

Aus dem Bereich Innere Medizin III  
Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin  
Der Medizinischen Fakultät  
Der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Prof. Dr. med. M. Böhm

# Sympathoadrenerge Immunomodulation durch Regulation des Rezeptors für Advanced Glycation End Products (RAGE)

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2021

Vorgelegt von Anna-Maria Zundler, geb. Tatu  
Geboren am 04.11.1990 in Schwäbisch Hall

## **Inhalt**

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>II</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1.0 Zusammenfassung/Summary</b>	<b>1/2</b>
<b>2.0 Einleitung</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Rezeptor für Advanced Glycation End Products (RAGE)</b>	<b>4</b>
2.1.1 Expression des RAGE im Organismus	4
2.1.2 Struktur des RAGE und des sRAGE (soluble RAGE)	4
2.1.3 RAGE-assoziierte Erkrankungen und Signaltransduktion	5
2.1.4 Ausgewählte RAGE-Liganden und deren pathogenetische Relevanz	8
<b>2.2 Angeborenes Immunsystem und Inflammation</b>	<b>9</b>
2.2.1 Rolle des RAGE bei akuter und chronischer (subklinischer) Inflammation	10
<b>2.3 Sympathoadrenerges System</b>	<b>12</b>
2.3.1 Anatomie und Physiologie des vegetativen Nervensystems	12
2.3.2 Metabolisches Syndrom und arterielle Hypertonie	14
2.3.3 Renale Sympathikusdenervation	16
<b>2.4 Fragestellung</b>	<b>17</b>
<b>3.0 Material</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Rattenmodell</b>	<b>19</b>
<b>3.2 Rattengewebe zur Isolation mononukleärer Zellen aus der Milz und Fibroblastenisolation aus Herz und Niere</b>	<b>20</b>
<b>3.3 Human Embryonic Kidney 293 (HEK) - Zelllinie</b>	<b>20</b>
<b>3.4 Verwendete Substanzen</b>	<b>21</b>
<b>3.5 Verwendete Antikörper</b>	<b>22</b>

3.5.1	Verwendete Antikörper für Western Blot	22
3.5.2	Verwendete Antikörper für Immunfärbungen	23
<b>3.6</b>	<b>Verwendete Puffer</b>	<b>24</b>
3.6.1	Puffer für Western Blot Analyse	24
3.6.2	Puffer für Zellkultur	25
<b>3.7</b>	<b>Primer für Real-Time-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)</b>	<b>25</b>
<b>3.8</b>	<b>Sonstiges</b>	<b>25</b>
<b>4.0</b>	<b>Methoden</b>	<b>27</b>
<b>4.1</b>	<b>In vivo Experimente</b>	<b>27</b>
4.1.1	Chirurgische renale Denervation der Ratten	27
4.1.2	Bestimmung kardialer, metabolischer und renaler Parameter in vivo	28
4.1.3	Histologie der kardialen und renalen Gewebeproben	28
4.1.4	Probengewinnung für Western Blot und Real-Time- Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	30
<b>4.2</b>	<b>In vitro Experimente</b>	<b>30</b>
4.2.1	Probengewinnung	30
4.2.1.1	Fibroblastenisolation und Passage der Zellen	30
4.2.1.2	Ficoll-Trennung zur Isolierung mononukleärer Zellen	33
4.2.1.3	HEK - Zellkultur	35
4.2.2	Stimulationsexperimente	35
<b>4.3</b>	<b>Probenverarbeitung</b>	<b>36</b>
4.3.1	Immunfärbungen für $\alpha$ -Glattmuskelaktin und Fibronektin an der Zellkultur von adulten Nierenfibroblasten	36
4.3.2	Ernte der Fibroblasten, mononukleären Zellen der Milz (MNCs), humanen mononukleären Zellen aus peripheren venösem Blut (PBMCs) und HEK - Zellen	38
4.3.3	Zellmembranpräparation	38
4.3.4	Western Blot	39
4.3.5	Real-Time-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	42
<b>4.4</b>	<b>Auswertung</b>	<b>48</b>
4.4.1	Western Blot, Immunfärbungen für $\alpha$ -Glattmuskelaktin bzw. Fibronektin und Real-Time-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	48
4.4.2	Statistische Analysen	48

<b>5.0 Ergebnisse</b>	49
<b>5.1 Effekte der renalen Denervation auf renale, metabolische und kardio-funktionelle Parameter</b>	49
5.1.1 Renale und metabolische Parameter	49
5.1.2 Kardiale Funktionsparameter	50
<b>5.2 Effekte der renalen Denervation auf die renale und myokardiale RAGE/sRAGE-Expression</b>	52
5.2.1 Renale Denervation verringert die RAGE- und erhöht die sRAGE-Expression im Myokard	52
5.2.2 Renale Denervation verringert die RAGE- und erhöht die sRAGE-Expression im Nierengewebe	54
<b>5.3 Renale Denervation erhöht die sRAGE-Expression im Serum</b>	56
<b>5.4 Auswirkungen der renalen Denervation auf RAGE-Liganden</b>	57
5.4.1 Renale Denervation senkt den Serumspiegel sowie die myokardiale und renale Expression des CML (N $\epsilon$ -Carboxymethyllysin)	57
5.4.2 Renale Denervation senkt die Serumspiegel sowie die myokardiale und renale Expression des HMGB1 (High-Mobility-Group-Box 1)	60
5.4.3 Korrelationen zwischen CML- sowie HMGB1-Expression und myokardialer RAGE-Expression	63
<b>5.5 Effekte der renalen Denervation auf Myokardfibrose</b>	64
<b>5.6 Effekte der renalen Denervation auf renale Fibrose</b>	67
5.6.1 Korrelation zwischen renalem Noradrenalingehalt und renaler RAGE- bzw. sRAGE Expression	68
<b>5.7 RAGE- und sRAGE-Expression in adulten Rattensplenozyten unter Katecholamineinfluss</b>	69
<b>5.8 RAGE- und sRAGE-Expression in adulten kardialen Rattenfibroblasten unter Katecholamineinfluss</b>	72
<b>5.9 RAGE/sRAGE-Expression in HEK – Zellen und renalen Rattenfibroblasten</b>	75
<b>5.10 RAGE/sRAGE-Expression in humanen PBMCs</b>	77
<b>6.0 Diskussion</b>	78
<b>6.1 Sympathoadrenerge Effekte auf metabolische, renale und kardio-funktionelle Parameter</b>	78
<b>6.2 Sympathoadrenerge Effekte auf kardio-renale Fibrose</b>	83
<b>6.3 Sympathoadrenerge Effekte auf die Expression des RAGE/sRAGE und deren Liganden HMGB1 und CML</b>	84
<b>6.4 Klinische Bedeutung und Ausblick</b>	89

<b>7.0 Literatur</b>	90
<b>8.0 Anhang</b>	105
<b>8.1 Publikationen und Kongressbeiträge</b>	105
8.1.1 Originalarbeit	105
8.1.2 Poster- und Kongressbeiträge	105
<b>8.2 Danksagung</b>	107
<b>8.3 Lebenslauf</b>	108

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Struktur des RAGE (Rezeptor für Advanced Glycation End Products) und seine Isoformen	5
<b>Abbildung 2:</b> Die zentrale Rolle des RAGE in der Pathophysiologie multipler Erkrankungen	6
<b>Abbildung 3:</b> Signaltransduktionskaskaden des RAGE	8
<b>Abbildung 4:</b> Pathophysiologie der Inflammation	10/11
<b>Abbildung 5:</b> Bildung der AGEs (Advanced Glycation End Products) durch die Maillard Reaktion	12
<b>Abbildung 6:</b> Neurotransmitter im vegetativen Nervensystem	13
<b>Abbildung 7:</b> Circulus vitiosus der sympathoadrenergen Überaktivität	14
<b>Abbildung 8:</b> Pathophysiologie des metabolischen Syndroms	15
<b>Abbildung 9:</b> Die zentrale Rolle des RAGE in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes mellitus	15
<b>Abbildung 10:</b> Äußerer Phänotyp von schlanken spontan hypertensiven Ratten und spontan hypertensiven obesen Ratten	20
<b>Abbildung 11:</b> Lage der Harnorgane in situ zur Veranschaulichung der renalen operativen Denervation im Rattenmodell	28
<b>Abbildung 12:</b> Schematische Darstellung des Ablaufs der Fibroblastenisolation	33
<b>Abbildung 13:</b> Erster Zentrifugationsschritt der Ficoll-Auftrennung humaner PBMCs (mononukleäre Zellen aus peripherenvenösem Blut)	35
<b>Abbildung 14:</b> Immunfärbung für $\alpha$ -Glattmuskelaktin in renalen Fibroblasten	38
<b>Abbildung 15:</b> Immunfärbung für Fibronectin in renalen Fibroblasten	39
<b>Abbildung 16:</b> Schematische Darstellung des Ablaufs des Western Blots	42
<b>Abbildung 17:</b> Schematische Darstellung des Ablaufs der RNA (Ribonukleinsäure) - Isolation	44
<b>Abbildung 18:</b> Schematische Darstellung des Ablaufs des SYBR <sup>®</sup> Green Assays	48
<b>Abbildung 19:</b> Western Blot-Analyse der myokardialen RAGE- und sRAGE-Proteinexpression	54
<b>Abbildung 20:</b> Korrelation von renalem Noradrenalingehalt und myokardialer RAGE-Proteinexpression	55
<b>Abbildung 21:</b> Western Blot-Analyse der renalen RAGE- und sRAGE-Proteinexpression	56
<b>Abbildung 22:</b> Western Blot-Analyse der sRAGE-Proteinexpression im Serum	57

