen Schutzmechanismus.

Für **Versuchansatz 2** diente als Quelle für Nahrungs-AGEs Brotkruste. Drei Monate alte Versuchstiere wurden über einen Zeitraum von drei Tagen bzw. vier Wochen gefüttert. Nach drei Tagen konnte eine antioxidative Wirkung der Brotkruste bei den C57Bl6-Mäusen, durch

Senkung der gp91phox Expression bei gleichzeitiger Expressionserhöhung der MnSOD, beobachtet werden. Die RAGE-KO-Tiere zeigten nur eine Senkung der Cu/ZnSOD-Expression als Zeichen für verminderten oxidativen Stress. Bei den WT-Tieren konnte eine kardiale Anreicherung von AGEs immunohistochemisch durch CML-Nachweis gezeigt werden sowie molekularbiologisch durch Zunahme von Arg-Pyrimidin und 3-DG-Imidazol. Die Senkung der kardialen Expression von Collagen I/III, Fibulin 5 und TGF- β 3 deutet auf eine antifibrotische Wirkung hin, sowie die Abnahme der Marker MHC, ANF und α -Aktin auf eine antihypertrophe Wirksamkeit. Nach vier Wochen waren die beobachteten Effekte nur noch in abgeschwächter Form zu sehen. Lediglich Collagen III und Fibulin 5 zeigten noch eine signifikante Expressionssteigerung im Herzen der WT-Mäuse bei gleichzeitiger Expressionsverminderung des RAGE-Rezeptors. Eine AGE-Aufnahme in das Serum und Akkumulation im Herzen (AGE, MDA) war nur noch bei den RAGE-KO-Mäusen nachweisbar. Möglicherweise findet nach vier Wochen eine Adaptation an die hohe AGE-Zufuhr statt.

Eine *high-fat* Diät mit 60% Energie aus Fett wurde als potentielle Nahrungsmittelquelle für eine endogene AGE-Bildung in **Versuchsansatz 3** drei Monate alten C57Bl/6 und RAGE-KO-Mäusen verabreicht. Nach Beendigung der 14-wöchigen Fütterung, konnte bei allen Tieren die Ausbildung eines metabolischen Syndroms beobachtet werden, gekennzeichnet durch Adipositas, erhöhte Blutzucker- und Insulinspiegel sowie eine Hypertriglyceridämie. Eine AGE-Anreicherung im Serum sowie im Herzen konnte nicht gesehen werden. Sowohl C57Bl/6- als auch RAGE-KO-Mäuse zeigten vermehrten oxidativen Stress in Form von erhöhten Carbonylgehalten im Herzen. Dagegen konnte die Induktion zahlreicher AGE-Rezeptoren (AGE-Rezeptor 1+2, Scavenger Rezeptor 1) vor allem bei den RAGE-KO-Mäusen beobachtet werden sowie eine Induktion profibrotischer Gene (Collagen I/III).

Für **Versuchsansatz 4** wurden C57Bl/6- und RAGE-KO-Mäuse im Alter von 24-26 Monaten gewählt. Mittels der Intervention Sport, in Form von Laufradtraining über drei Monate, sollte der Einfluss der Intervention Sport auf die altersbedingte Akkumulation von AGEs im Herzkreislaufsystem untersucht werden. Dabei zeigten die RAGE-KO-Mäuse eine höhere Laufbereitschaft als die C57Bl/6 (WT)-Mäuse. Mittels Sport konnten die Serum- und kardialen Gehalte an fluoreszierenden AGEs vermindert werden. Des Weiteren zeigten die RAGE-KO-Mäuse eine erhöhte Expression der antioxidativ wirksamen MnSOD bei gleichzeitiger Verminderung der kardialen Carbonylgehalte und somit oxidativ veränderten Proteinen. Die WT-Mäuse hingegen zeigten lediglich eine Erhöhung der Expression des Inflammationsmarkers Lipocalin 2.

Summary

Advanced glycation endproducts (AGEs) are molecules formed from the nonenzymatic reaction of reducing sugars with free amino groups of proteins or lipids. AGEs accumulate with increasing age and under pathophysiological conditions (diabetes mellitus, nephropathie) which results in an increasing stiffness of vessel walls. Otherwise, AGEs are able to induce the production of ROS and inflammatory cytokines by binding to the *receptor of advanced glycation endproducts* (RAGE). Previous studies have shown that AGEs from food could increase the body pool under pathophysiological conditions. If food-derived AGEs increase the AGE content in cardiovascular system of a healthy organism is still unknown. For answering these question three different sources of food-AGEs (coffee, bread crust high-fat) were fed to healthy C57Bl/6 (WT) mice and RAGE-knockout (RAGE-KO) mice for different periods. The accumulation of AGEs with increasing age is also associated with limited heart function. If the age-related accumulation could be influenced by wheel running was analysed in the fourth experiment.

In **experiment 1** 15 month old C57Bl/6 mice and RAGE-KO mice were fed an coffee-enriched diet for 14 days. Coffee diet does not increase the cardiac AGE-content. Only RAGE-KO mice showed increased cardiac content of lipidperoxidation products (MDA, HNE) whereas Cu/ZnSOD expression diminished, as well as fibrotic changes with increased expression of TGF- β 1 and collagen 1a1. Furthermore the RAGE-KO mice showed reduced expression of the markers for hypertrophy ANF, α -actin and tropomyosin 1. C57Bl/6 mice showed only diminished cardiac RAGE expression.

In the **second experimental approach** bread crust was used as source for food-derived AGEs. Three month old mice were fed over a period of three days or rather four weeks. After three days bread crust feeding antioxidative effects in hearts of C57Bl/6 mice were seen by reduced gp91phox expression and concurrently increased MnSOD expression. RAGE-KO mice showed only reduced oxidative stress by reduced expression of Cu/ZnSOD. Immunohistochemical an accumulation of CML-adducts could be seen in hearts of C57Bl/6 mice as well as an increase in arg-pyrimidin and 3-DG-imidazolone. The reduced cardiac expression of collagen I/III, fibulin 5 and TGF- β 3 indicates for an antifibrotic effect as well as reduced expression of MHC, ANF and α -actin for an antihypertrophic effect. After four weeks this effects were alleviated. Only the expression of collagen III and fibulin 5 was still reduced significant in hearts of C57Bl/6 mice as well as the RAGE expression. After four weeks bread crust feeding intake of AGEs and accumulation (MDA, AGE) in heart could only

be seen in RAGE-KO mice. Possibly after four weeks an adaption to high AGE.intake takes place.

A high-fat diet with 60% energy from fat was used as food source for an endogenous AGE-formation in the **third experimental approach**. At the beginning of the experiment mice were at the age of three month. After 14 weeks diet all experimental animals displayed metabolic syndrome with adipositas, increased blood glucose and insulin levels as well as hypertriglyceridemia. In serum and heart no AGE accumulation could be seen. C57Bl/6 mice as well as RAGE-KO mice showed increasing oxidative stress in heart by raised content of carbonyl groups. In contrast an induction of numerous AGE receptors (AGE receptor 1+2, scavenger receptor 1) was seen especially in hearts of RAGE-KO mice. Furthermore RAGE-KO mice showed an induction of profibrotic genes collagen I/III.

In **experiment 4** C57Bl/6 and RAGE-KO mice at the age of 24-26 month were used. By four month wheel running intervention the effects of sport on age-related AGE accumulation in the cardiovascular system should be analysed. Thereby RAGE-KO mice showed higher activity as C57Bl/6 mice. Via wheel running AGE-specific fluorescence was reduced in serum and heart protein of both mice. In addition RAGE-KO mice showed an increased expression of antioxidative enzyme MnSOD and at the sam time an reduced content of carbonyl groups and therefore oxidative modified proteins. However C67Bl/6 mice showed only an increase in the expression of inflammation marker lipocalin 2.

6. Literaturverzeichnis

1. Singh R., Barden A., Mori T., Beilin L.: Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 44: 129-146 (2001)
2. Nguyen C.V.: Toxicity of the AGEs generated from the Maillard reaction: on the relationship of food-derived AGEs and biological-AGEs. *Mol. Nutr. Food Res.* 50:1140-1149 (2006)
3. Bengmark S.: Advanced glycation and lipoxidation end products-amplifiers of inflammation: the role of food. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 31 No.5; (2006)
4. Nass N., Bartling B., Navarrete Santos A., Scheubel RJ., Börgermann J., Silber RE., Simm A.: Advanced glycation end products, diabetes and ageing. *Z Gerontol. Geriat* 40:349-356; (2007)
5. Fu MX., Requena JR., Jenkins AJ., Lyons TJ., Baynes JW., Thorpe SR.: The Advanced glycation end product, N-(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. *J. of Biol. Chem.* 271 (17): 9982-9986 (1996)
6. Meerwaldt R., Links T., Zeebregts C., Tio R., Hillebrands L., Smit A.: The clinical relevance of assessing advanced glycation endproducts accumulation in diabetes. *Cardiovasc Diabetol.* 7: 7-29 (2008)
7. Kanner J.: Dietary advanced lipid oxidation endproducts are risk factors to human health; *Mol. Nutr. Food Res.* 51: 1094-1101 (2007)
8. Negre-Salvayre A., Coatrieux C., Ingueneau C., Salvayre R.: Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in disease and therapeutic prospects for the inhibitors. *Br. Journ. Pharmacol.* 153: 6-20 (2008)
9. Verzijl N., DeGroot J., Oldehinkel E., Bank RA., Thorpe SR., Baynes JW., Bayliss MT, Bijlsma JW, Lafeber FP, Tekopple JM: Age-related accumulation of Maillard reaction products in human cartilage collagen. *Biochem J* 350: 381-387 (2000)
10. Dyer DG, Dunn AJ, Thorpe SR, Lyons TJ, McCance DR., Baynes JW.: Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and ageing. *Ann NY Acad Sci* 633: 421-422 (1992)
11. Simm A., Wagner J., Gursinsky T., Nass N., Friedrich I., Schinzel R., Czeslik E., Silber RE., Scheubel RJ: Advanced glycation endproducts: a biomarker for age as an outcome predictor after cardiac surgery? *Exp Gerontol* 42: 668-675; 2007
12. Bierhaus A., Hofmann MA., Ziegler R., Nawroth PP.: AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovascular Research* 37: 586-600 (1998)
13. Uribarri J., Cai W., Sandu O., Peppas M., Goldberg T., Vlassara H.: Diet-derived advanced glycation endproducts are major contributors to the body's AGE pool and induce inflammation in healthy subjects. *Ann NY Acad Sci* 1043: 461-6; 2005
14. Maslo R.: Maillard-Reaktionsprodukte in Lebensmitteln: Mögliche gesundheitliche Bedeutung. *J. Verbr. Lebensm.* 1: 125-134 (2006)
15. Geissler S., Hellwig M., Zwarg M., Markwardt F., Henle T., Brandsch M.: Transport of the advanced glycation end products alanylpyrrolidine and pyrrolylalanine by the human proton-coupled peptide transporter hPEPT1. *J. Agric. Food Chem.* (im Druck)
16. Koschinsky T., He CJ., Mitsuhashi T., Bucala R., Liu C., Bunting C., Heitmann K., Vlassara H.: Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): An environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci* 94 (1997)
17. Vlassara H., Palace M.R.: Diabetes and advanced glycation endproducts. *Journal of Internal Medicine* 251: 87-101 (2002)