<b>Abbildung 23:</b> Western Blot-Analyse der CML (N $\epsilon$ -Carboxymethyllysin) - Proteinexpression in Serum, Myokard und Niere	59/60
<b>Abbildung 24:</b> Western Blot-Analyse der HMGB1 (High Mobility Group Box 1) - Proteinexpression in Serum, Myokard und Niere	62/63
<b>Abbildung 25:</b> Korrelation von myokardialer HMGB1-Proteinexpression und myokardialer RAGE-Proteinexpression, myokardialer HMGB1- und CML-Proteinexpression im Serum	64
<b>Abbildung 26:</b> Interstitielle Myokardfibrose	65
<b>Abbildung 27:</b> Korrelation von interstitieller Myokardfibrose und renalem Noradrenalinegehalt, myokardialer sRAGE-Proteinexpression und CML-Proteinexpression im Serum	66
<b>Abbildung 28:</b> Interstitielle renale Fibrose	67
<b>Abbildung 29:</b> Korrelation von renalem Noradrenalinegehalt und renaler RAGE-Proteinexpression bzw. renaler sRAGE-Proteinexpression	68
<b>Abbildung 30:</b> Quantifizierung der RAGE-mRNA (messenger Ribonukleinsäure) - Expression in Rattensplenozyten	70
<b>Abbildung 31:</b> Western Blot-Analyse der RAGE/sRAGE-Expression der Rattensplenozyten	71
<b>Abbildung 32:</b> Quantifizierung der RAGE-mRNA-Expression in kardialen Rattenfibroblasten	73
<b>Abbildung 33:</b> Western Blot-Analyse der RAGE/sRAGE-Proteinexpression in kardialen Rattenfibroblasten	74
<b>Abbildung 34:</b> Western Blot-Analyse der RAGE/sRAGE-Proteinexpression in HEK (Human Embryonic Kidney) - Zellen und renalen Rattenfibroblasten	75/76
<b>Abbildung 35:</b> Western Blot-Analyse der RAGE/sRAGE-Proteinexpression in humanen PBMCs	77
<b>Abbildung 36:</b> Circulus vitiosus bei metabolischem Syndrom	80
<b>Abbildung 37:</b> Circulus vitiosus bei überaktivem Sympathikotonus	82

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b>	RAGE-assoziierte Erkrankungen und daran beteiligte Liganden	6
<b>Tabelle 2:</b>	Chemikalien, Zellkulturmedien und Reaktionskits	21
<b>Tabelle 3:</b>	Primärantikörper für Western Blots	23
<b>Tabelle 4:</b>	Sekundärantikörper für Western Blots	23
<b>Tabelle 5:</b>	Primärantikörper für Immunfärbungen	23
<b>Tabelle 6:</b>	Sekundärantikörper für Immunfärbungen	23
<b>Tabelle 7:</b>	Oligonukleotidsequenzen und -schmelztemperaturen	25
<b>Tabelle 8:</b>	Geräte, Verbrauchsmaterial, Software	26
<b>Tabelle 9:</b>	Ansatz für Verdaulösung	32
<b>Tabelle 10:</b>	Gesunde Probanden für die Isolation humaner PBMCs (mononukleäre Zellen aus peripherenvenösem Blut)	34
<b>Tabelle 11:</b>	Ansatz Master-Mix für DNase (Desoxyribonuklease) - Verdau	45
<b>Tabelle 12:</b>	Protokoll für Reverse Transkription	45
<b>Tabelle 13:</b>	Protokoll für Reverse Transkription: Inkubation im Thermocycler	46
<b>Tabelle 14:</b>	Protokoll für die von uns gewählte Standardreihe für PCR	47
<b>Tabelle 15:</b>	Protokoll für Ansatz für q(ualitative)RT-PCR	47
<b>Tabelle 16:</b>	Protokoll für PCR: Thermocyclerprogramm	47
<b>Tabelle 17:</b>	Renale, metabolische und kardio-funktionelle Parameter	52



## Abkürzungsverzeichnis

<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>AC</b>	Adenylatcyclase
<b>ACE</b>	Adenosin Converting Enzyme
<b>ADAM 10</b>	A disintegrin and metalloproteinase 10
<b>AGEs</b>	Advanced Glycation End Products
<b>AOPPs</b>	Advanced Oxidation Protein Products
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>Aqua dest.</b>	Aqua destillata
<b>Aqua ad inj.</b>	Aqua ad injectabilia
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>AU</b>	Arbitrary Units
<b>bpm</b>	Beats per minute
<b>bzw.</b>	Beziehungsweise
<b>ca.</b>	Circa
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Kalzium
<b>CAM</b>	Cell adhesion molecule (eng. „Adhäsionsmolekül“)
<b>cAMP</b>	Cyclisches Adenosinmonophosphat
<b>cDNA</b>	Komplementäre DNA
<b>CML</b>	N $\epsilon$ -Carboxymethyllysin
<b>cRAGE</b>	Cleaved Receptor for Advanced Glycation End Products
<b>Ct</b>	Thereshold cycle (Cycle number/Thereshold)
<b>CT</b>	Computertomographie
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonat
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DNase</b>	Endonuklease, baut doppelsträngige DNA ab
<b>dNTP-Mix</b>	Nukleotid-Mix, Desoxyribonukleotide
<b>dsDNA</b>	Doppelstrang-DNA
<b>DTT</b>	Ditriorethiol
<b>ECL</b>	Western Blot Detektionsreagenz

<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EF</b>	Ejektionsfraktion
<b>eGFR</b>	Estimated Glomerular Filtration Rate
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
<b>ERK1/2</b>	Extracellular signal-regulated kinase 1/2
<b>esRAGE</b>	Endogenous secretory Receptor for Advanced Glycation End Products
<b>et al.</b>	et alii/aliae (lat. "und andere")
<b>FCS</b>	Fetales Kalbsserum
<b>FFA</b>	Free fatty acids
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
<b>GFR</b>	Glomerular filtration rate
<b>Ggf.</b>	Gegebenenfalls
<b>h</b>	Stunde(n)
<b>HbA1c</b>	Glykiertes Hämoglobin
<b>HEK-Zellen</b>	Human embryonic kidney- Cells (humane embryonale Nierenzellen der Linie 293)
<b>HMGB1</b>	High Mobility Group Box 1
<b>HR</b>	Heart rate
<b>hs-CRP</b>	Hoch sensitives C-reaktives Protein
<b>HT 1080</b>	Humane Fibrosarkom-Zelllinie
<b>Hz</b>	Hertz (1/s)
<b>ICAMs</b>	Intracellular cell Adhesion Molecule
<b>IDF</b>	International Diabetes Foundation
<b>IgG</b>	Immunglobulin
<b>IL-6</b>	Interleukin 6
<b>IOD/OD</b>	Integrated optical density
<b>JAK</b>	Januskinase
<b>K<sup>+</sup></b>	Kalium
<b>kDa</b>	Kilo-Dalton
<b>Kg, g, mg, µg, pg</b>	Kilogramm, Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Picogramm
<b>KHK</b>	Koronare Herzkrankheit
<b>l, ml, µl</b>	Liter, Milliliter, Mikroliter
<b>LDL</b>	Low density Lipoprotein

<b>LV</b>	Linksventrikulär
<b>LVedP</b>	Left-ventricular end-diastolic pressure
<b>M</b>	Molar
<b>mA</b>	Milli-Ampere
<b>MAP</b>	Mean arterial pressure
<b>MAPK</b>	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade
<b>M-Cholinorezeptor</b>	Muskarinerges Cholinorezeptor
<b>min</b>	Minuten
<b>ml, µl</b>	Milliliter, Mikroliter
<b>mm, nm</b>	Millimeter, Nanometer
<b>mmHg</b>	Millimeter Quecksilbersäule
<b>mmol</b>	Millimolar
<b>mmol, µmol, nmol</b>	Millimol, Mikromol, Nanomol
<b>MMP</b>	Matrix Metalloproteinase
<b>MNC</b>	Mononukleäre Zellen
<b>mRNA</b>	Messenger Ribonukleinsäure
<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie
<b>n</b>	Anzahl der Experimente (bzw. Anzahl der Tiere Zellen)
<b>NA</b>	Noradrenalin
<b>Na<sup>+</sup></b>	Natrium
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NADPH</b>	Nicotinamidadeninucleotidphosphat
<b>NF-κB</b>	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
<b>NYHA</b>	New York Heart Association
<b>p</b>	Signifikanzwert
<b>PAI-1</b>	Plasminogen activator inhibitor
<b>PBMC</b>	Peripheral blood mononuclear cells (Periphere mononukleäre Zellen)
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
<b>pH</b>	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
<b>PI3K</b>	Phosphoinositid 3 Kinase
<b>PKA</b>	Proteinkinase A
<b>PNS</b>	Peripheres Nervensystem
<b>qRT-PCR</b>	Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction

<b>r</b>	Korrelationskoeffizient
<b>RAGE</b>	Receptor for Advanced Glycation End Products
<b>RAAS</b>	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
<b>RDN</b>	Renale Denervation
<b>RhoGTPase</b>	Monomere G Proteine, die Guaninribosephosphat binden
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RNAse</b>	RNA-abbauende Endonuklease
<b>ROS</b>	Reaktive Oxygen Species
<b>Rpm</b>	Umdrehungen pro Minute (round per minute)
<b>RT</b>	Real Time
<b>s/sec, ms</b>	Sekunden, Millisekunden
<b>s.(o)</b>	Siehe (oben)
<b>SDS</b>	Sodiumdodecylsulfat Na <sup>+</sup> -Salz
<b>SDS-PAGE</b>	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>SEM</b>	Standard Fehler des Mittelwertes (standard error of the mean)
<b>SHAM</b>	engl. Zum Schein/Scheinbehandlung
<b>SHR</b>	Spontan hypertensive Ratten
<b>SHRob</b>	Spontan hypertensive, obese Ratte
<b>SHRobRDN</b>	Spontan hypertensive, obese, renal denervierte Ratte
<b>Sog.</b>	Sogenannt
<b>sRAGE</b>	soluble Receptor for Advanced Glycation End Products
<b>STAT</b>	Signal Transducers and Activators of Transcription
<b>SYBR®-Green</b>	DNA bindender Fluorochrom
<b>Taq</b>	Thermus-aquaticus
<b>TEMED</b>	N', N'. N', N-Tetramethyldiamin
<b>TGF-β</b>	Transforming growth factor beta
<b>TLR</b>	Toll like Receptor
<b>Tm</b>	Schmelztemperatur
<b>TNF-α</b>	Tumornekrosefaktor α
<b>Tris</b>	tris(hydroxymethyl)Aminomethan
<b>U</b>	Units/Einheiten
<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>UV-Licht</b>	Ultraviolettes Licht

<b>V, mV</b>	Volt, Millivolt
<b>VCAMs</b>	Vascular Cell Adhesion Molecule
<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor
<b>VLDL</b>	very low-density Lipoprotein
<b>vs.</b>	versus
<b>WHO</b>	World Health Organisation
<b>z.B.</b>	zum Beispiel
<b>z.T.</b>	zum Teil
<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem
<b><math>\beta_1</math>-AR/ <math>\beta_2</math>-AR</b>	beta-1/beta-2-Adrenorezeptor

## 1.0 Zusammenfassung

RAGE ist ein Multiligandenrezeptor und spielt eine maßgebliche Rolle in unterschiedlichen pathophysiologischen Prozessen. Dieser wurde initial vor allem mit diabetischen Spätkomplikationen und inflammatorischen sowie profibrotischen Prozessen in Verbindung gebracht. Die lösliche Isoform des Rezeptors, das sogenannte soluble RAGE (sRAGE) entsteht entweder durch Abspaltung des Rezeptors an der Zellmembran oder als Splicing-Variante durch aktive Sekretion. Das sRAGE wirkt als sog. Decoy-Rezeptor (englisch für „Köder“), indem es Liganden wie z.B. AGEs abfängt und somit die Signaltransduktion des membranständigen RAGE verhindert. Im Tiermodell hat die Zufuhr von sRAGE diabetische Spätkomplikationen auf makro- und mikrovaskulärer Ebene supprimieren können. sRAGE wird deshalb als protektiver Faktor angesehen. Eine Hochregulation der RAGE-Expression bzw. eine Herunterregulation des sRAGE wurden bereits für mehrere akute und chronische pathophysiologische Bedingungen beschrieben, die mit einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems assoziiert sind wie zum Beispiel auch beim metabolischen Syndrom. Das metabolische Syndrom ist mit einem erhöhtem Sympathikotonus und einer subklinischen Inflammation assoziiert. Ein direkter Zusammenhang zwischen sympathoadrenergem System und dem RAGE/sRAGE-System wurde bisher noch nicht charakterisiert. Wir haben uns daher gefragt, ob durch Modulation des sympathischen Nervensystems auch das RAGE/sRAGE-System beeinflusst werden kann und führten hierfür in vivo und in vitro Experimente durch. Als in vivo Modell des metabolischen Syndroms wählten wir das Modell der spontan hypertensiven obesen Ratte (SHRob). Die obesen Ratten hatten einen Leptin-Rezeptor-Defekt, aufgrund dessen sie einen ausgeprägten Hypertonus, eine Insulinresistenz und eine Hyperinsulinämie entwickelten. Weiterhin wiesen sie eine moderate linksventrikuläre diastolische Dysfunktion und eine ausgeprägte Nephropathie auf. Sowohl afferente als auch efferente renale sympathische Nervenfasern, die netzartig um die Nierengefäße verlaufen und bis in die Adventitia reichen, sind an der Pathogenese und Progression der Hypertonie beteiligt. Aus tierexperimentellen und klinischen Untersuchungen ist bekannt, dass die Aktivität des gesamten sympathischen Nervensystems maßgeblich von diesen afferenten renalen Nervenfasern bestimmt wird. Eine Überaktivität des sympathischen Nervensystems führt neben der Blutdrucksteigerung unter anderem zu oben genannten Endorganschäden und Komorbiditäten. Wir haben uns die Methode der renalen Denervation, bei der die sympathischen Afferenzen und Efferenzen in der Adventitia unterdrückt werden, zunutze gemacht, um einen systemisch erniedrigten Katecholamin-Spiegel zu erzielen. Dabei haben wir vier Gruppen miteinander verglichen: normotensive, normalgewichtige Kontrollratten (Kontrolle), spontan hypertensive, normalgewichtige Ratten (SHR), sham-denervierte spontan

hypertensive obese Ratten (SHRob) und spontan hypertensive obese Ratten, die renal denerviert wurden (SHRobRDN). Wir haben die RAGE- und sRAGE-Expression immunochemisch mittels Western Blot aus Gewebehomogenaten und die sRAGE-Expression im Serum dieses Rattenmodells untersucht. Auch hierbei konnten wir die oben beschriebene pro-inflammatorische Umkehr des RAGE/sRAGE-Gleichgewichtes in Herz- und Nierengewebe der obesen Ratten nachweisen. Auch die Expression der RAGE-Liganden CML und HMGB1 zeigte sich im Sinne einer pro-inflammatorischen Dysbalance in den obesen Ratten erhöht und konnte wie das RAGE/sRAGE-Verhältnis durch renale Denervation korrigiert werden. Ebenso führte die Reduktion des Katecholaminspiegels nach renaler Denervation zu einer Verbesserung der kardio-renalen Fibrose sowie kardiofunktioneller und renaler Funktionsparameter. Western Blot-Analysen aus Zellmembranpräparationen und Zellkulturüberständen weisen darauf hin, dass es sich um blutdruckunabhängige Effekte handeln könnte. Adulte kardiale Rattenfibroblasten, renale Fibroblasten, humane embryonale Nierenzellen, frisch isolierte Rattensplenozyten sowie humane periphere mononukleäre Zellen wurden zeitabhängig mit dem unselektiven beta-Adrenorezeptoragonisten Isoproterenol stimuliert. Dies führte zu einer stetigen Abnahme der sRAGE-Sekretion ins Zellkulturmedium und zu einer Zunahme der membranständigen RAGE-Expression. Des Weiteren zeigte sich durch die selektive Blockade des  $\beta_1$ - bzw.  $\beta_2$ -Adrenorezeptors, dass die RAGE-Expression über den  $\beta_1$ -Adrenorezeptor und die sRAGE-Ausschüttung über den  $\beta_2$ -Adrenorezeptor reguliert wird. Zusammenfassend kann man sagen, dass die sympathoadrenerge Aktivierung in vivo und in vitro zu einer RAGE-Überexpression und einer sRAGE-Reduktion führt. Dieses proinflammatorische Ungleichgewicht kann durch die Modulation des Sympathikus vermindert werden. Damit könnte das Fortschreiten von Endorganschäden wie Herz- und Niereninsuffizienz beim metabolischen Syndrom verlangsamt werden, was die Grundlage für prospektive klinische Untersuchungen legt.

## Summary

RAGE is a multi-ligand receptor and is involved in numerous pathophysiological processes. Initially it was described to be involved in diabetic late complications and pro-inflammatory and pro-fibrotic processes. The soluble isoform is either cleaved from the membrane bound receptor or is a splicing variant and secreted from the cytosol into the extracellular space/blood circulation. It acts as a decoy receptor by binding circulating RAGE ligands and thereby inhibiting the signal transduction of the membrane bound receptor. In animal models sRAGE administration prevented micro- and macrovascular diabetic late complications. Therefore,

sRAGE is considered to be protective. RAGE-upregulation and sRAGE-downregulation was shown for acute and chronic pathophysiological processes with increased sympathetic activity such as the metabolic syndrome which is associated with increased sympathetic activity and subclinical inflammation. A direct relation between the sympathetic nervous system and the RAGE/sRAGE-system has not been characterized yet. The aim of this study was to figure out if the modulation of the sympathetic nervous system influences the RAGE/sRAGE-system in vivo and in vitro. The in vivo model for the metabolic syndrome was the spontaneously hypertensive obese rat. These animals had a leptin-receptor defect with insulin resistance and hyperinsulinemia. Furthermore, the rats showed moderate diastolic dysfunction and severe nephropathy. Afferent and efferent sympathetic nerves are located in the adventitia of renal arteries and are considered to be involved in the development and progression of arterial hypertension. Studies involving animal experiments and clinical studies showed a significant influence of the afferent renal nerves on the activity of the sympathetic nervous system. The overactivity of the sympathetic nervous system is associated with increased blood pressure, end-organ damage and comorbidities. For systemic reduction of catecholamine levels a surgical and chemical renal arterial denervation was performed in obese rats. We compared four groups: normotensive lean rats (Control), spontaneously hypertensive lean rats (SHR), spontaneously hypertensive obese rats with sham procedure (SHRob) and spontaneously hypertensive obese rats with renal denervation (SHRobRDN). RAGE- and sRAGE-expression in heart and renal tissue were assessed by western blot. We noted in all tissues a pro-fibrotic RAGE/sRAGE dysbalance in obese rats, while this dysbalance was corrected by renal denervation. We noted similar results regarding the RAGE ligands CML and HMGB1. We conclude that the modulation of the sympathetic nervous system led to a delayed progress of hypertension, renal and myocardial damage as shown by reduced cardio-renal fibrosis and improved cardio-functional and renal parameters. Western blot analysis of cell culture experiments indicate that the observed benefits could be independent of blood pressure reduction. Adult cardiac fibroblasts, renal fibroblasts, human embryonic kidney cells, fresh isolated rat splenocytes and human peripheral blood mononuclear cells were repeatedly stimulated with the  $\beta$ -adrenoreceptor agonist isoproterenol. We noted a reduction of sRAGE shedding into the cell culture medium, while membrane bound RAGE was upregulated. In conclusion, chronic sympathetic overactivity causes in vivo and in vitro RAGE upregulation and sRAGE downregulation. This pro-inflammatory dysbalance could be ameliorated by modulation of sympathetic nervous system via renal denervation. This could delay the progression of end organ damage such as renal and myocardial fibrosis in metabolic syndrome.