18. Zheng F., He C., Li J., Vlassara H.: Restriction of AGE content of food without lowering protein intake prevents diabetic nephropathy in mice. *Diabetes* 49: A161 (2000)
19. Cai W., He JC., Zhu L., Chen X., Wallenstein S., Striker G., Vlassara H.: Reduced oxidant stress and extended lifespan in mice exposed to low glycotoxin diet. *Am J Path* 170: 1893-1902 (2007)
20. Lin R.Y., Dore A., Reis E.D., Lu W., Fischer E., Vlassara H.: Lowering of diet-derived advanced glycation endproducts reduces postangioplasty restenosis in apo-E deficient mice: a novel solution? *AHA Arterial Thromb & Vasc. Biol.* 21: 645 (2001)
21. Rahbar S., Figarola JL.: Novel inhibitors of advanced glycation endproducts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 419: 63-79 (2003)
22. Vlassara H.: Recent progress in advanced glycation end products and diabetic complications. *Diabetes* 46: 519-525 (1997)
23. Vlassara H., Palace MR.: Glycooxidation: the menace of diabetes and aging. *Mt Sinai J Med* 70: 232-241 (2003)
24. Stirban A. Die Bedeutung von AGEs und ROS bei Atherosklerose.
25. Vlassara H., Brownlee M., Cerami A.: High affinity receptor mediated uptake of glucose-modified proteins: a potential mechanism for removal of senescent macromolecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5588-5592 (1985)
26. Avery N.C., Bailey A.J.: The effect of maillard reaction on the physical properties and cell interactions of collagen. *Pathologie Biologie* 54: 387-395 (2006)
27. Goh S.Y., Cooper M.E.: The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *J Clin Endocrinol. Metab* 93: 1143-1152 (2008)
28. Cheng G., Wang LL., Liu HY., Qu WS., Li S.: Beneficial effects of CD36, a novel breaker of advanced glycation endproducts cross-links, on the cardiovascular system of diabetic rats. *British Journal of Pharmacology* 152: 1196-1206 (2007)
29. Reddy V.P., Beyaz A.: Inhibitors of maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. *Drug Discovery Today* Vol. 11; Number 13/14 (2006)
30. Casselmann C., Reimann A., Friedrich I., Schubert A., Silber RE., Simm A.: Age-dependent expression of advanced glycation end product receptor genes in human heart. *Gerontology* 50: 127-34 (2004)
31. Yonekura H., Yamamoto Y., Sakurai S., Watanabe T., Yamamoto H.: Roles of the receptor for Advanced Glycation Endproducts in diabetes-induced vascular injury. *J Pharmacol Sci* 97: 305-311 (2005)
32. Bierhaus A., Humpert P.M., Morcos M., Wendt T., Chavakis T., Arnold B., Stern D.M., Nawroth P.: Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med* 83: 876-886 (2005)
33. Yonekura H., Yamamoto Y., Sakurai S., Petrova RG., Abedin MJ., Li H., Yasui K., Takeuchi M., Makita Z., Takasawa S., Okamoto H., Watanabe T., Yamamoto H.: 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: 1097-109 (2003)
34. Raucci A., Cugusi S., Antonelli A., Barabino SM., Monti L., Bierhaus A., Reiss K., Saftig P., Bianchi ME.: A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM 10). *FASEB* 22: 3716-27 (2008)
35. Bucciarelli LG, Wendt T, Qu W. et al.: RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice. *Circulation* 106: 1070-7 (2002)

36. Basta G.: Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: From basic mechanism to clinical implications. *Atherosclerosis* 196: 9-21 (2008)
37. Bierhaus A, Schiekofer S, Schwaninger M, Andrassy M, Humpert P, Chen J, Hong M, Luther T, Henle T, Klötting I, Mocros M, Hofmann M, Tritschler H, Weigle B, Kasper M, Smith MA, Perry G, Schmidt AM, Stern DM, Häring HU, Schleicher E, Nawroth PP.: Diabetes-associated sustained activation of transcription factor NF- κ B. *Diabetes* 50: 2792-2809 (2001)
38. Yan SD, Schmidt AM, Anderson G. et al.: Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptor/binding proteins. *J Biol Chem* 269: 9889-97 (1994)
39. Wautier MP, Chappey O., Corda S et al.: Activation of NADPH oxidase by AGEs links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *J Physiol Endocrinol Metab* 280: E685-04 (2001)
40. Li JH, Wang W, Huang XR, Oldfield M, Schmidt AM, Cooper ME, Lan YH.: Advanced glycation end products induce tubular epithelial-myofibroblast transition through RAGE-ERK1/2 MAP kinase signalling pathway. *Am J Pathol* 164: 1389-1397 (2004)
41. Yeh CH, Sturgis L, Haidacher J, Zhang XN, Sherwood SJ, Bjercke RJ, Juhasz O, Crow MT, Tilton RG, Denner L: Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor-kappa B transcriptional activation and cytokine secretion. *Diabetes* 50: 1495-1504
42. Huang JS, Guh JY, Chen HC, Hung WC, Lai YH, Chuang LY: Role of receptor for advanced glycation end products (RAGE) and the JAK/STAT-signaling pathway in AGE-induced collagen production in NRK-49F cells. *J Cell Biochem* 81: 102-113 (2001)
43. Bierhaus A., Chevion S, Chevion M, Hofmann M., Quehenberger P, Illmer T, Luther T., Wahl P., Tritschler H, Müller M., Ziegler R, Nawroth PP: Advanced glycation endproducts (AGEs) induced activation of NF- κ B is suppressed by α -lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes* 46: 1481-1490 (1997)
44. Asif M., Egan J., Vasani S., Jyothirmayi GN., Masarekar MR., Lopez S., Williams C., Torres RL., Wagle D., Ulrich P., Cerami A., Brines M. Regan TJ.: An advanced glycation endproduct cross-link breaker can reverse age-related increase in myocardial stiffness. *PNAS* Vol.97,no.6: 2809-2813 (1999)
45. Ulrich P., Cerami A.: Protein Glycation, Diabetes and Aging. *Recent Prog Horm Res.* 56: 1-21 (2001)
46. Smith MA., Monnier VM., Sayre LM. Perry G.: Amyloidosis, advanced glycation end products and Alzheimer disease. *Neuroreport* 6: 1595-6 (1995)
47. Dukic-Stefanovic S., Schinzel R., Riederer P., Münch G.: AGEs in brain aging: AGE-inhibitors as neuroprotective and anti-dementia drugs? *Biogerontology* 2: 19-34 (2001)
48. Yamamoto Y., Kato I., Doi T., Yonekura H., Ohashi S., Takeuchi M., Watanabe T., Yamagishi S., Sakurai S., Takasawa S., Okamoto H. Yamamoto H.: Development and prevention of advanced diabetic nephropathy in RAGE-overexpressing mice. *J Clin Invest* 108: 261-268 (2001)
49. Myint KM., Yamamoto Y., Doi T., Kato I., Harashima A., Yonekura H., Watanabe T., Shinohara H., Takeuchi M., Tsuneyama K., Hashimoto N., Asano M., Takasawa S., Okamoto H., Yamamoto H.: RAGE control of diabetic nephropathy in a mouse model: RAGE gene disruption and administration of low-molecular weight heparin. *Diabetes* 55: 2510-2522 (2006)

50. Wendt TM., Tanji M., Guo J., Kieslinger TR., Qu W., Lu Y., Bucciarelli LG., Rong LL., Moser B., Markowitz GS., Stein G., Bierhaus A., Liliensiek B., Arnold B., Nawroth PP., Stern DM., D'Agati VD., Schmidt AM.: RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *AM J Pathol.* 162: 1123-1137 (2003)
51. Takahashi M., Suzuki M., Kushida K., Miyamoto S., Inoue T.: Relationship between pentosidine levels in serum and urine and activity in rheumatoid arthritis. *Br. J. Rheumatol.* 36: 637-642 (1997)
52. Pullerits R., Bokarewa M., Dahlberg L., Tarkowski A.: Decreased levels of soluble receptor for advanced glycation endproducts in patients with rheumatic arthritis indicating deficient inflammatory control. *Arthritis Res. Ther.* 7: R817-R824 (2005)
53. DeGroot J., Verzijl N., Wenting-van Wijk MJG., Jacobs KMG., Van El B., Van Roermund PM., Bank RA., Bijlsma JWJ., TeKoppele JM., Lafeber FPJG.: Accumulation of advanced glycation end products as a molecular mechanism for aging as a risk factor in osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism* 50(4): 1207-1215 (2004)
54. Ziemann SJ., Kass DA.: Advanced glycation endproduct crosslinking in the cardiovascular system: potential therapeutic target for cardiovascular disease. *Drugs* 64: 459-470 (2004)
55. Brownlee M., Cerami A., Vlassara H.: Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N. Engl. J. Med.* 318: 1315–1321 (1988)
56. Kass D.A., Shapiro E.P., Kawaguchi M., Capriotti A.R., Scuteri A., Degroff R.C., Lakatta E.G. Improved arterial compliance by a novel advanced glycation end-product crosslink breaker. *Circulation* 104: 1464–1470 (2001)
57. Cantini C., Kieffer P, Corman B., Liminana P., Atkinson J., Lartaud-Idjoudiene J.: Aminoguanidine and aortic wall mechanics, structure, and composition in aged rats. *Hypertension* Oct.38: 943-8 (2001)
58. Hoff HF., Whitaker TE, O'Neill J.: Oxidation of LDL leads to particle aggregation and altered macrophage recognition. *J Biol Chem* 267: 602-609 (1992)
59. Sobal G., Sinzinger H., Menzel EJ.: Binding of long term glycated low density lipoprotein and AGE-albumin by peripheral monocytes and endothelial cells. *Signal Transduct Res* 19: 75-82 (1999)
60. Sakata N., Meng J., Jimi S., Takebayashi S.: Nonenzymatic glycation and extractability of collagen in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 116: 63-75 (1995)
61. Vlassara H., Fuh H., Donnelly T., Cybulsky M.: Advanced glycation endproducts promote adhesion molecule (VCAM-1, ICAM-1) expression and atheroma formation in normal rabbits. *Mol Med* 1: 447-456 (1995)
62. Somoza V.: five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products. An update. *Mol. Nutr. Food res.* 49: 663-672 (2005)
63. Solyakov, A., Skog K., Jägerstad M.: Binding of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines to MRPs under stimulated gastrointestinal conditions. In: Fogliano; V., Henle T. (Eds.) *Melanoidins in Food and Health*, EC Directorate for Research Vol 3.: 195-197 (2002)
64. Lindenmeier M., Faist V., Hofmann T.: Structural and functional characterisation of pronyl-lysine, a novel protein modification in bread crust melanoidins showing in vitro antioxidative and phase I/II enzyme modulating activity. *J. Agric. Food Chem.* 50: 6997-7006 (2002)