## 2.0 Einleitung

### 2.1 Rezeptor für Advanced Glycation End Products (RAGE)

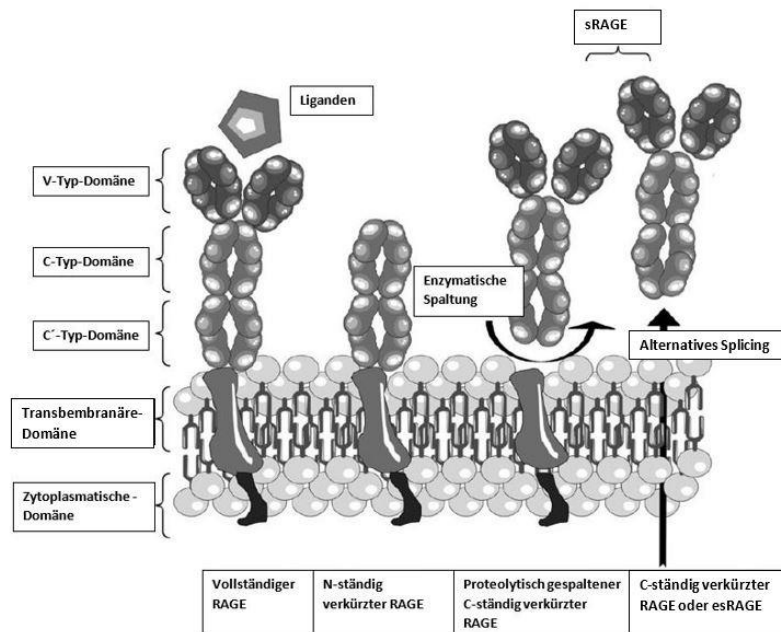
#### 2.1.1 Expression des RAGE im Organismus

RAGE wurde 1992 erstmals von Neeper et al. aus Rinderlungen isoliert und als 55 kDa Protein, das sich auf der Membran von Endothelzellen befindet, charakterisiert (Neeper et al., 1992). Mittlerweile ist bekannt, dass RAGE auf einer Reihe weiterer Zellen exprimiert ist. Darunter zählen Immunzellen, Zellen der glatten Gefäßmuskulatur, Nervenzellen, Kardiomyozyten, Fibroblasten und Podozyten (Aleshin et al., 2008; Brett et al., 1993; Tanji et al., 2000). Mit Ausnahme der Lunge wird RAGE normalerweise nur in geringem Maße exprimiert und steigt im Rahmen von Erkrankungen durch eine Akkumulation von Liganden auch in anderen Geweben an (Ramasamy et al., 2009).

#### 2.1.2 Struktur des RAGE und des sRAGE (soluble RAGE)

RAGE gehört zur Immunglobulin-Superfamilie (Basta et al., 2008). Seine Struktur ähnelt somit der der Immunglobuline. Wie in Abbildung 1 gezeigt, besteht der Rezeptor aus fünf Domänen: einer extrazellulären Domäne, die aus einem variablen (V-type) Teil besteht, an die Liganden binden können, gefolgt von zwei konstanten (C-type) Anteilen. Darauf folgt eine hydrophobe, transmembranöse Domäne, an der die cytosolische Domäne haftet, die für die Signaltransduktion verantwortlich ist (Basta et al., 2008; Bierhaus et al., 2005). Neben dem oben beschriebenen vollständigen Rezeptor gibt es verschiedene verkürzte Varianten des RAGE sowie zwei lösliche Formen, die im Plasma zirkulieren. Bei den löslichen Formen des Rezeptors unterscheidet man je nach Entstehungsmechanismus zwei Varianten: Das als lösliches („soluble“) RAGE bezeichnete sRAGE, welches durch proteolytische Abspaltung des membranständigen Rezeptors nach extrazellulär freigesetzt wird, und das sogenannte endogene secretory RAGE (esRAGE), das nach alternativem mRNA-Splicing aus den Zellen sezerniert wird (Koch et al., 2010; Ding et al., 2005). Die proteolytische Spaltung des RAGE zu sRAGE (auch cRAGE, „cleaved“ RAGE genannt) erfolgt durch die Metalloproteinasen ADAM 10 (engl. A Disintegrin And Metalloproteinase 10) und MMP 9 (Matrixmetalloproteinase 9) (Zhang et al., 2008; Raucci et al., 2008). In seiner Struktur ähnelt das sRAGE dem membranständigen RAGE, indem es sowohl die V-Typ- als auch die C-Typ-Domäne aufweist, jedoch keine transmembranöse Domäne mehr beinhaltet und somit ohne nachfolgende Signaltransduktion RAGE-Liganden bindet, bevor diese an den

membranständigen Rezeptor andocken können (Ding et al., 2005). Dadurch werden Signalkaskaden, die durch den membranständigen Rezeptor ausgelöst würden, verhindert (Ding et al., 2005).

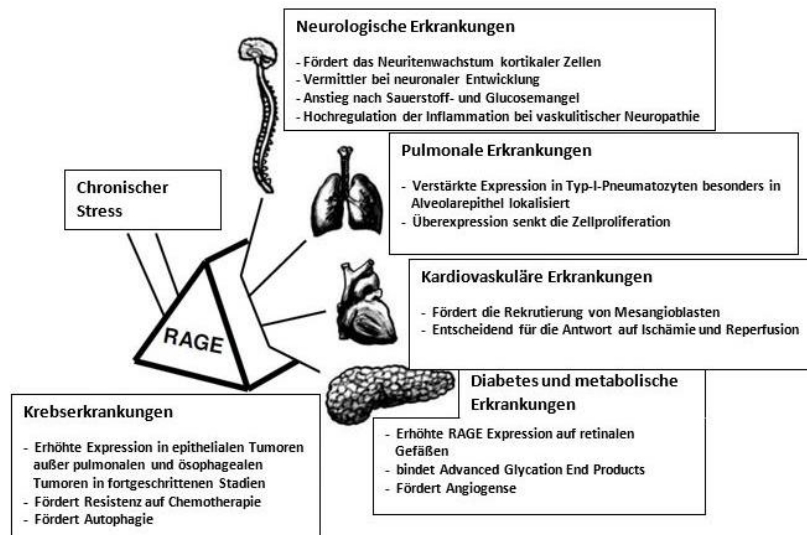


**Abbildung 1: Struktur des RAGE (Rezeptor für Advanced Glycation End Products) und seine Isoformen**

Der vollständige Rezeptor besteht aus einer zyttoplasmatischen, einer transmembranösen und einer extrazellulären Domäne. Die V(-ariable) Domäne bindet Liganden, während die zyttoplasmatische Domäne für die Signaltransduktion verantwortlich ist. Das lösliche sRAGE entsteht entweder durch proteolytische Spaltung oder durch alternatives mRNA-Splicing. (Modifiziert nach Basta et al., 2008).

### 2.1.3 RAGE-assoziierte Erkrankungen und Signaltransduktion

RAGE ist ein Multiligandenrezeptor, der zuerst als Rezeptor für Addukte beschrieben wurde, die über nicht-enzymatische Glykierung entstehen, wie sie bei Proteinen und Lipiden im Rahmen von verschiedenen Erkrankungen und vor allem bei Diabetes mellitus vorkommen (Basta et al., 2008). Von diesen Liganden, die auch als AGEs bezeichnet werden, stammt der Name des Rezeptors. Die Tatsache, dass der Rezeptor auch eine Reihe weiterer Liganden wie S100 (Multigen-Familie Kalzium-bindender Proteine),  $\beta$ -Amyloid oder HMGB1 binden kann, suggeriert, dass dieser eine zentrale Rolle in der Regulation von Homöostase und Pathogenese zahlreicher Krankheiten spielt (Basta et al., 2008). Tatsächlich ist der Rezeptor in der Pathogenese einiger, vor allem inflammatorischer und autoimmuner sowie kardiovaskulärer Krankheitsbilder involviert. Abbildung 2 und Tabelle 1 geben einen Überblick über RAGE- assoziierte Erkrankungen.