65. Faist V., Hofmann T., Zill H., Baynes JW.: Effects of dietary N-epsilon-Carboxymethyllysine on expression of the biotransformation enzyme, Glutathione-S-transferase, in the rat. (In) Horiuchi S., Taniguchi N., Hayase F., Kurata T., Osawa T. (Eds.): the Maillard reaction in Food Chemistry and Medical Science: Update to postgenomic era. ICS Elsevier Press, Amsterdam, NL pp. 313-320 (2002)
66. Forbes JM., Yee LT., Thallas V., Lassila M., Candido R., Jandeleit-Dahm KA., Thomas MC., Burns WC., Deemer EK., Thorpe SR., Cooper ME., Allen TJ.: Advanced glycation end product interventions reduce diabetes-accelerated atherosclerosis. *Diabetes* 53(7): 1813-23 (2004)
67. Candido R., Forbes JM., Thomas MC., Thallas V., Dean RG., Burns W., Tihellis C., Ritchie RH., Twigg SM., Cooper ME., Burrell LM.: A breaker of advanced glycation end products attenuates diabetes-induced myocardial structural changes. *Circ Res.* 92: 785-792 (2003)
68. Borrelli RC., Visconti A., Menella C., Anese M., Fogliano V.: Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. *J. Agric. Food Chem.* 50(22): 6527-33 (2002)
69. Adams A., Borrelli RC., Fogliano V., De Kimpe N.: Thermal degradation studies on food melanoidins. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4136-4142 (2005)
70. Ortola MD., Londono L., Gutierrez CL., Chiralt A.: Influence of roasting temperature on physicochemical properties of different coffees. *Food Science and Technology International* 4: 59-66 (1998)
71. Tagliazucchi D., Verzelloni E., Conte A.: Effect of dietary melanoidins on lipid peroxidation during simulated gastric digestion: their possible role in the prevention of oxidative damage. *J. Agric. Food Chem.* 58: 2513-2519 (2010)
72. Somoza V., Lindenmeier M., Wenzel E., Frank O., Erbersdobler HF., Hofmann T.: Activity-guided identification of a chemopreventive compound in coffee beverage using in vitro and in vivo techniques. *J. Agric. Food Chem.* 51: 6861-6869 (2003)
73. Somoza V., Wenzel E., Lindenmeier M., Grothe D., Erbersdobler HF., Hofmann T.: Influence of feeding malt, bread crust, and a pronylated protein on the activity of chemopreventive enzymes and antioxidativ defense parameters in vivo. *J. Agric. Food Chem.* 53: 8176-8182 (2005)
74. Ruhs S., Nass N., Somoza V., Friess U., Schinzel R., Silber RE., Simm A.: Maillard reaction products enriched food extract reduce the expression of myofibroblast phenotype markers. *Mol. Nutr. Food Res.* 51: 488-495 (2007)
75. Bartling B., Fuchs C., Somoza V., Niemann B., Silber RE., Simm A.: Ling level of HMBG1 is elevated in response to advanced glycation end product-enriched food in vivo. *Mol. Nutr. Food Res.* 51: 479-487 (2007)
76. Negrean M., Stirban AM., Stratmann B., Gawlowski T., Horstmann T., Gotting C., Kleesiek K., Mueller-Roesel M., Koschinsky T., Uribarri J., Vlassara H., Tschoepe D.: Effects of low- and high-advanced glycation endproduct meals on macro- and microvascular endothelial function and oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 85: 1236-43 (2007)
77. Goldberg T., Cai W., Peppia M.: Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *J AM Diet Assoc* 104: 1287-1291 (2007)
78. McCarty MF.: The low-AGE content of low-fat vegan diets could benefit diabetics-though concurrent taurine supplementation may be needed to minimize endogenous AGE production. *Med. Hypotheses* 64(2): 394-398 (2005)
79. Li Y., Steffes M., Donnelly T., Liu C., Fuh, H., Basgen J., Bucala R., Vlassara H.: Prevention of cardiovascular disease and renal pathology of aging by the advanced glycation inhibitor aminoguanidine; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 93: 3902-3907 (1996)

80. Chang K., Hsu K.L., Peng Y., Lee F., Tseng Y.: Aminoguanidine prevents age-related aortic stiffening in Fisher 344 rats: aortic impedance analysis; *Br J Pharmacol* (1):107-114 (2003)
81. Hambrecht R., Fiehn E., Weigl C.: Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure. *Circulation*; 98: 2709–2715 (1998)
82. Hornig B., Maier V., Drexler H.: Physical training improves endothelial function in patients with chronic heart failure; *Circulation*; 93: 210–214 (1996)
83. Brendle D., Joseph L., Coretti M., Gardner A., Katzel L.: Effects of Exercise Rehabilitation on Endothelial Reactivity in Older Patients with Peripheral arterial Disease; *American Journal of Cardiology* Vol. 87 (1) (2001)
84. Clarkson P., Montgomery H., Mullen MJ., Donald A., Powe A., Bull T., Jubb M., World M., Deanfield J.: Exercise training enhances endothelial function in young men; *J AM Coll Cardiol* 33: 1379-1385 (1999)
85. Rinder M., Spina R., Ehsani A.: Enhanced endothelium-dependent vasodilatation in older endurance-trained men; *J Appl Physiol* 88:761-766 (2000)
86. Somoza V., Wenzel E., Lindenmeier M., Grothe D., Erbersdobler HF., Hofmann T.: Influence of feeding malt, bread crust, and a pronylated protein on the activity of chemopreventive enzymes and antioxidativ defense parameters in vivo. *J. Agric. Food Chem.* 53: 8176-8182 (2005)
87. Ruhs S.: Der Einfluss von “Advanced Glycation Endproducts”-reichen Nahrungsmittlextrakten auf die Funktion kardialer Fibroblasten. Dissertation, Naturwissenschaftliche Fakultät I, Martin-Luther-Universität, Halle (2008)
88. Gerstbrein B., Stamatias G., Collies N., Discroll M.: In vivo spectrofluorimetry reveals endogenous biomarkers that report healthspan and dietary restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 4: 127-137 (2005)
89. Turturro A., Duffy P., Hass B., Kodell R., Hart R.: Survival characteristics and age-adjusted disease incidences in C57Bl/6 mice fed a commonly used cereal-based diet modulated by dietary restriction. *J of Gerontol: Biological sciences* 57A (11): B379-B389 (2002)
90. Yndestad A., Landro L., Ueland T., Dahl CP., Flo TH., Vinge LE., Espevik T., Froland SS., Husberg C., Christensen G., Dickstein K., Kjekshus J., Oie E., Gullestad L., Aukrust P.: Increased systemic and myocardial expression of neurophil gelatinase-associated lipocalin in clinical and experimental heart failure. *Eur. Heart J.* 30 (10): 1229-1236 (2009)
91. Vlassara H., Striker G.: Glycotoxins in the diet promote diabetes and diabetic complications. *Curr. Diab Rep.* 7(3): 235-241 (2007)
92. Zalba G., Fortuno A., Jose GS., Moreno MU., Beloqui O., Diez J.: Oxidative Stress, endothelial dysfunction and cerebrovascular disease. *Cerebrovasc Dis* 24: 24-29 (2007)
93. Babier BM.: NADPH oxidase: an update. *Blood* 93: 1464-1476 (1999)
94. Fearon IM., Faux SP.: Oxidative stress and cardiovascular disease: a novel tools give (free) radical insight. *J. Moll. Cell Cardiol.* 47(3): 372-81 (2009)
95. Griendling KK., Sorescu D., Ushio-Fukai M.: NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res.* 86: 494-501 (2000)
96. Guimaraes ELM., Empsen C., Geert A., van Grunsven LA.: Advanced glycation end products induce production of reactive oxygen species via the activation of NADPH oxidase in murine hepatic stellate cells. *Journal of Hepatology in Press* (2010)
97. San Martin A., Foncea R., Laurindo FR., Ebensprenger R., griendling KK., Leighton F.: Nox1-based NADPH oxidase-derived superoxide is required for VSMC activation by advanced glycation endproducts. *Free Radic Biol Med* 42(11): 1671-9 (2007)

98. Wautier MP., Chappey O., Corda St., Stern DM., Schmidt AM., Wautier JL.: Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280: E685-E694 (2001)
99. Wei YH., Wu SB., Ma YS., Lee HC.: Respiratory function decline and DNA mutation in mitochondria, oxidative stress and altered gene expression during aging. *Chang Gung Med J* Vol. 32 (2): 113-132 (2009)
100. Higashi Y., Noma K., Yoshizumi M., Kihara Y.: Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular disease. *Circ J* 73: 411-418 (2009)
101. Beyer W., Inlay J., Fridovich I.: Superoxide dismutases. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 40: 221-253 (1991)
102. Soro-Paavonen A., Watson AMD., Li J., Paavonen K., Koitka A., Calkin AC., Barit D., Coughlan MT., Drew BG., Lancaster GI., Thomas M., Forbes JM., Nawroth PP., Bierhaus A., Cooper ME., Jandeleit-Dahm KA.: Receptor for advanced glycation end products (RAGE) deficiency attenuates the development of atherosclerosis in diabetes. *Diabetes* 57: 2461-2469 (2008)
103. Schmitt A., Schmitt J., Münch G., Milencovic JG.: Characterization of advanced glycation end products for biochemical studies: side chain modifications and fluorescence characteristics. *Anal. Biochem.* 338: 201-215 (2005)
104. Valencia J.V., Weldon S.C., Quinn D., Kiers G.H., DeGroot J., TeKoppele J.M., Hughes T.E.: Advanced glycation end products ligands for the receptor for advanced glycation end products: biochemical characterization and formation kinetics; *Anal. Biochem.* 324: 68-78 (2004)
105. Tikellis C., Thomas MC., Harcourt BE., Coughlan MT., Pete J., Bailkowski K., Tan A., Bierhaus A., Cooper ME., Forbes JM.: Cardiac inflammation associated with a western diet mediated via activation of RAGE by AGEs. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295: 323-330 (2008)
106. Zhou G., Li C., Cai Lu.: Advanced glycation end-products induce connective tissue growth factor-mediated renal fibrosis predominantly through transforming growth factor β -independent pathway. *Am J Pathol.* 165 (6): 2033-2043 (2004)
107. Park IS., Kiyomoto H, Abboud SL, Abboud HE.: Expression of transforming growth factor-beta and type IV collagen in early streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes* 46 (3): 473-480 (1997)
108. Aragno M., Mastrocola R., Alloatti G., Vercellinatto I., Bardini P., Geuna S., Catalano MG., Danni O., Boccuzzi G.: Oxidative stress triggers cardiac fibrosis in the heart of diabetic rats. *Endocrinology* 149 (1): 380-388 (2008)
109. Li S.Y., Du M., Dolence E.K., Fang C.X., Mayer G.E., Ceylan-Isik A.F., LaCour K.H., Yang X., Wilbert C.J., Sreejayan N., Ren J.: Aging induces cardiac diastolic dysfunction, oxidative stress, accumulation of advanced glycation endproducts and protein modification; *Aging Cell* 4: 57-64 (2005)
110. Pamplona R., Portero-Otln M., Bellmunt M.J., Gredilla R., Barja G.: Aging increases N epsilon (Carboxymethyl)lysine and caloric restriction decreases N epsilon-(Carboxyethyl)lysine and N epsilon-(Malondialdehyde)lysine in rat heart mitochondrial proteins; *Free Radical Research* 36: 47-54 (2002)
111. Schleicher E.D., Wagner E., Nerlich A.G.: Increased accumulation of the glycoxidation product N (epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging; *J Clin. Invest.* 99: 457-468 (1997)
112. Edwards M.G., Sarkar D., Klopp R., Morrow J.D., Weindruch R., Prolla T.A.: Age-related impairment of the transcriptional responses to oxidative stress in the mouse heart; *Physiol. Genomics* 13: 119-127 (2003)

113. Saito H., Papaconstantinou J.: Age associated differences in cardiovascular inflammatory gene induction during endotoxic stress; *J Biol Chem* 276: 29307-29312 (2001)
114. Nakao K., Minobe W., Roden R., Bristow M.R., Leinwand L.A.: Myosin heavy chain gene expression in human heart failure; *J. Clin. Invest.* 9: 2362-2370 (1997)
115. Mercadier J.J., Lompre A.M., Wisnewsky C., Samuel J.L., Bercovici J., Swynghedauw B., Schwartz K.: Myosin isoenzymic changes in several models of rat cardiac hypertrophy; *Circ. Res.* 49: 525-532 (1981)
116. Izumo S., Lompre A.M., Matsuoka R., Koren G., Schwartz K., Nadal-Ginard B., Mahdavi V.: Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoform transition during cardiac hypertrophy; *J. Clin. Invest.* 79: 970-977 (1987)
117. Ruhs S.: Der Einfluss von "Advanced Glycation Endproducts"-reichen Nahrungsmittel-extrakten auf die Funktion kardialer Fibroblasten. Dissertation, Naturwissenschaftliche Fakultät I, Martin-Luther-Universität, Halle (2008)
118. Somoza V., Wenzel E., Lindenmeier M., Grothe D., Erbersdobler HF., Hofmann T.: Influence of feeding malt, bread crust, and a pronylated protein on the activity of chemopreventive enzymes and antioxidativ defense parameters in vivo. *J. Agric. Food Chem.* 53: 8176-8182 (2005)
119. Bartling B., Fuchs C., Somoza V., Niemann B., Silber RE., Simm A.: Ling level of HMBG1 is elevated in response to advanced glycation end product-enriched food in vivo. *Mol. Nutr. Food Res.* 51: 479-487 (2007)
120. Bergmann R., Helling R., Heichert C., Scheunemann M., Mäding P., Wittrisch H., Johannsen B., Henle T.: Radio fluorination and psitron emission tomography (PET) as a new approach to study the in vivo distribution and elimination of the advanced glycation endproducts N-carboxymethyllysine (CML) and N-carboxyethyllysine (CEL). *Nahrung/Food* 45 (3): 182-188 (2001)
121. Lee KJ., Choi JH., Jeong HG.: Hepatoprotective and antioxidative effects of the coffee diterpenes kahweol and cafestol on carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *Food Chem Toxicol.* 45 (11): 2118-2125 (2007)
122. Gomez-Ruiz JA., Leake DS., Ames JM.: In vitro antioxidative activity of coffee compound and their metabolits. *J. Agric. Food Chem.* 55: 6962-6969 (2007)
123. Devasagayam TP., Kamat JP., Mohan JP., Mohan H., Kesavan PC.: Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta.* 1282 (1): 63-70 (1996)
124. Yanagimoto K., Lee KG., Ochi H., Shibamoto T.: Antioxidative activity of heterocyclic compounds found in coffee volatiles produced by maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.* 50: 5480-5484 (2002)
125. Homma S., Murata M.: Characterisation of metal-chelating compounds in instant coffee. In *Sixieme Colloque Scientifique Internationale sur le Café*. Association Scientifique Internationale du Café: Kyoto Japan pp 183-191 (1995)
126. Somoza V. Lindenmeier M., Wenzel E., Frank O., Erbersdobler HF., Hofmann T.: Activity-guided identification of a chemopreventive compound in coffee beverage using in vitro and in vivo techniques. *J. Agric. Food Chem.* 51: 6861-6869 (2003)
127. Speer K., Kööling-Speer I.: The lipid fraction of the coffee bean. *Braz. J. Plant. Physiol.* 18 (1): 201-206 (2006)
128. Schaub MC., Hefti MA., Harder BA., Eppenberger HM.: Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes. *J Mol Med.* 75(11-12): 901-20 (1997)

129. Jeong MY., Kinugawa K., Vinson C., Long CS.: AFos dissociated cardiac myocyte hypertrophy and expression of the pathological gene programm. *Circulation* 111(13): 1645-1651 (2005)
130. Wankel M., Dumas AR., Schwartz K.: Proteins of the contractile and relaxing systems in the nonfailing and failing heart. *BAM* 5(4): 317-330 (1995)
131. Maisch B., Rupp H.: Myokardfibrose: ein kardiopathophysiologischer Januskopf. *Herz* 30 (3), Urban & Vogel (2005)
132. Chaponnier C., Gabbiani G.: Pathological situations charavterized by altered actin isoform expression. *J Pathol* 204: 386-395 (2004)
133. Doi T., Vlassara H., Kirstein M., Yamada Y., Striker E., Striker LJ.: Receptor-specific increase in extracellular matrix production in mouse mesangial cells by advanced glycation end products is mediated via platelet-derived growth factor. *Proc. Natl.Acad. sci. USA* 98(7): 2873-7 (1992)
134. Yang CW., Vlassara H., Peten EP., He CJ., Striker E., Striker LJ.: Advanced glycation end products up-regulate gene expression found in diabetic glomerular disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 9436-9440 (1994)
135. Cheng G., Wang LL., Long L., Liu HY., Cui H., Qu WS., Li S.: Benefical effects of C36, a novel breaker of advanced glycation endproduct cross-links, on the cardiovascular system of diabetic rats. *British Journal of Pharmacology* 152: 1196-1206 (2007)
136. Ruhs S., Nass N., Somoza V., Friess U., Schinzel R., Silber RE., Simm A.: Maillard reaction products enriched food extract reduce the expression of myofibroblast phenotype markers. *Mol. Nutr. Food Res.* 51: 488-495 (2007)
137. Somoza V., Lindenmeier M., Hofmann T., Frank O., Erbersdobler HF., Baynes JW., Thorpe SR., Heidland A., Zill H., Bek S., Huber J., Weigle T., Scheidler S., Busch AE., Sebekova K.: Dietary bread crust advanved glycation end products bind to the receptor of AGEs in HEK-293 kidney cells but are rapidly excreted after oral administration to healthy and subtotaly nephrectomized rats. *Ann N.Y. Acad. Sci.*1043: 491-500 (2005)
138. Lindenmeier M. Vaist V., Hofmann T.: Structural and functional characterization of pronyl-lysine, a novel protein modification in bread crust melanoidins showing in vitro antioxidative and phase I/II enzyme modulating activity. *J. Agric. Food Chem.* 50(24): 6997-7006 (2002)
139. Taylor SI.: Deconstructing type 2 Diabetes. *Cells* 97: 9-12 (1999)
140. Hofmann SM., Dong HJ., Li Z., Cai W., Altomonte J., Thung SN., Zeng F., Fisher EA., Vlassara H.: Improved insulin sensitivity is associated with restricted intake of dietary glycooxidation products in the db/db mouse. *Diabetes* 51(7): 2082-9 (2002)
141. Lim M., Park L., Shin G., Hong H., Kang I., Park Y.: Induction of apoptosis of beta cells of the pancreas by advanced glycation end-products, important mediators of chronic complications of diabetes mellitus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1150: 311-315 (2008)
142. Zimmet P., Alberti KGMM., Shaw J.: Global and social Implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414: 782-878 (2001)
143. Wild S., Roglic G., Green A., Sicree R., King H.: Global prevalence of diabetes: estimates for the year 200 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27: 1047-1053 (2004)
144. Mann N.: Dietary lean red meat and human evolution. *Eur. J. Nutr.* 39: 71-79 (2000)

145. Li SY., Liu Y., Sigmon VK., McCort A., Ren J.: High-fat diet enhances visceral advanced glycation end products, nuclear O-Glc-Nac modification, p38 mitogen-activated protein kinase activation and apoptosis. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 7: 448-454 (2005)
146. Hofmann SM., Dong HJ., Li Z., Cai W., Altomonte J., Thung SN., Zeng F., Fisher EA., Vlassara H.: Improved insulin sensitivity is associated with restricted intake of dietary glycoxidation products in the db/db mouse. *Diabetes* 51(7): 2082-9 (2002)
147. Gallou-Kabani C., Vige A., Gross MS., Rabes JP., Boileau C., Larue-Achagiotis C., Tome D., Jais JP., Junien C.: C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. *Obesity* 15(8): 1996-2005 (2007)
148. Sandu O., Song K., Cai W., Zheng F., Uribarri J., Vlassara H.: Insulin resistance and type 2 diabetes in high-fat-fed mice are linked to high glycotoxin intake
149. Andrikopoulos S., Massa CM., Aston-Mourney., Funkat A., Fam BC., Hull RL., Kahn SE., Prietto J.: Differential effect of inbred mouse strain (C57BL/6, DBA/2, 129T2) on insulin secretory function in response to a high fat diet. *J. of Endocrin.* 187: 45-53 (2005)
150. Milagro FI., Camion J., Martinez A.: Weight gain induced high-fat feeding involves increased liver oxidative stress. *Obesity* 14(7): 1118-1123 (2006)
151. Tsuchiya K., Sakai H., Suzuki N., Iwashima F., Yoshimoto T., Shichiri M., Hirata Y.: Chronic blockade of nitric oxide synthesis reduces adiposity and improves insulin resistance in high fat-induced obese mice. *Endocrinology* 148(10): 4548-4556 (2007)
152. Costford SR., Chaudhry SN., Crawford SA., Salkhordeh M., Harper ME.: Long-term high-fat feeding induces greater fat storage in mice lacking UCP3. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295: E1018-E1024 (2008)
153. Song S., Andrikopoulos S., Filippis C., Thorburn AW., Khan D., Proietto J.: Mechanism of fat-induced hepatic gluconeogenesis: effect of metformin. *Am. J. Physiol. Endocrin. Metab.* 281: E275-E282 (2001)
154. Raheer M., Thibault HB., Buys ES., Kuruppu D., Shimizu N., Brownell AL., Blake SL., Rieusset J., Kaneki M., Derumeaux G., Picard MH., Bloch KD., Scherrer-Crosbie M.: A short duration of high-fat diet induces insulin resistance and predisposes to adverse left ventricular remodelling after pressure overload. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295 (6): H2495-H2505 (2008)
155. Vitale C., Marazzi G., Volterrani M., Aloisio A., Rosano G., Fini M.: Metabolic syndrome. *Minerva Med.* 97(3): 219-229 (2006)
156. Levesque J., Lamarche B.: The metabolic syndrome: definitions, prevalence and management. *J. Nutrigenet Nutrigenomics* 1(3): 100-108 (2008)
157. Ascaso J., Gonzales Santos P., Hernandez Mijares A., Mangas Rojas A., Masana L., Millan J., Pallardo LF., Pedro-Botet J., Perez Jimenez F., Pinto X., Plaza I., Rubies J., Zuniga M.: Management of dyslipidemia in the metabolic syndrome: recommendations of the Spanish HDL-forum. *Am. J. Cardiovasc. Drugs* 7(1): 39-58 (2007)
158. Esposito K., Ciotola M., Giugliano D.: Mediterranean diet and the metabolic syndrome. *Mol. Nutr. Food Res.* 51: 1268-1274 (2007)
159. Physiological Data Summary-C57BL/6J (000664); The Jackson Laboratory
160. He CJ., Zheng F., Stitt A., Striker L., Hattori M., Vlassara H.: Differential expression of renal AGE-receptor genes in NOD mice: possible role in nonobese diabetic renal disease. *Kidney International* 58: 1931-1940 (2000)

161. Iwashima Y., Eto M., Hata A., Kaku K., Horiuchi S., Ushikubi F., Sano H.: Advanced glycation end products-induced gene expression of scavenger receptors in cultured human monocyte-derived macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277: 368-380 (2000)
162. Vlassara H., Li YM., Imani F., Wojciechowicz D., Yang Z., Liu FT., Cerami A.: Identification of galectin-3 as a high-affinity binding protein for advanced glycation end products (AGE): a new member of the AGE-receptor complex. *Molecular Medizin* 1(6): 634-646 (1995)
163. Li YM., Mitsuhashi T., Wojciechowicz D., Shimizu N., Li J., Stitt A., He C., Banerjee D., Vlassara H.: Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation endproduct receptors: relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80-H membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11047-11052 (1996)
164. Miyazaki A., Nakayama H., Horiuchi S.: Scavenger receptors that recognize advanced glycation end products. *TCM* 12(6): 258-262 (2002)
165. Lu C., He JC., Cai W., Liu H., Zhu L., Vlassara H.: Advanced glycation endproducts (AGE) receptor 1 is a negative regulator of the inflammatory response to AGE in mesangial cells. *PNAS* 101(32): 11767-11772 (2004)
166. Cai W., He JC., Lu C., Vlassara H.: Advanced glycation end product (AGE) receptor 1 suppresses cell oxidant stress and activation signalling via EGF receptor. *PNAS* 103 (37): 13801-13806 (2006)
167. Torreggiani M., Liu H., Wu J., Zheng F., Cai W., Striker G., Vlassara H.: Advanced glycation end product receptor-1 transgenic mice are resistant to inflammation, oxidative stress, and post-injury intimal hyperplasia. *AJP* 175(4): 1722-1732 (2009)
168. Vincent HK., Powers SK., Stewart DJ., Shanley RA., Demirel H., Naito H.: Obesity is associated with increased myocardial oxidative stress. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 23(1): 67-74 (1999)
169. Vincent HK., Powers SK., Dirks AJ., Scarpace PJ.: Mechanism for obesity-induced increase in myocardial lipid peroxidation. *Int J. Obes.* 25: 378-388 (2001)
170. Ballal K., Wilson CR., Salazar RL., Taegtmeyer H.: Western diet induces apoptosis in the heart of a rat model with diet-induced obesity. *FASEB* 22: 1091.4. (2008)
171. Zafir A., Banu N.: Modulation of in vivo oxidative status by exogenous corticosterone and restraint stress in rats. *Stress* 12(2): 167-77 (2009)
172. Vijayakumar RS., Surya D., Nalini N.: Antioxidant efficacy of black pepper (piper nigrum l.) and piperine in rats with high fat diet induced oxidative stress. *Redox Rep.* 9(2): 105-10 (2004)
173. Roudkenar MH., Kuwahara Y., Baba T., Roushandeh AM., Ebishima S., Abe S., Ohkubo Y., Fukumoto M.: Oxidative Stress induced Lipocalin 2 gene expression: addressing its expression under the harmful conditions. *J. Radiat. Res* 48: 39-44 (2007)
174. Yndestad A., Landro L., Ueland T., Dahl CP., Flo TH., Vinge LE., Espevik T., Froland SS., Husberg C., Christensen G., Dickstein K., Kjekshus J., Oie E., Gullestad L., Aukrust P.: Increased systemic and myocardial expression of neurophil gelatinase-associated lipocalin in clinical and experimental heart failure. *Eur. Heart J.* 30 (10): 1229-1236 (2009)
175. Aubin MC., Lajoie C., Clement R., Gosselin H., Calderone A., Perrault LP.: Female rats fed a high-fat diet were associated with vascular dysfunction and cardiac fibrosis in the absence of overt obesity and hyperlipidemia: therapeutic potential of resveratrol. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 325(3): 961-968 (2008)