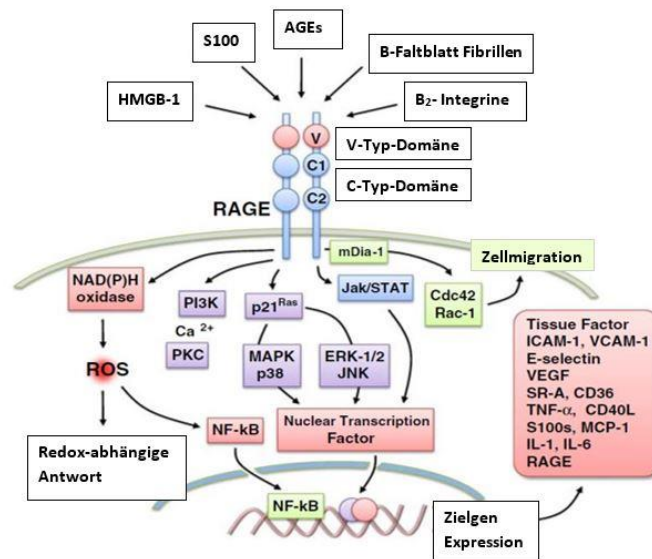
**Abbildung 2: Die zentrale Rolle des RAGE in der Pathophysiologie multipler Erkrankungen**

Chronischer Stress fördert die RAGE-Expression und Signaltransduktion. Die Abbildung veranschaulicht die zentrale Stellung des RAGE in der Pathophysiologie einiger chronischer Krankheiten. (Modifiziert nach Sparvero et al., 2009).

**Tabelle 1: RAGE-assoziierte Erkrankungen und daran beteiligte Liganden**

Erkrankung	Liganden
Hyperglykämie und Diabetes mellitus (Ramasamy et al., 2009; Tikellis et al., 2008; Li et al., 2011)	Advanced Glycation End Products (AGEs) High Mobility Group Box 1 (HMGB1)
Atherosklerose (Raposeiras-Roubín et al., 2010; Ha et al., 2013)	Oxidiertes LDL Advanced Glycation End Products (AGEs) High Mobility Group Box 1 (HMGB1)
Tumorbiologie und Metastasierung (Tang et al., 2013; Radia et al., 2013)	High Mobility Group Box 1 (HMGB1)
Alterungsprozesse (Nedić et al., 2013)	Advanced Glycation End Products (AGEs) Advanced Oxidation Protein Products (AOPPs)
Alzheimer Erkrankung (Ramasamy et al., 2009)	β-Amyloid
Hypoxie und Ischämie/Reperfusion (Ramasamy et al., 2009; Selejan et al., 2012; Volz et al., 2012)	Advanced Oxidation Protein Products (AOPPs) S100/Calgranuline
Rheumatoide Arthritis (Ramasamy et al., 2009)	High Mobility Group Box 1 (HMGB1)
Multiple Sklerose (Ramasamy et al., 2009)	S100/Calgranuline
Transplantat-Abstoßung (Brenner et al., 2013; Wilkes et al., 2009)	High Mobility Group Box 1 (HMGB1)
Sepsis und Sepsis-induzierte kardiale Dysfunktion (Ramasamy et al., 2009; Sadik et al., 2012; Huang et al., 2012)	High Mobility Group Box 1 (HMGB1)
Kawasaki Syndrom (Ramasamy et al., 2009)	Unbekannt
Sjögren Syndrom (Ramasamy et al., 2009)	Unbekannt
Herzinsuffizienz (Willemsen et al., 2012)	Advanced Glycation End Products (AGEs)
Myokarditis (Tikellis et al., 2008; Bangert et al., 2016)	Advanced Glycation End Products (AGEs) High Mobility Group Box 1 (HMGB1)
Myokardfibrose (Russo et al., 2016)	Advanced Glycation End Products (AGEs)

Im Zentrum der Signaltransduktionskaskaden, die durch RAGE-Liganden-Interaktion ausgelöst werden, befindet sich der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) (Abbildung 3). Abbildung 3 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Signalkaskaden in die RAGE involviert ist. Des Weiteren wird direkt durch die Interaktion des RAGE mit seinen Liganden die Produktion reaktiver Sauerstoffradikale (ROS) getriggert. Das Krankheitsspektrum umfasst sowohl chronische als auch akute Erkrankungen, die mit einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems assoziiert sind. Während für RAGE eine Hochregulation in den verschiedenen Krankheitsbildern beschrieben wurde, verhält sich sRAGE- invers zur RAGE-Expression. Daraus lässt sich ableiten, dass in der Pathogenese einer Erkrankung nicht nur die Expression des RAGE, sondern auch das Verhältnis zwischen RAGE und sRAGE eine entscheidende Rolle spielt. Wie oben bereits erwähnt bindet sRAGE Liganden im Blut und neutralisiert diese, bevor sie sich mit dem membranständigen Rezeptor verbinden können. Es konnte in präklinischen Studien gezeigt werden, dass rekombinantes sRAGE eine erfolgreiche Behandlungsoption bei RAGE-vermittelten Krankheiten darstellt. Krankheiten, für die dies bereits gezeigt wurde, sind unter anderem Kollagen-induzierte Arthritis, diabetische Atherosklerose und Myokardischämie (Bucciarelli et al., 2002; Bucciarelli et al., 2006; Aleshin et al., 2008; Schmidt et al., 2001). Selejan et al. konnten zeigen, dass während des akuten Myokardinfarktes die aktive MMP-9 zur RAGE-Abspaltung und sRAGE-Freisetzung beiträgt, während die MMP-9-Aktivität im kardiogenen Schock supprimiert ist (Selejan et al., 2017).



**Abbildung 3: Signaltransduktionskaskaden des RAGE**

Die Vielzahl der Signalkaskaden (MAPK, ERK1/2, Jak/STAT, PI3K, RhoGTPase) und der dadurch transkribierten Zielgene (z.B. CAMs, VEGF, TNF- $\alpha$ , IL-6), die durch die Bindung der Liganden an RAGE aktiviert werden, impliziert, dass die Muster der unterschiedlichen Liganden für verschiedene Signalwege bzw. Zielgene verantwortlich sind (Bierhaus et al., 2005). Sowohl das Muster der RAGE-Liganden als auch die Chronizität mit der die Signale übermittelt werden, spielen eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung der Signalkaskaden in den Zellen. (Modifiziert nach Vazzana et al., 2009).

## 2.1.4 Ausgewählte RAGE-Liganden und deren pathogenetische Relevanz

### CML (N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin)

CML ist eines der wichtigsten und am besten erforschten AGEs und entsteht wie in Abbildung 5 (s. Kap. 2.2.1) beschrieben, durch die sog. Maillard Reaktion. Außer in Plasma und Urin ist es auch in verschiedenen Geweben vorhanden (Reddy et al., 1995; Nguyen et al., 2016). Die Immunlokalisation des CML in Haut, Lunge, Herz, Nieren, Gastrointestinaltrakt, Bandscheiben und vor allem in Arterien impliziert, dass die Akkumulation des CML in den jeweiligen Geweben altersabhängig zunimmt und dieser Prozess bei Diabetes mellitus beschleunigt wird (Schleicher et al., 1997). CML könnte als Biomarker für den oxidativen Stress, dem das jeweilige Gewebe ausgesetzt ist, fungieren (Baynes et al., 1991; Fu et al., 1992). Die altersabhängige Zunahme von CML korreliert mit der Schwere der diabetischen Spätkomplikationen, wie zum Beispiel der Retino- und Nephropathie. Dies weist darauf hin, dass Glycoxidationsreaktionen und oxidativer Stress eine entscheidende Rolle in der Pathogenese diabetischer Spätkomplikationen spielen (Dyer et al., 1993; Sell et al., 1992; Mccance et al., 1993). Baumann et al. konnten zeigen, dass CML während der Entwicklung einer arteriellen Hypertonie in den proximalen Tubuli der Nieren unabhängig von dem Grad der Nephropathie oder dem oxidativen Stress akkumuliert. Da die Nieren eine zentrale Rolle in der Pathogenese der arteriellen Hypertonie spielen, könnte CML dadurch zur Pathogenese dieser beitragen, indem es eine Inflammation der Nieren induziert (Baumann et al., 2008).

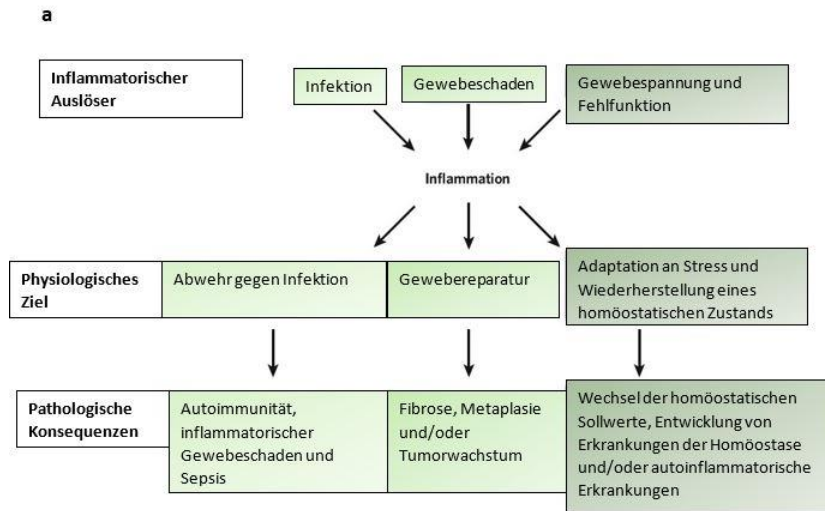
### HMGB1 (High Mobility Group Box 1)