176. Zibadi S., Vazquez R., Moore D., Larson DF., Watson RR.: Myocardial lysyl oxidase regulation of cardiac remodelling in a murine model of diet-induced metabolic syndrome. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297: H976-H982 (2009)
177. Nakagawa O, Ogawa Y, Itoh H, Suga S, Komatsu Y, Kishimoto I, Nishino K, Yoshimasa T, Nakao K. Rapid transcriptional activation and early mRNA turnover of brain natriuretic peptide in cardiocyte hypertrophy. *J Clin Invest.* 96:1280-1287 (1995)
178. Li Y., Steffes M., Donnelly T., Liu C., Fuh, H., Basgen J., Bucala R., Vlassara
Prevention of cardiovascular disease and renal pathology of aging by the advanced glycation inhibitor aminoguanidine; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 93: 3902-3907 (1996)
179. Ascensao A., Ferreira R., Magalhaes J.: Exercise-induced cardioprotection-biochemical, morphological and functional evidence in whole tissue and isolated mitochondria. *Int. J. Cardiol.* 117(1): 16-30 (2007)
180. Meissner M., Havinga R., Boverhof R., Kema I., Groen AK., Kuipers F.: Exercise enhanced whole-body cholesterol turnover in mice. *Med. Sci. Sports Exerc.* In Press (2010)
181. Werner C., Fürster T., Widmann T., Pöss J., Roggia C., Hanhoun M., Scharhag J., Büchner N., Meyer T., Kindermann W., Haendeler J., Böhm M., Laufs U.: Physical exercise prevents senescence in circulating leukocytes and in the vessel wall. *Circulation* 120: 2438-2447 (2009)
182. Netea MG., Kullberg BJ., Vonk AG., Verschueren I., Joosten LAB., Van der MeerJWM.: Increased voluntary wheel-running in mice deficient for tumor necrosis factor- α and lymphotoxin- α . *Eur. J. Clin. Invest.* 37: 737-741 (2007)
183. De Waard MC., van Haperen R., Soullie T., Tempel D., de Crom R., Duncker DJ.: Beneficial effects of exercise training after myocardial infarction require full eNOS expression. *J. Moll. Cell Cardiol.* In Press (2010)
184. Valentinuzzi V.S., Scarbrough K., Takahashi J.S., Turek F.W.: Effects of aging on circadian rhythm of wheel-running activity in C57Bl6 mice; *Am. J. Physiol.* 273: 1957-1964 (1997)
185. Durrant J.R., Seals D.R., Connell M.L., Russel M.J., Lawson B.R., Folian B.J., Donato A.J., Lesniewski L.A.: Voluntary wheel running restores endothelial function in conduit arteries of old mice: direct evidence for reduced oxidative stress, increased superoxide dismutase activity and down-regulation of NADPH oxidase; *J Physiol* 587.13: 3271-3285 (2009)
186. Sakatani S., Yamada K., Homma C., Munesue S., Yamamoto Y., Yamamoto H., Hirase H.: Deletion of RAGE causes hyperactivity and increased sensitivity to auditory stimuli in mice. *PLoS ONE* 4(12): e8309 (2009)
187. Boor P., Celec P., Behuliak M., Grancic P., Kebis A., Kukan M., Pronayova N., Liptaj T., Ostendorf T., Sebekova K.: Regular moderate exercise reduces advanced glycation and ameliorates early diabetic nephropathy in obese Zucker rats; *Metabolism* (2009)
188. Radak Z., Chung HY., Goto S.: Systemic adaption to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic. Biol. Med.* 44(2): 153-159 (2008)
189. Lawler JM., Kwak HB., Kim JH., Suk MH.: Exercise training inducibility of MnSOD protein expression and activity is retained while reducing prooxidant signalling in the heart of senescent rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* 296: R1496-R1502 (2009)
190. Ristow M., Zarse K.: How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: the concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). *Exp. Gerontol.* 45: 410-418 (2010)
191. Lovlin R., Cottle W., Pyke I., Kavanagh M., Belcastro A.N.: Are indices of free radical damage related to exercise intensity; *Eur. J. Appl. Physiol. Occup*

- 56: 313-316 (1987)
192. Lindsey J.B., Cipollone F., Abdullah S.M., McGuire D.K.: Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) and soluble RAGE (sRAGE): cardiovascular implications; *Diabetes and Vascular Disease Research* Vol.6 (2009)
193. Maughan R.J., Donnally A.E., Gleeson M., Whiting P.H., Walker K.A., Clough P.J.: Delayed-onset muscle damage and lipid peroxidation in man after a downhill run; *Muscle Nerve* 12: 332-336 (1989)
194. Dickhuth HH., Lehmann M., Auch-Schwelk W., Meinertz T., Keul J.: Physical training, vegetative regulation and cardiac hypertrophy. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 10(6): 71-78 (1987)
195. Thomas D.P., Zimmerman S.D., Hansen T.R., Martin D.T., McCormick R.J.: Collagen gene expression in rat left ventricle: interactive effect of age and exercise training; *J Appl. Physiol.* 89: 1462-1468 (2000)
196. Machida S., Tsujimoto H., Suzuki H., Kasuga N., Kobayashi K., Narusawa M.: Age-related differences in the effect of running training on the cardiac myosin isoenzyme composition in rats; *J. of Geron.* 57A: B339-B343 (2002)

7. Anhang

Tabelle A1.: AGE-spezifische Fluoreszenz in Serum und Herz der Mäuse nach 14-tägiger Kaffeeütterung

<i>AGE-spezifische Fluoreszenz</i>	Kontrolle	Kaffee	p-Wert
Serum			
330nm/405nm	1,00 ± 0,2	1,08 ± 0,3	0,28
360nm/440nm	1,00 ± 0,2	1,19 ± 0,2	0,022
Herz			
330nm/405nm	1,00 ± 0,2	0,96 ± 0,2	0,54
360nm/440nm	1,00 ± 0,3	0,99 ± 0,2	0,96

MW ± SD; * signifikanter Unterschied zur Kontrolle (p<0,05); n=20 je Gruppe

Tabelle A2.: kardiale mRNA- und Proteinexpression oxidativer Marker nach 14-tägiger Kaffeeütterung

	Kontrolle	Kaffee	p-Wert
mRNA-Expression			
MnSOD	1,00 ± 0,15	0,96 ± 0,10	0,35
Cu/ZnSOD	1,00 ± 0,15	0,95 ± 0,09	0,16
ecSOD	1,00 ± 0,26	0,87 ± 0,27	0,13
Cp	1,00 ± 0,15	0,92 ± 0,24	0,21
gp91phox	1,00 ± 0,21	0,98 ± 0,33	0,89
Proteinexpression			
MnSOD	1,00 ± 0,40	1,20 ± 0,31	0,24
Cu/ZnSOD	1,00 ± 0,30	0,92 ± 0,32	0,48
Oxiblot	1,00 ± 0,40	0,83 ± 0,36	0,31

MW ± SD; * signifikanter Unterschied zur Kontrolle (p<0,05); n=20 je Gruppe

Tabelle A3.: mittels Dotblot und Western Blot bestimmte Proteinexpressionen der untersuchten AGE-Modifikationen in Serum und Herz der Mäuse nach Kaffee fütterung

	Kontrolle	Kaffee	p-Wert
Proteinexpression			
AGE-Modifikationen			
<i>Dotblot Serum</i>			
CML	1,00 ± 0,30	1,01 ± 0,27	0,91
MDA	1,00 ± 0,22	0,97 ± 0,20	0,66
AGE (S006593)	1,00 ± 0,17	1,09 ± 0,21	0,12
3-DG-Imidazolone	1,00 ± 0,44	0,94 ± 0,33	0,62
Arg-Pyrimidin	1,00 ± 0,32	1,23 ± 0,53	0,12
<i>Western Blot Herz</i>			
CML	1,00 ± 0,20	0,86 ± 0,21	0,28
MDA	1,00 ± 0,19	1,25 ± 0,28	0,03 *
AGE (S006593)	1,00 ± 0,24	0,80 ± 0,12	0,03 *
3-DG-Imidazolone	1,00 ± 0,17	0,77 ± 0,20	0,024 *
HNE	1,00 ± 0,14	1,39 ± 0,38	0,015 *

MW ± SD; * signifikanter Unterschied zur Kontrolle (p<0,05); WT als Kontrolle 1,0 gesetzt; n=20 je Gruppe

Tabelle A4.: mRNA-Expression der mittels PCR untersuchten Gene in den Herzen der Mäuse nach 14-tägiger Kaffee fütterung

	Kontrolle	Kaffee	p-Wert
mRNA Expression			
AGE Rezeptoren			
AGER1	1,00 ± 0,2	0,99 ± 0,2	0,93
AGER2	1,00 ± 0,3	1,17 ± 0,3	0,054
AGER3	1,00 ± 0,3	0,84 ± 0,2	0,06
Srb1	1,00 ± 0,2	1,05 ± 0,2	0,56
Hypertrophie			
α-MHC	1,00 ± 0,2	0,91 ± 0,2	0,09
β-MHC	1,00 ± 0,3	0,94 ± 0,2	0,37
ANF	1,00 ± 0,2	0,88 ± 0,1	0,04 *
α-Aktin	1,00 ± 0,3	0,85 ± 0,2	0,08
Tropomyosin1	1,00 ± 0,2	0,92 ± 0,2	0,15
Fibrose			
Collagen 1a1	1,00 ± 0,4	1,25 ± 0,5	0,16
Collagen 3a1	1,00 ± 0,3	0,99 ± 0,4	0,91
Fibulin5	1,00 ± 0,3	0,98 ± 0,2	0,73
TGF-β1	1,00 ± 0,4	1,07 ± 0,4	0,60
TGF-β3	1,00 ± 0,2	0,96 ± 0,3	0,62
Inflammation			
Lipocalin2	1,00 ± 0,3	0,97 ± 0,3	0,75

MW ± SD; * signifikanter Unterschied zur Kontrolle (p<0,05); n=20 je Gruppe

Tabelle A5.: AGE-spezifische Fluoreszenz in Serum und Herz der Mäuse nach dreitägiger Brotkrustenfütterung

<i>AGE-spezifische Fluoreszenz</i>	Kontrolle	Brot	p-Wert
Serum			
330nm/405nm	1,00 ± 0,3	1,25 ± 0,2	4,3*10 ⁻⁵
360nm/440nm	1,00 ± 0,3	1,34 ± 0,2	3,1*10 ⁻⁷
Herz			
330nm/405nm	1,00 ± 0,2	0,96 ± 0,1	0,23
360nm/440nm	1,00 ± 0,2	1,00 ± 0,2	0,99

MW ± SD; * signifikanter Unterschied zur Kontrolle (p<0,05); n=20 je Gruppe

Tabelle A6.: kardiale mRNA- und Proteinexpression oxidativer Marker nach dreitägiger Brotkrustenfütterung

	Kontrolle	Brot	p-Wert
mRNA-Expression			
MnSOD	1,00 ± 0,3	1,16 ± 0,2	0,02 *
Cu/ZnSOD	1,00 ± 0,2	0,85 ± 0,1	0,006 *
ecSOD	1,00 ± 0,3	0,84 ± 0,2	0,02 *
Cp	1,00 ± 0,3	0,88 ± 0,2	0,11
gp91phox	1,00 ± 0,3	0,86 ± 0,1	0,02 *
Proteinexpression			
MnSOD	1,00 ± 0,3	1,20 ± 0,3	0,03 *
Cu/ZnSOD	1,00 ± 0,2	0,81 ± 0,2	0,01 *
Oxiblot	1,00 ± 0,3	0,93 ± 0,2	0,003 *

MW ± SD; WT als Kontrolle 1,0 gesetzt; * signifikanter Unterschied zur WT-Gruppe (p<0,05); n=20 je Gruppe

Tabelle A7.: mittels Dotblot und Western Blot bestimmte Proteinexpressionen der untersuchten AGE-Modifikationen im Serum und Herz der Mäuse nach dreitägiger Brotkrustenfütterung

	Kontrolle	Brot	p-Wert
Proteinexpression			
AGE-Modifikationen			
<i>Dotblot Serum</i>			
CML	1,00 ± 0,2	0,96 ± 0,2	0,44
AGE (S006593)	1,00 ± 0,2	1,10 ± 0,3	0,11
3-DG-Imidazolone	1,00 ± 0,3	1,12 ± 0,2	0,048 *
Pentosidin	1,00 ± 0,2	1,18 ± 0,3	0,046 *
Arg-Pyrimidin	1,00 ± 0,2	1,09 ± 0,3	0,45
<i>Western Blot Herz</i>			
CML	1,00 ± 0,4	0,80 ± 0,3	0,17
MDA	1,00 ± 0,3	1,03 ± 0,3	0,77
AGE (S006593)	1,00 ± 0,3	0,98 ± 0,3	0,85
3-DG-Imidazolone	1,00 ± 0,5	1,44 ± 0,5	0,03 *
Arg-Pyrimidin	1,00 ± 0,3	1,12 ± 0,3	0,75

MW ± SD; * signifikanter Unterschied zur Kontrolle (p<0,05); n=20 je Gruppe

Tabelle A8.: kardiale mRNA-Expression der untersuchten Gene nach dreitägiger Brotkrustenfütterung

	Kontrolle	Brot	p-Wert
mRNA Expression			
AGE Rezeptoren			
AGER1	1,00 ± 0,3	0,86 ± 0,2	0,11
AGER2	1,00 ± 0,3	0,82 ± 0,3	0,034 *
AGER3	1,00 ± 0,6	0,79 ± 0,4	0,15
Srb1	1,00 ± 0,3	0,88 ± 0,2	0,08
Hypertrophie			
α-MHC	1,00 ± 0,2	0,86 ± 0,2	0,02 *
β-MHC	1,00 ± 0,3	0,97 ± 0,3	0,75
ANF	1,00 ± 0,3	0,78 ± 0,2	0,003 *
α-Aktin	1,00 ± 0,7	0,77 ± 0,4	0,14
Tropomyosin1	1,00 ± 0,3	0,84 ± 0,2	0,054
Fibrose			
Collagen 1a1	1,00 ± 0,4	0,74 ± 0,3	0,015 *
Collagen 3a1	1,00 ± 0,4	0,72 ± 0,2	0,014 *
Fibulin5	1,00 ± 0,3	0,86 ± 0,2	0,08
TGF-β1	1,00 ± 0,4	0,87 ± 0,3	0,25
TGF-β3	1,00 ± 0,2	0,87 ± 0,1	0,02 *
Inflammation			
Lipocalin2	1,00 ± 0,3	1,19 ± 0,3	0,06

MW ± SD; * signifikanter Unterschied zur Kontrolle (p<0,05); n=20 je Gruppe

Tabelle A9.: AGE-spezifische Fluoreszenz in Serum und Herz der Mäuse nach 4 Wochen Brotkrustenfütterung

<i>AGE-spezifische Fluoreszenz</i>	Kontrolle	Brot	p-Wert
Serum			
330nm/405nm	1,00 ± 0,3	1,26 ± 0,4	0,024 *
360nm/440nm	1,00 ± 0,3	1,31 ± 0,4	0,012 *
Herz			
330nm/405nm	1,00 ± 0,2	0,92 ± 0,1	0,14
360nm/440nm	1,00 ± 0,1	1,03 ± 0,1	0,19

MW ± SD; * signifikanter Unterschied zur Kontrolle (p<0,05); n=20 je Gruppe

Tabelle A10.: kardiale mRNA- und Proteinexpression oxidativer Marker nach 4 Wochen Brotkrustenfütterung

	Kontrolle	Brot	p-Wert
mRNA-Expression			
MnSOD	1,00 ± 0,2	1,21 ± 0,3	0,03 *
Cu/ZnSOD	1,00 ± 0,2	1,04 ± 0,3	0,57
ecSOD	1,00 ± 0,2	0,95 ± 0,2	0,43
Cp	1,00 ± 0,2	1,04 ± 0,2	0,54
gp91phox	1,00 ± 0,2	0,99 ± 0,2	0,91
Proteinexpression			
MnSOD	1,00 ± 0,4	0,93 ± 0,4	0,53
Cu/ZnSOD	1,00 ± 0,4	1,10 ± 0,3	0,46
Oxiblot	1,00 ± 0,3	1,15 ± 0,4	0,35

MW ± SD; * signifikanter Unterschied zur Kontrolle (p<0,05); n=20 je Gruppe

Tabelle A11.: mittels Dotblot und Western Blot bestimmte Proteinexpressionen der untersuchten AGE-Modifikationen in Serum und Herz der Mäuse nach 4 Wochen Brotkrustenfütterung

	Kontrolle	Brot	p-Wert
Proteinexpression			
AGE-Modifikationen			
<i>Dotblot Serum</i>			
CML	1,00 ± 0,1	1,13 ± 0,2	0,04 *
AGE (S006593)	1,00 ± 0,2	0,96 ± 0,2	0,54
3-DG-Imidazolone	1,00 ± 0,3	1,05 ± 0,4	0,65
MDA	1,00 ± 0,1	1,10 ± 0,2	0,04 *
Arg-Pyrimidin	1,00 ± 0,2	0,78 ± 0,2	0,003 *
<i>Western Blot Herz</i>			
CML	1,00 ± 0,4	1,30 ± 0,3	0,83
MDA	1,00 ± 0,3	1,08 ± 0,3	0,45
AGE (S006593)	1,00 ± 0,1	1,15 ± 0,4	0,27
Arg-Pyrimidin	1,00 ± 0,3	1,30 ± 0,3	0,02 *

MW ± SD; * signifikanter Unterschied zur Kontrolle (p<0,05); n=20 je Gruppe

Tabelle A12.: kardiale mRNA-Expression der untersuchten Gene nach 4 Wochen Brotkrustenfütterung

	Kontrolle	Brot	p-Wert
mRNA Expression			
AGE Rezeptoren			
AGER1	1,00 ± 0,2	0,96 ± 0,2	0,54
AGER2	1,00 ± 0,2	1,12 ± 0,2	0,08
AGER3	1,00 ± 0,4	0,97 ± 0,4	0,82
Srb1	1,00 ± 0,3	1,03 ± 0,2	0,70
Hypertrophie			
α-MHC	1,00 ± 0,2	1,16 ± 0,3	0,054 *
β-MHC	1,00 ± 0,2	1,15 ± 0,2	0,022 *
ANF	1,00 ± 0,3	0,93 ± 0,3	0,43
α-Aktin	1,00 ± 0,3	0,91 ± 0,3	0,37
Tropomyosin1	1,00 ± 0,2	1,07 ± 0,3	0,39
Fibrose			
Collagen 1a1	1,00 ± 0,6	1,30 ± 0,6	0,16
Collagen 3a1	1,00 ± 0,4	0,88 ± 0,4	0,34
Fibulin5	1,00 ± 0,2	0,80 ± 0,2	0,02 *
TGF-β1	1,00 ± 0,3	1,11 ± 0,4	0,33
TGF-β3	1,00 ± 0,3	1,05 ± 0,3	0,53
Inflammation			
Lipocalin2	1,00 ± 0,4	1,12 ± 0,4	0,37

MW ± SD; * signifikanter Unterschied zur Kontrolle (p<0,05); n=20 je Gruppe

Tabelle A13.: AGE-spezifische Fluoreszenz in Serum und Herz der Mäuse nach viermonatiger Fettfütterung

<i>AGE-spezifische Fluoreszenz</i>	Kontrolle	Fett	p-Wert
Serum			
330nm/405nm	1,00 ± 0,2	1,03 ± 0,2	0,61
360nm/440nm	1,00 ± 0,3	0,92 ± 0,2	0,27
Herz			
330nm/405nm	1,00 ± 0,1	1,01 ± 0,1	0,68
360nm/440nm	1,00 ± 0,1	1,06 ± 0,2	0,19

MW ± SD; * signifikanter Unterschied zur Kontrolle (p<0,05); n=20 je Gruppe

Tabelle A14.: kardiale mRNA- und Proteinexpression oxidativer Marker nach viermonatiger Fettfütterung

	Kontrolle	Fett	p-Wert
mRNA-Expression			
MnSOD	1,00 ± 0,1	0,98 ± 0,1	0,58
Cu/ZnSOD	1,00 ± 0,1	0,96 ± 0,1	0,37
ecSOD	1,00 ± 0,4	0,99 ± 0,3	0,98
Cp	1,00 ± 0,1	0,98 ± 0,1	0,71
gp91phox	1,00 ± 0,2	1,06 ± 0,3	0,37
Proteinexpression			
MnSOD	1,00 ± 0,3	1,17 ± 0,4	0,09
Cu/ZnSOD	1,00 ± 0,3	1,29 ± 0,2	0,0004 *
Oxiblot	1,00 ± 0,4	1,49 ± 0,5	0,004 *

MW ± SD; * signifikanter Unterschied zur Kontrolle (p<0,05); n=20 je Gruppe

Tabelle A15.: mittels Dotblot und Western Blot bestimmte Proteinexpressionen der untersuchten AGE-Modifikationen im Serum und Herz der Mäuse nach viermonatiger Fettfütterung

	Kontrolle	Fett	p-Wert
Proteinexpression			
AGE-Modifikationen			
<i>Dotblot Serum</i>			
CML	1,00 ± 0,2	0,94 ± 0,1	0,21
AGE (S006593)	1,00 ± 0,2	0,99 ± 0,2	0,84
MDA	1,00 ± 0,1	1,01 ± 0,1	0,81
Imidazolone	1,00 ± 0,2	0,83 ± 0,3	0,04 *
Arg-Pyrimidin	1,00 ± 0,2	0,79 ± 0,2	0,0009 *
<i>Western Blot Herz</i>			
CML	1,00 ± 0,3	0,96 ± 0,3	0,68
MDA	1,00 ± 0,4	0,73 ± 0,3	0,02 *
HNE	1,00 ± 0,3	0,86 ± 0,2	0,11
AGE (S006593)	1,00 ± 0,5	1,03 ± 0,4	0,83
3-DG-Imidazolone	1,00 ± 0,5	0,92 ± 0,5	0,63
Arg-Pyrimidin	1,00 ± 0,3	1,12 ± 0,3	0,23