HMGB1 ist ein nukleäres Protein, das in allen kernhaltigen eukaryotischen Zellen vorhanden ist (Lotze et al., 2005). Seine Funktion besteht in der Bildung stabiler Nukleosome, zudem fungiert es als Transkriptionsfaktor-ähnliches Protein, welches die Expression verschiedener Gene reguliert (West et al., 2004; Park et al., 2003; Stros et al., 2002). Es ist auch bekannt, dass HMGB1 unter anderem von aktivierten Makrophagen als Antwort auf Gewebeschäden, Infektion und Inflammation sezerniert wird und somit als Entzündungsmediator fungiert (Lotze et al., 2005; Wang et al., 1999). Die Freisetzung in den Extrazellulärraum erfolgt entweder passiv aus nekrotischen Zellen, oder aktiv, wobei sich verschiedene Signaltransduktionsmechanismen anschließen (Wang et al., 1999; Tsung et al., 2007; Scaffidi et al., 2002; Gardella et al., 2002). Im Extrazellulärraum kommt es durch die Interaktion von HMGB1 mit RAGE unter anderem zu Leukozytenadhäsion und Rekrutierung weiterer Immunzellen (Chavakis et al., 2004; Chavakis et al., 2003; Treutiger et al., 2003; Huang et al.,

2012; Fiuza et al., 2003). Ein Zustand der subklinischen lokalen und systemischen Inflammation liegt z.B. bei Übergewicht vor, indem Cytokine sezerniert werden, HMGB1 durch nekrotische Adipozyten freigesetzt wird und somit Leukozyten angelockt werden (Feng et al., 2016; Wagner et al., 2014; Rockenfeller et al., 2010). Ergebnisse von Shimizu et al. weisen darauf hin, dass HMGB1 bei Patienten mit metabolischem Syndrom als Adipokin fungiert und somit zur Pathogenese der Adipositas beiträgt (Shimizu et al., 2016; Zhang et al., 2017). Diese Verbindung zwischen Inflammation des Fettgewebes und Insulinresistenz spielt eine Schlüsselrolle in der frühen Phase der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 (Wang et al., 2016). Zudem konnte ein Zusammenhang zwischen HMGB1 und diabetischen Spätkomplikationen gesehen werden (Wang et al., 2016). Dies legt nahe, dass HMGB1 durch den NFκB- Signalweg eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Insulinresistenz spielt (Wang et al., 2016). Zusätzlich verstärkt die funktionelle Verbindung zwischen HMGB1 und RAGE die Inflammation im Verlauf der Entwicklung des Diabetes mellitus Typ 2, wodurch die Insulinresistenz und die Inflammation der Inselzellen des Pankreas unterhalten werden (Wang et al., 2016).

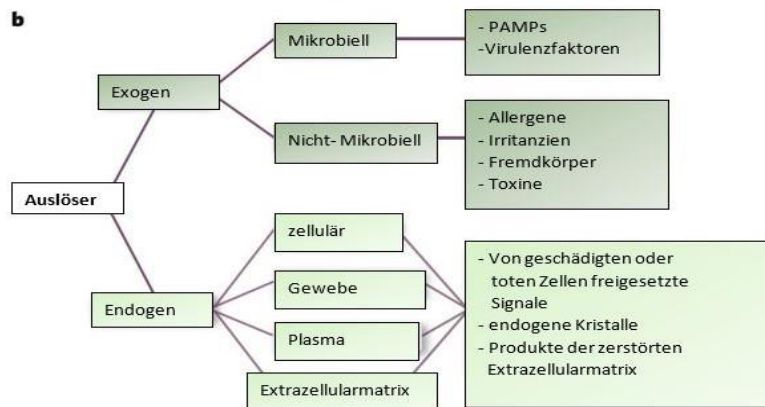
## 2.2 Angeborenes Immunsystem und Inflammation

Das angeborene (primäre) und das erworbene (sekundäre) Immunsystem bilden zusammen ein komplexes System aus Zellen und Molekülen, die der Abwehr des Organismus vor Krankheitserregern und anderen Fremdstoffen dient (Löffler et al., 2014). Das Immunsystem ist mit einer Kumulation im lymphatischen Gewebe über den gesamten Organismus verteilt (Murphy et al., 2011). Bei Versagen der angeborenen Abwehr kommt es zu einer Ausbreitung des Erregers, welche mit einer Entzündungsreaktion vergesellschaftet ist. Die zellulären Bestandteile umfassen polymorphkernige neutrophile Leukozyten (neutrophile Zellen) und mononukleäre Leukozyten (Monozyten), die zu einkernigen Phagozyten (Makrophagen) heranreifen. Eine Inflammation kann sowohl exogen als auch endogen verursacht sein (Abbildung 4). Im Rahmen einer Inflammation vergrößert sich der Gefäßdurchmesser und Endothelzellen werden aktiviert, mit der Folge, dass durch den verlangsamten Blutfluss und durch das aktivierte Endothel Immunzellen daran anhaften können und durch die Durchlässigkeit des Endothels die Extravasation ins betroffene Gewebe möglich ist. Von Entzündungsmediatoren angelockt, erreichen neutrophile Granulozyten, Monozyten, eosinophile Granulozyten und Lymphozyten den Infektionsherd (Murphy et al., 2011).



**Abbildung 4a: Pathophysiologie der Inflammation**

**a) Ursachen, physiologische und pathologische Folgen der Inflammation.** Ob der Ausgang der Inflammation physiologisch oder pathologisch ist, hängt von der Art des Triggers ab. Es gibt drei große Kategorien an Auslöser für die Inflammation: Infektion, Geweschaden oder Fehlfunktion des Gewebes. (Modifiziert nach Medzhitov et al., 2008).



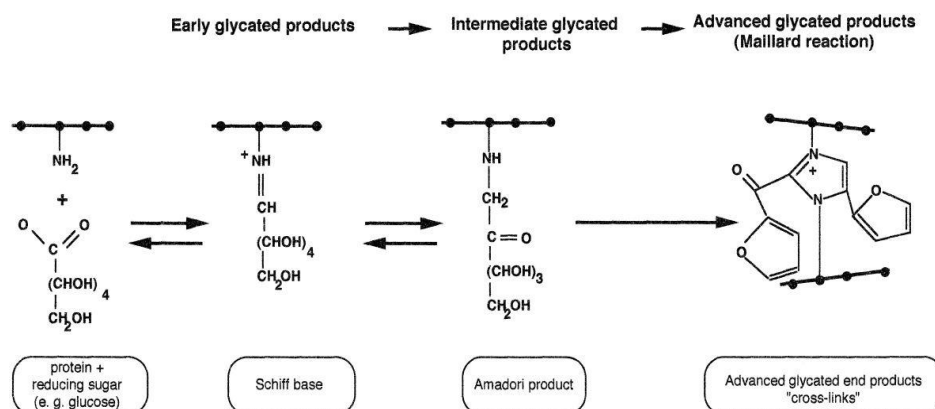
**Abbildung 4b: Pathophysiologie der Inflammation**

**b) Übersicht über Auslöser der Inflammation.** Diese können weiter in exogen und endogen eingeteilt werden. (Modifiziert nach Medzhitov et al., 2008).

### 2.2.1 Rolle des RAGE bei akuter und chronischer (subklinischer) Inflammation

Endogene Auslöser der Inflammation sind Signale, die durch gereiztes oder geschädigtes Gewebe produziert werden. Akut geschädigtes Gewebe wird als solches erkannt, indem gewebeständige Zellen, oder intrazelluläre Moleküle, aus diesem losgelöst und somit detektiert werden. Ein besonders wichtiges Beispiel ist abgestorbenes Gewebe, das von Zellmembranen, Epithel und Endothel umgeben ist. Während der Nekrose wird die

Zellmembran geschädigt, mit konsekutiver Freisetzung unter anderem  $K^+$ , HMGB1 und S100-Proteine. Letztere beiden sind Liganden des RAGE, welcher eine Entzündungsreaktion hervorruft. Die Informationen über den Gewebeschaden erreichen das Nervensystem über Aktivierung der Nozizeptoren durch das freigesetzte ATP. Endogene Auslöser, die für den Zustand einer chronischen Inflammation verantwortlich sind, sind zum Beispiel Calcium-Pyrophosphat-Dihydrat-Kristalle, oxidierte Lipoproteine und AGEs. Die Entstehung der AGEs ist auf die Maillard Reaktion zurückzuführen. Dabei kommt es zu einer nicht-enzymatischen Reaktion von Aminosäuren mit reduzierenden Zuckermolekülen. Im ersten Schritt werden reduzierende Zuckermoleküle unter Abspaltung von Wasser mit Aminogruppen von Makromolekülen verbunden, dabei entsteht eine Schiff'sche Base. Durch intramolekulare Umlagerung kommt es zur Bildung eines Amadori Produkts. Weitere Umlagerungen führen zur irreversiblen Bildung von AGEs (Bierhaus et al., 1998). Diese akkumulieren vor allem unter hyperglykämischen und pro-oxidativen Bedingungen, wie sie beim Diabetes mellitus Typ 1, Typ 2 und beim metabolischen Syndrom zu finden sind. Auch hier spielt RAGE eine Schlüsselrolle bei der Initiierung der Inflammation, da er AGEs bindet und eine Entzündungsreaktion triggert (Medzhitov et al., 2008).



**Abbildung 5: Bildung der AGEs (Advanced Glycation End Products) durch die Maillard Reaktion**

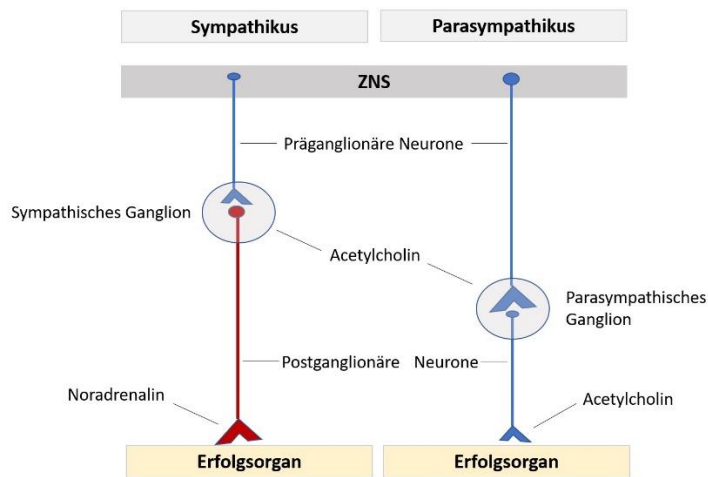
Im ersten Schritt werden reduzierende Zuckermoleküle unter Abspaltung von Wasser mit Aminogruppen von Makromolekülen verbunden. Dabei entsteht eine Schiff'sche Base. Durch intramolekulare Umlagerung kommt es zur Bildung eines Amadori Produkts. Weitere Umlagerungen führen zur irreversiblen Bildung von AGEs, die zu einer Quervernetzung von Aminogruppen führen können. (Bierhaus et al., 1998).



## 2.3 Sympathoadrenerges System

### 2.3.1 Anatomie und Physiologie des vegetativen Nervensystems

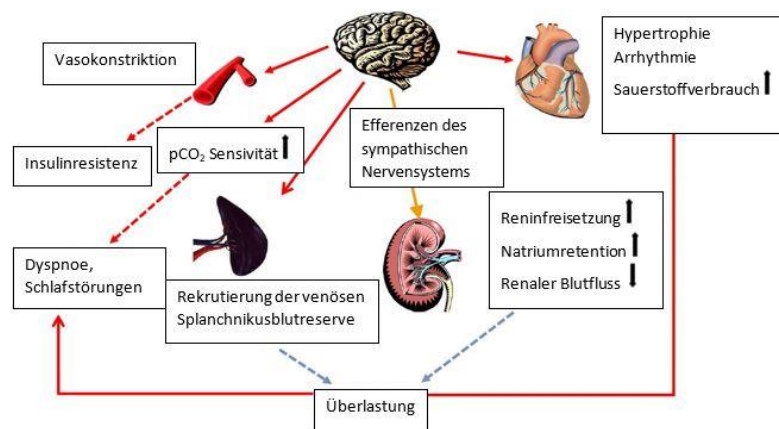
Das sympathoadrenerge System ist ein Teil des vegetativen Nervensystems und besteht sowohl aus einem efferenten als auch aus einem afferenten Schenkel (Schünke et al., 2009). Über die postganglionären Neurone erreichen die Signale des ZNS die peripheren Organe und entfalten die Effekte des Sympathikus. Abbildung 6 zeigt, dass der für die Umschaltung in den Ganglien verantwortliche Neurotransmitter Acetylcholin ist, während an den Erfolgsorganen (mit Ausnahme der Schweißdrüsen) das Katecholamin Noradrenalin als Neurotransmitter wirkt (Schünke et al., 2009). Die adrenergen Rezeptoren an den Erfolgsorganen sind metabotrope G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Behrends et al., 2010). Sie werden in zwei große Gruppen unterteilt, die  $\alpha$ - und die  $\beta$ -Adrenorezeptoren. Während die  $\alpha$ -Adrenorezeptoren weiter in  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  eingeteilt werden, bilden die  $\beta$ -Adrenorezeptoren drei Untergruppen ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ). Zusätzlich zur Regulation der Herz-Kreislauffunktionen spielen die Adrenorezeptoren auch bei wichtigen Stoffwechseleffekten des Sympathikus eine wichtige Rolle. So wird die Glukoneogenese und die Lipolyse über  $\beta_2$ -Adrenorezeptoren gefördert, während über die  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren die Insulinsekretion gehemmt wird (Behrends et al., 2010).



**Abbildung 6: Neurotransmitter im vegetativen Nervensystem**

Für die Umschaltung vom 1. auf das 2. Neuron ist der Neurotransmitter sowohl im sympathischen als auch im parasympathischen Nervensystem Acetylcholin. Für den Parasympathikus fungiert Acetylcholin auch bei der Übertragung auf die Erfolgsorgane als Neurotransmitter, während der Sympathikus hierfür Noradrenalin als Neurotransmitter hat. Dies führt an den Erfolgsorganen zu den unterschiedlichen Effekten. (Modifiziert nach Schünke et al., 2009).

Bei vermehrter Stimulation des  $\beta$ -adrenergen-Systems und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems kann es am Herzen unter anderem zu einer Herunterregulation und Desensibilisierung der  $\beta_1$ -Adrenorezeptoren sowie zur Entwicklung einer Fibrose kommen (Böhm et al., 1988; Weber et al., 1992). Diese Herunterregulation der  $\beta$ -Adrenorezeptoren bei dauerhaft erhöhtem Sympathikotonus hat zur Folge, dass das Myokard weniger auf Katecholamine anspricht (Böhm et al., 1990). Diese Prozesse führen auf Dauer zur Entwicklung und zum Fortschreiten einer bereits bestehenden Herzinsuffizienz. Dabei korrelieren die verringerte Anzahl der  $\beta$ -Adrenorezeptoren und das Abnehmen der positiv inotropen Effekte der Katecholamine mit der Schwere der Herzinsuffizienz (Böhm et al., 1988). Die Nieren spielen eine zentrale Rolle in der Regulation des Blutdrucks. Durch Efferenzen des Sympathikus wird die Reninfreisetzung mit konsekutiver Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems initiiert. Durch von den Nieren ausgehenden Afferenzen wiederum werden Signale an das ZNS übermittelt, die zu einer Aktivierung des Sympathikus beitragen (Mahfoud et al., 2019). Abbildung 7 gibt einen Überblick über den Teufelskreis, der sich bei erhöhtem Sympathikotonus zwischen ZNS, Nieren und Herz einstellt.

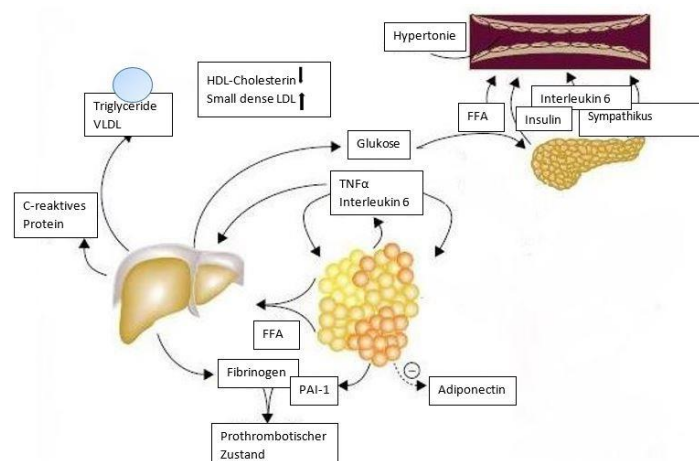


**Abbildung 7: Circulus vitiosus der sympathoadrenergen Überaktivität**

Pathophysiologische Interaktion zwischen ZNS, Herz und Niere bzw. peripheren Organen durch Efferenzen und Aufrechterhaltung bzw. Verstärkung der Sympathikus-Aktivität durch Afferenzen. (Modifiziert nach Böhm et al., 2014).

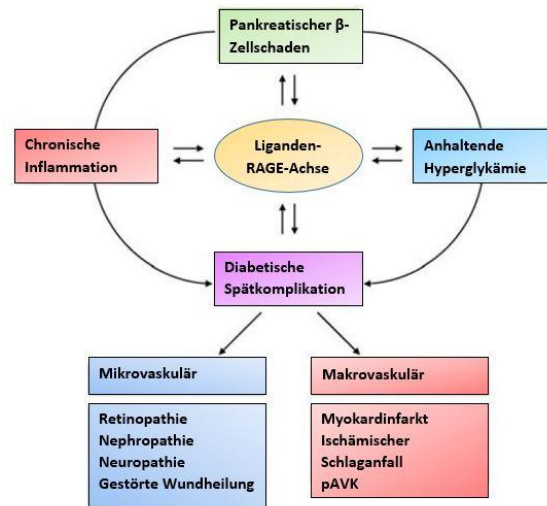
### 2.3.2 Metabolisches Syndrom und arterielle Hypertonie

Das metabolische Syndrom wird von der WHO als eine Konstellation kardiovaskulärer Risikofaktoren definiert, dessen Charakteristika Adipositas, Insulinresistenz, Hyperlipidämie und Hypertonie umfassen. Es stellt eines der größten Gesundheitsrisiken der heutigen Zeit dar (Saklayen et al., 2018). Patienten mit metabolischem Syndrom haben ein zweifach höheres Risiko für Herz-Kreislauferkrankungen und ein fünffach erhöhtes Risiko einen Diabetes mellitus Typ 2 zu entwickeln (Gupta et al., 2010). Pathogenetisch spielt vor allem das abdominelle Fettgewebe eine zentrale Rolle, welches unter anderem einen proinflammatorischen Zustand generiert, welcher wiederum die oben genannten Pathologien wie Dyslipidämie, Insulinresistenz und Atherosklerose begünstigt (Gupta et al., 2010). Abbildung 8 zeigt schematisch die pathophysiologischen Prozesse, die zur Entstehung und Aufrechterhaltung der Inflammation beim metabolischen Syndrom führen. Die Rolle des RAGE im Zusammenhang mit subklinischer Inflammation, wie er sich in zahlreichen Erkrankungen wie zum Beispiel bei Diabetes mellitus und Atherosklerose wiederfindet, zeigt Abbildung 9.