MW ± SD; * signifikanter Unterschied zur Kontrolle (p<0,05); n=20 je Gruppe

Tabelle A16.: kardiale mRNA-Expression der untersuchten Gene nach viermonatiger Fettfütterung

	Kontrolle	Fett	p-Wert
mRNA Expression			
AGE Rezeptoren			
AGER1	1,00 ± 0,2	1,18 ± 0,2	0,03 *
AGER2	1,00 ± 0,4	1,64 ± 0,5	0,0001 *
AGER3	1,00 ± 0,4	0,94 ± 0,4	0,61
Srb1	1,00 ± 0,4	1,34 ± 0,2	0,003 *
Hypertrophie			
α-MHC	1,00 ± 0,2	1,01 ± 0,2	0,91
β-MHC	1,00 ± 0,2	0,96 ± 0,2	0,52
ANF	1,00 ± 0,3	0,94 ± 0,3	0,52
α-Aktin	1,00 ± 0,6	0,91 ± 0,4	0,49
Tropomyosin1	1,00 ± 0,2	1,04 ± 0,2	0,54
Fibrose			
Collagen 1a1	1,00 ± 0,3	1,05 ± 0,3	0,67
Collagen 3a1	1,00 ± 0,8	1,25 ± 0,7	0,31
Fibulin5	1,00 ± 0,3	0,93 ± 0,3	0,47
TGF-β1	1,00 ± 0,2	0,99 ± 0,3	0,92
TGF-β3	1,00 ± 0,2	1,03 ± 0,3	0,59
Inflammation			
Lipocalin2	1,00 ± 0,4	0,77 ± 0,2	0,04 *

MW ± SD; * signifikanter Unterschied zur Kontrolle (p<0,05); n=20 je Gruppe

Tabelle A17.: AGE-spezifische Fluoreszenz in Serum und Herz von jungen (3 Monate) und alten (24 Monate) C57Bl/6-Mäusen

<i>AGE-spezifische Fluoreszenz</i>	jung	alt	p-Wert
Serum			
330nm/405nm	1,00 ± 0,2	1,20 ± 0,1	0,0008 *
360nm/440nm	1,00 ± 0,2	1,19 ± 0,1	0,0005 *
Herz			
330nm/405nm	1,00 ± 0,1	1,17 ± 0,1	2,85*10 ⁻⁵ *
360nm/440nm	1,00 ± 0,1	1,09 ± 0,1	0,004 *

MW ± SD; Gruppe jung als Kontrolle 1,0 gesetzt; * signifikanter Unterschied zur Gruppe jung, (p<0,05); n=20 je Gruppe

Tabelle A18.: kardiale mRNA- und Proteinexpression oxidativer Marker von jungen (3 Monate) und alten (24 Monate) C57Bl/6-Mäusen

	jung	alt	p-Wert
mRNA-Expression			
MnSOD	1,00 ± 0,1	0,92 ± 0,1	0,18
Cu/ZnSOD	1,00 ± 0,2	0,91 ± 0,1	0,25
ecSOD	1,00 ± 0,2	1,14 ± 0,2	0,33
Cp	1,00 ± 0,1	1,04 ± 0,2	0,82
gp91phox	1,00 ± 0,1	0,99 ± 0,2	0,96
Proteinexpression			
MnSOD	1,00 ± 0,3	0,72 ± 0,2	0,024 *
Cu/ZnSOD	1,00 ± 0,3	0,73 ± 0,3	0,04 *

MW ± SD; Gruppe jung als Kontrolle 1,0 gesetzt; * signifikanter Unterschied zur Gruppe jung (p<0,05); n=20 je Gruppe

Tabelle A19.: mittels Dotblot und Western Blot bestimmte Proteinexpressionen der untersuchten AGE-Modifikationen im Serum und Herz von jungen (3 Monate) und alten (24 Monate) C57Bl/6-Mäusen

	jung	alt	p-Wert
Proteinexpression			
AGE-Modifikationen			
<i>Dotblot Serum</i>			
CML	1,00 ± 0,2	1,40 ± 0,2	0,01 *
AGE (S006593)	1,00 ± 0,1	1,37 ± 0,2	0,02 *
HNE	1,00 ± 0,2	1,33 ± 0,3	0,04 *
Imidazolon	1,00 ± 0,2	1,23 ± 0,3	0,35
Pentosidin	1,00 ± 0,1	1,43 ± 0,3	0,04 *
<i>Western Blot Herz</i>			
CML	1,00 ± 0,3	1,20 ± 0,2	0,50
MDA	1,00 ± 0,2	1,20 ± 0,4	0,67
HNE	1,00 ± 0,2	0,90 ± 0,1	0,46
AGE (S006593)	1,00 ± 0,2	1,28 ± 0,4	0,02 *

MW ± SD; Gruppe jung als Kontrolle 1,0 gesetzt; * signifikanter Unterschied zur Gruppe jung (p<0,05); n=20 je Gruppe

Tabelle A20.: kardiale mRNA-Expression der untersuchten Gene von jungen (4 Monate) und alten (24 Monate) C57Bl/6-Mäusen

	jung	alt	p-Wert
mRNA Expression			
AGE Rezeptoren			
AGER1	1,00 ± 0,3	0,90 ± 0,2	0,47
AGER2	1,00 ± 0,2	1,15 ± 0,2	0,11
AGER3	1,00 ± 0,5	0,68 ± 0,3	0,11
Srb1	1,00 ± 0,2	1,18 ± 0,3	0,25
Hypertrophie			
α-MHC	1,00 ± 0,1	0,88 ± 0,1	0,04 *
β-MHC	1,00 ± 0,3	1,43 ± 0,2	0,002 *
ANF	1,00 ± 0,3	0,92 ± 0,2	0,47
α-Aktin	1,00 ± 0,3	0,70 ± 0,2	0,03 *
Tropomyosin1	1,00 ± 0,2	0,85 ± 0,2	0,11
Fibrose			
Collagen 1a1	1,00 ± 0,3	0,75 ± 0,2	0,08
Collagen 3a1	1,00 ± 0,1	0,80 ± 0,3	0,07
Fibulin5	1,00 ± 0,2	1,18 ± 0,3	0,19
TGF-β1	1,00 ± 0,4	1,02 ± 0,3	0,87
TGF-β3	1,00 ± 0,2	0,96 ± 0,2	0,56
Inflammation			
Lipocalin2	1,00 ± 0,4	1,96 ± 0,5	0,0002 *

MW ± SD; Gruppe jung als Kontrolle 1,0 gesetzt; * signifikanter Unterschied zur Gruppe jung ($p < 0,05$);
n=20 je Gruppe

Abbildungsverzeichnis

- Abb.1.1. Darstellung der Bildung von Advanced Glycation Endproducts (AGEs) durch nicht-enzymatische Glykierung, entnommen aus Singh R. et al. (1)
- Abb.1.2. vereinfachte schematische Darstellung der Bildung von CML aus Glukose und durch Oxidation von Lipiden, entnommen aus Meerwaldt et al. (6)
- Abb.1.3. Gehalt an Advanced Glycation Endproducts in Units in ausgewählten Nahrungsmitteln, AGE-Units sind definiert als mittels Elisa bestimmte Menge an Carboxymethyllysine (CML), entnommen aus Maslo R. (14)
- Abb.1.4. Struktur von full-length RAGE und seinen Splicing-Formen. Die V-Domäne ist entscheidend für die Bindung von Liganden. Deletionen in dieser Domäne führen zur N-truncated Form, die nicht mehr binden kann. Die lösliche, C-truncated Form (sRAGE) besteht lediglich aus der extrazellulären Domäne von RAGE und ist ebenfalls in der Lage, Liganden zu binden. sRAGE entsteht durch enzymatische Abspaltung von full-length RAGE oder durch alternatives Splicen. Entnommen aus Basta G. (36)
- Abb.2.1. schematische Darstellung der ablaufenden Reaktionen zur TG-Bestimmung mittels enzymatisch photometrischen Tests
- Abb.2.2. schematische Darstellung der ablaufenden Reaktionen zur Cholesterinbestimmung mittels enzymatisch-photometrischen Tests
- Abb.3.1. Nachweis von AGE-Modifikationen im Kaffee- und Brotkrustenextrakt gemessen mittels Dotblot; entnommen aus Ruhs S. Dissertation (87)
- Abb.3.2. Fluoreszenzmessung in der löslichen Fraktion von Kaffee und Brotkruste; Werte in Fluoreszenzeinheiten (FE); (A) Fluoreszenz von Kaffee und Brot bei 280nm/330nm; (B) Fluoreszenz von Kaffee und Brotkruste verglichen mit PBS bei 330nm/405nm und 360nm/440nm
- Abb.3.3. AGE-Fluoreszenz in Serum und Herz von jungen und alten C57Bl6-Mäusen (WT) und RAGE-KO-Mäusen MW \pm SD; * signifikant vs. Gruppe jung ($p < 0,05$)
- Abb.3.4. Gewichtsverlauf der C57Bl/6 (WT)- und RAGE-KO-Mäuse während Fütterung mit Kontroll- und Kaffeefutter über den Zeitraum von 14 Tagen (MW \pm SEM, n=10 je Gruppe)
- Abb.3.5. mittels Oxiblot bestimmte relative Menge an oxidativ veränderten Proteinen im Herzen von WT- und RAGE-KO-Mäusen mit und ohne Kaffeediät (MW \pm SD; n=10 je Gruppe)

- Abb.3.6. mRNA Expression von oxidativen und antioxidativen Enzymen im Herzen von WT- und RAGE-KO Mäusen in Abhängigkeit von Kontrolldiät und Kaffeeextraktfütterung (MW \pm SD; * $p < 0,05$; $n = 10$ je Gruppe)
- Abb.3.7. Proteinexpression der antioxidativen Enzymsysteme MnSOD und Cu/ZnSOD in den Herzen von WT- und RAGE-KO-Mäusen mit und ohne Kaffeeextraktfütterung (MW \pm SD; * $p < 0,05$; $n = 10$ je Gruppe)
- Abb.3.8. AGE-Fluoreszenzmessungen im Serum (A) und Herzen (B) der mit Kontroll- und Kaffeediät gefütterten WT-Mäuse und RAGE-KO Mäuse bei einer Extinktion/Emission von 330nm/405nm und 360nm/440nm (MW \pm SD; * $p < 0,05$; $n = 10$ je Gruppe)
- Abb.3.9. Gewichtsverlauf der WT- und RAGE-KO-Mäuse während der drei Tage (A) und vier Wochen (B) Brotkrustenfütterung (MW \pm SEM; $n = 10$ je Gruppe)
- Abb.3.10. Blutzuckerwerte der WT- und RAGE-KO-Mäuse zum Zeitpunkt der Tötung, nach drei Tagen (A) und vier Wochen (B) Brotkrustenfütterung (MW \pm SD; * $p < 0,05$; $n = 10$ je Gruppe)
- Abb.3.11. mittels Oxiblot bestimmte relative Mengen an oxidativ veränderten Proteinen in den Herzen von WT- und RAGE-KO-Mäusen nach drei Tagen (A) und vier Wochen (B) Brotdiät (MW \pm SD; $n = 10$ je Gruppe)
- Abb.3.12.A mRNA Expression von oxidativen und antioxidativen Enzymen im Herzen von WT- und RAGE-KO Mäusen nach drei Tagen Brotkrustendiät; MW \pm SD; * $p < 0,05$; $n = 10$ je Gruppe
- Abb.3.12.B mRNA Expression von oxidativen und antioxidativen Enzymen im Herzen von WT- und RAGE-KO Mäusen nach vier Wochen Brotkrustendiät; MW \pm SD; * $p < 0,05$; $n = 10$ je Gruppe)
- Abb.3.13. Proteinexpression der antioxidativen Enzymsysteme MnSOD und Cu/ZnSOD im Herzen von WT und RAGE-KO-Mäusen nach drei Tagen (A) und vier Wochen (B) Brotkrustenfütterung (MW \pm SD; * $p < 0,05$; $n = 10$ je Gruppe)
- Abb.3.14. Fluoreszenzmessung der im Serum enthaltenen AGEs bei 330nm/405nm (A) und 360nm/440nm (B) nach dreitägiger und vierwöchiger Brotkrustendiät (MW \pm SD; * $p < 0,05$; $n = 10$ je Gruppe)
- Abb.3.14. Fluoreszenzmessung der im Herz enthaltenen AGEs bei 330nm/405nm (C) und 360nm/440nm (D) nach drei Tagen und vier Wochen Brotkrustendiät (MW \pm SD; * $p < 0,05$; $n = 10$ je Gruppe)

- Abb.3.15. Immunohistochemischer Nachweis von CML im Herzen der WT-Mäuse nach drei Tagen Kontrolldiät (A) und Brotkrustendiät (B)
- Abb.3.16. repräsentatives Bild für den Nachweis mittels Western Blot von 3-DG-Imidazolone im Herzen von WT- und RAGE-KO-Mäusen nach drei Tagen Brotkrustendiät. Dabei wurden die Proben auf GAPDH normiert
- Abb.3.17. repräsentatives Bild für den Nachweis mittels Western Blot von MDA im Herzen von WT- und RAGE-KO-Mäusen nach 4 Wochen Brotkrustendiät. Dabei wurden die Proben auf GAPDH normiert
- Abb.3.18. mittels Oxiblot bestimmte relative Menge an oxidativ veränderten Proteinen im Herzen von WT- und RAGE-KO-Mäusen mit und ohne Fettdiät; MW \pm SD; * p<0.05
- Abb.3.19. mRNA-Konzentration antioxidativer und oxidativer Enzymsysteme im Herzen von WT- und RAGE-KO- Mäusen mit und ohne Fettdiät (MW \pm SD; * p<0,05)
- Abb.3.20. Proteinexpression der antioxidativen Enzymsysteme MnSOD und Cu/ZnSOD im Herzen von WT- und RAGE-KO-Mäusen mit und ohne Fettdiät (MW \pm SD; * signifikant vs. Kontrollgruppe (p<0,05))
- Abb.3.21. AGE-Fluoreszenz bei 330nm/405nm und 360nm/440nm im Serum (A) und Herzen (B) von WT-Mäusen und RAGE-KO Mäusen mit und ohne Fettdiät (MW \pm SD; * p<0,05)
- Abb.3.22. repräsentatives Bild für den Nachweis mittels Western Blot von HNE in Herzen von WT- und RAGE-KO-Mäusen nach Fettdiät. Dabei wurden die Proben auf GAPDH normiert
- Abb.3.23. Gewichtsverlauf der WT-Mäuse und RAGE-KO-Mäuse aus Kontroll- und Laufgruppe während des 4-monatigen Versuchszeitraum (MW \pm SEM)
- Abb.3.24. Erfasste Laufparameter zur Ermittlung des Laufverhaltens der WT- und RAGE-KO-Mäuse über den Zeitraum von vier Monaten. (MW \pm SD; * signifikant vs. Kontrollgruppe (p<0,05); n=5 in WT-Kontrollgruppe, n=6 in WT-Laufgruppe, n=8 in RAGE-KO-Kontrollgruppe, n=9 in RAGE-KO-Laufgruppe)
- Abb.3.25. Beispiel eines Laufprofils einer RAGE-KO-Maus über 24 Stunden
- Abb.3.26. mittels Oxiblot bestimmte relative Menge an oxidativ veränderten Proteinen im Herzen von WT- und RAGE-KO-Mäusen mit und ohne Laufgruppenintervention (MW \pm SD; * p<0,05)

- Abb.3.27. mRNA-Konzentration antioxidativer und oxidativer Enzymsysteme im Herzen von WT- und RAGE-KO-Mäusen mit und ohne Laufradintervention (MW \pm SD; * $p < 0,05$)
- Abb.3.28. Proteinexpression der antioxidativen Enzymsysteme MnSOD und Cu/ZnSOD im Herzen von WT- und RAGE-KO-Mäusen mit und ohne Laufradtraining (MW \pm SD; * $p < 0,05$)
- Abb.3.29. AGE-Fluoreszenz in Serum (A) und Herzen (B) WT -Mäusen und RAGE-KO Mäusen mit und ohne Laufradtraining (MW \pm SD; * signifikant $p < 0,05$; n=5 in WT Kontrollgruppe, n=6 in WT-Laufradgruppe, n=8 in RAGE-KO-Kontrollgruppe, n=9 in RAGE-KO-Laufradgruppe)

Tabellenverzeichnis

- Tab.3.1. kardiale mRNA- und Proteinexpression oxidativer Marker in C57Bl/6 (WT)- und RAGE-KO-Mäusen
- Tab. 3.2. AGE-spezifische Fluoreszenz in Serum und Herz von C57Bl/6 (WT)- und RAGE-KO-Mäusen
- Tab.3.3. mittels Dotblot und Western Blot bestimmte Proteinexpressionen der untersuchten AGE-Modifikationen im Serum und Herz von WT- und RAGE-KO-Mäusen
- Tab.3.4. mRNA-Expression der untersuchten Gene in den Herzen von C57Bl/6 (WT)- und RAGE-KO-Mäusen
- Tab.3.5. mittels Dotblot bestimmte Proteinexpression der untersuchten AGE-Modifikationen im Serum von WT- und RAGE-KO-Mäusen nach 2 Wochen Kaffee fütterung
- Tab.3.6. mittels Western Blot bestimmte Proteinexpression der untersuchten AGE-Modifikationen im Herzen von WT- und RAGE-KO-Mäusen nach 2 Wochen Kaffee fütterung
- Tab.3.7. mRNA-Expression der untersuchten Gene in den Herzen von WT- und RAGE-KO-Mäusen mit und ohne Kaffee fütterung
- Tab.3.8. mittels Dotblot bestimmte Proteinexpression der untersuchten AGE-Modifikationen im Serum von WT- und RAGE-KO-Mäusen nach drei Tagen Brotkrusten fütterung
- Tab.3.9. mittels Dotblot bestimmte Proteinexpression der untersuchten AGE-Modifikationen im Serum von WT- und RAGE-KO-Mäusen nach vier Wochen Brotkrusten fütterung
- Tab.3.10. mittels Dotblot bestimmte Proteinexpression der untersuchten AGE-Modifikationen in Herzen der WT- und RAGE-KO-Mäusen nach drei Tagen Brotkrusten fütterung
- Tab.3.11. mittels Dotblot bestimmte Proteinexpression der untersuchten AGE-Modifikationen in Herzen der WT- und RAGE-KO-Mäusen nach vier Wochen Brotkrusten fütterung
- Tab.3.12. mittels Western Blot bestimmte Proteinexpression der untersuchten AGE-Modifikationen in Herzen der WT- und RAGE-KO-Mäuse nach drei Tagen Brotkrusten fütterung

Tabellenverzeichnis

- Tab.3.13. mittels Western Blot bestimmte Proteinexpression der untersuchten AGE-Modifikationen in Herzen der WT- und RAGE-KO-Mäusen nach vier Wochen Brotkrustenfütterung
- Tab.3.14. mRNA-Expression der untersuchten Gene in Herzen der WT- und RAGE-KO-Mäuse nach drei Tagen Brotkrustendiät
- Tab.3.15. mRNA-Expression der untersuchten Gene in Herzen der WT- und RAGE-KO-Mäuse nach vier Wochen Brotkrustendiät
- Tab.3.16. Gewicht zu Versuchsbeginn und Versuchsende
- Tab.3.17. Verhältnis von Organgewicht/KG, Blutzucker, Serumgehalte an Insulin, Cholesterin, Triglyceriden von WT- und RAGE-KO-Mäusen, mit und ohne Fettdiät
- Tab.3.18. mittels Dotblot bestimmte Proteinexpression der untersuchten AGE-Modifikationen im Serum der WT- und RAGE-KO-Mäusen nach vier Monaten Fettdiät
- Tab.3.19. mittels Dotblot bestimmte Proteinexpression der untersuchten AGE-Modifikationen in Herzen der WT- und RAGE-KO-Mäusen nach vier Monaten Fettdiät
- Tab.3.20. mittels Western Blot bestimmte Proteinexpression der untersuchten AGE-Modifikationen in Herzen der WT- und RAGE-KO-Mäusen nach vier Monaten Fettdiät
- Tab.3.21. mRNA-Expression der untersuchten Gene in den Herzen der WT- und RAGE-KO-Mäuse nach viermonatiger Fettdiät
- Tab.3.22. mittels Dotblot bestimmte Proteinexpression der untersuchten AGE-Modifikationen im Serum von WT- und RAGE-KO-Mäusen nach drei Monaten Laufradintervention
- Tab.3.23. mittels Dotblot bestimmte Proteinexpression der untersuchten AGE-Modifikationen in Herzen der WT- und RAGE-KO-Mäusen nach 3 Monaten Laufradintervention
- Tab.3.24. mittels Western Blot bestimmte Proteinexpression der untersuchten AGE-Modifikationen in den Herzen der WT- und RAGE-KO-Mäusen nach 4 Monaten Laufradintervention
- Tab.3.25. mRNA-Expression der untersuchten Gene in Herzen der WT- und RAGE-KO-Mäuse nach dreimonatiger Laufradintervention

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form bisher keiner Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle, den

.....

Beatrice Leuner

Lebenslauf

Name: Beatrice Leuner
Geboren: am 18.05.1983, in Sebnitz (Sachsen)
Staatsangehörigkeit: deutsch
Wohnort: Brüderstr.13, 06108 Halle/Saale

Werdegang

Sept. 1993-Juni 2001 Götzinger-Gymnasium Neustadt in Sachsen
Abitur 2001

Okt. 2001-Juni 2006 Studium der Ernährungswissenschaften an der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Abschluss: Diplom-Ernährungswissenschaftlerin 2001

Nov. 2005-Juni 2006 Diplomarbeit am Institut für Ernährungswissenschaften
Prof. Dr. Klaus Eder
Naturwissenschaftliche Fakultät III
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Okt. 2006-März 2007 wissenschaftliche Hilfskraft an der Klinik für Herz- und
Thoraxchirurgie

Seit April 2007 Promotion an der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie
Prof. Dr. Dr. Andreas Simm
Medizinische Fakultät
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

April 2007-März 2010 Stipendium der Vereinigung der Freunde und Förderer
der Martin-Luther-Universität

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Stangl für die Betreuung meiner Promotion bedanken.

Ein großer Dank gilt auch dem Verein der Freunde und Förderer der Universität Halle-Wittenberg für die Vergabe des Stipendiums und das mir damit entgegengebrachte Vertrauen, die Arbeit bewältigen zu können.

Des Weiteren bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Andreas Simm für die Vergabe und praktische Betreuung meiner Promotion sowie für das immer offene Ohr für all meine Fragen.

Herrn Prof. Silber danke ich für die Möglichkeit, die Promotion in der Forschungsabteilung der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie anzufertigen.

Bei Frau Prof. Dr. Veronika Somoza bedanke ich mich für die Bereitstellung der Nahrungsmittelextrakte Kaffee und Brotkruste.

Ein großer Dank geht auch an die Postdocs des Labors Alexander Navarrete-Santos, Norbert Nass und Babett Bartling. Ich konnte jederzeit mit allen Fragen zu euch kommen und ihr habt sie alle bereitwillig beantwortet.

Auch allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern sowie Doktoranden und Diplomanten möchte ich danken, für die schöne, nie langweilige Zeit im Labor.

Zu guter letzt geht ein ganz großes Dankeschön an meine Familie, die mich immer wieder motiviert haben durchzuhalten und nie aufzugeben sowie für das stetige Interesse am Fortschreiten meiner Arbeit.