**Abbildung 8: Pathophysiologie des metabolischen Syndroms**

Endokrine und parakrine Effekte tragen neben den FFA (free fatty acids) zu einem proinflammatorischen Zustand bei. Die verstärkte Sekretion von, unter anderem, IL-6 (Interleukin-6) und TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ), die von einer Vielzahl an Zellen im Fettgewebe, inklusive Fettzellen und Makrophagen produziert werden, führt zu einer vermehrten Insulinresistenz und die Lipolyse von Triglyceriden zu FFA. IL-6 und andere Zytokine fördern die hepatische Glucose- und VLDL (Very-Low-Density-Lipoprotein) - Produktion sowie die Insulinresistenz im Muskel. Zytokine und FFA steigern die Produktion von Fibrinogen und PAI-1 (Plasminogen-activator-inhibitor 1) in der Leber. Dies führt zu einem pro-thrombotischen Zustand. Die verminderte Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins Adiponektin ist ebenfalls mit dem metabolischen Syndrom assoziiert und könnte zu dessen Pathophysiologie beitragen. (Modifiziert nach Eckel et al., 2005).



**Abbildung 9: Die zentrale Rolle des RAGE in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes mellitus**

Die Beteiligung des RAGE an der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1 umfasst die autoimmune Zerstörung der  $\beta$ -Zellen und die chronische Inflammation, die nicht zuletzt von erhöhten Blutzuckerspiegeln aufrechterhalten wird. Diese Veränderungen führen schließlich zu mikro- und makrovaskulären Komplikationen. (Modifiziert nach Vazzana et al., 2009).

Die arterielle Hypertonie ist definiert als systolischer Blutdruck  $\geq 140$  mmHg und/oder diastolischer Blutdruck  $\geq 90$  mmHg. Die globale Prävalenz für Bluthochdruck wurde 2015 auf 1,113 Billionen geschätzt. Es stellte 2015 eine der führenden Ursachen für vorzeitige Mortalität dar. Arterielle Hypertonie wird sowohl unabhängig von als auch im Zusammenhang mit einigen kardiovaskulären Komorbiditäten (z.B. arterielle Gefäßkrankheit, ischämischer sowie hämorrhagischer Hirninsult, Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz), Vorhofflimmern und terminaler Niereninsuffizienz beschrieben. Können kausale Komorbiditäten wie zum Beispiel obstruktive Schlafapnoe, renale, renovaskuläre oder endokrinologische Grunderkrankungen identifiziert werden, spricht man von sekundärer Hypertonie. Somit kann die sekundäre Hypertonie kausal behandelt werden. Allgemeinmaßnahmen wie salzarme- und rohkostreiche Ernährung, Gewichtsreduktion, regelmäßige körperliche Betätigung und Meiden von Risikofaktoren wie Nikotin- und Alkoholkonsum stellen die Basis der Therapie der primären Hypertonie dar. In den meisten Fällen bedarf es zusätzlich medikamentöser Therapie. ACE-Hemmer, Adenosinrezeptor-Antagonisten, Betablocker, Calciumkanalblocker und Diuretika sind die fünf Hauptklassen der antihypertensiven Therapie. Zweifach-, Dreifach- und Vierfachkombinationen dieser fünf Klassen werden stufenweise zur Therapie der arteriellen Hypertonie empfohlen, wobei je nach vorliegenden Komorbiditäten unterschiedliche Kombinationen empfohlen werden. Definitionsgemäß liegt eine therapierefraktäre Hypertonie vor, wenn trotz gesicherter Compliance oben genannte Maßnahmen zu keiner Blutdruckreduktion  $\leq 140/90$  mmHg führen. Interventionelle Verfahren wie die

Barorezeptorstimulation und die renale Denervation stellen eine Behandlungsmöglichkeit der therapierefraktären Hypertonie dar (Williams et al., 2018).

### 2.3.3 Renale Sympathikusdenervation

Die renale Denervation stellt eine Möglichkeit dar, Patienten mit therapierefraktärer, primärer arterieller Hypertonie zu behandeln. Der Ansatzpunkt der Methode ist der oben beschriebene Zusammenhang zwischen sympathischen Nervenfasern und der Regulation des Blutdrucks. Bei dieser Methode werden katheterbasiert sympathische Fasern, die entlang der Nierenarterien verlaufen, mittels thermischer Energie (Radiofrequenz oder Ultraschall) ablatiert (Kara et al., 2012; Mahfoud et al., 2013; Azizi et al., 2018).

Die internationale multizentrische Symplicity-HTN-1-Studie mit 45 Patienten zeigte, dass durch die selektive renale Denervation im Vergleich zum Untersuchungsbeginn die renale Noradrenalin-spillover Rate um 47 % (n=10) abnahm. Diese Ergebnisse korrelierten mit einer signifikanten Blutdruckreduktion. Anschließend folgte die randomisierte, kontrollierte Symplicity-HTN-2-Studie, die diese Ergebnisse bei 106 Patienten bestätigte. In der Interventionsgruppe ist der systolische Blutdruck bei 84 % um mindestens 10 % abgefallen (Mahfoud et al., 2013). In der Symplicity-HTN-3-Studie wurden über 500 Patienten mit therapieresistenter Hypertonie an mehr als 80 Zentren weltweit untersucht. Bei dieser Studie wurden die Patienten randomisiert und es wurde eine Scheinbehandlung durchgeführt. In dieser Studie kam es bei der Interventionsgruppe im Vergleich zur Placebo-Gruppe zu keiner signifikanten Reduktion des systolischen Blutdrucks 6 Monate nach der renalen Denervation (Bhatt et al., 2014). Eine insuffiziente Durchführung des Verfahrens wird als eine der Ursachen für die Therapieresistenz in dieser Studie vermutet (Mahfoud et al., 2015). Derzeit gibt es noch keine etablierte Methode, um die Wirksamkeit oder die Vollständigkeit der Nervenablation während der Prozedur zu bestimmen (Mahfoud et al., 2015). Die Bestimmung der Tyrosinhydroxylase als Marker für die Aktivität des sympathischen Nervensystems wird als Biomarker zur Erfolgskontrolle der Nervenablation diskutiert (Skrzypecki et al., 2017). Eine präklinische Studie von Mahfoud et al. zeigte, dass außerdem die Lokalisation der Ablationsläsionen entscheidend für die Effektivität der Behandlung ist. Die zusätzliche Ablation der distalen Zweige der Arteria renalis - im Gegensatz zur konventionellen alleinigen Ablation der Nierenarterie - führte zu einer deutlichen Reduktion sowohl des renalen Noradrenalinspiegels als auch der Axondichte, was sich in einer geringeren Variabilität der Ansprechrate widerspiegelte (Mahfoud et al., 2015). Weiteren Publikationen ist zu entnehmen, dass die renale Denervation unabhängig von einer Blutdrucksenkung positive Einflüsse auf das kardiale Remodelling im Sinne einer Reduktion der linksventrikulären Masse und einer

Verbesserung der diastolischen Funktion hat. Ferner wurden positive Effekte auf das atriale Remodelling sowie eine Prävention von Arrhythmien beschrieben (Schirmer et al., 2014; Mahfoud et al., 2014; Schirmer et al., 2015; Ukena et al., 2012; Remo et al., 2014). Kiuchi et al. zeigten 2016, dass die renale Denervation bei Patienten mit therapieresistenter Hypertonie und chronischer Nierenkrankheit sowohl zu einer signifikanten Reduktion des Blutdrucks als auch zu einer erheblichen Reduktion der notwendigen antihypertensiven Medikation führte. Die Intervention ging mit einem Anstieg der eGFR und einer Abnahme der renalen Albuminsekretion einher (Kiuchi et al., 2016). In der internationalen, multizentrischen, einfach verblindeten, randomisierten, scheinkontrollierten SPYRAL HTN-OFF MED-Studie wurden 353 Patienten untersucht. Dabei erfolgte der Vergleich einer renal denervierten Gruppe mit einer Schein-denervierten Gruppe unter Auslassen der antihypertensiven Medikation. Hierbei konnte die Wirksamkeit des Eingriffs anhand der signifikanten Reduktion des Blutdrucks sowohl im ambulanten als auch im klinischen Setting bis zu drei Monaten nach dem Eingriff nachgewiesen werden (Townsend et al., 2017). Ähnliche Ergebnisse wurden durch Kandzari et al. in der praxisnah-gestalteten SPYRAL HTN-ON MED-Studie demonstriert. Hierbei wurde die antihypertensive Medikation in beiden Gruppen beibehalten. Sowohl der ambulant als auch der klinisch gemessene Blutdruck konnte durch den Eingriff in einem zeitlichen Verlauf bis zu 6 Monaten signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe anhaltend gesenkt werden (Kandzari et al., 2018). Die oben genannten Ergebnisse demonstrieren hauptsächlich die Effektivität der Prozedur, während die im Folgenden zitierten Arbeiten die Sicherheit des Verfahrens untersuchen. Kulenthiran et al. zeigten 2017, dass die kathetergestützte renale Sympathikusdenervation einen sicheren Behandlungsansatz darstellt, um die Sympathikusaktivität beim therapieresistenten arteriellen Hypertonus zu reduzieren (Kulenthiran et al., 2017). Des Weiteren belegt eine aktuelle Auswertung des prospektiven „Global Symplicity“-Registers die Sicherheit und Effektivität der renalen Denervation über drei Jahre nach dem Eingriff (Mahfoud et al., 2019).

## 2.4 Fragestellung

Neuere Untersuchungen implizieren, dass eine Überaktivität des sympathoadrenergen Systems sowohl bei etablierter chronischer Inflammation als auch im Gesunden die Homöostase zugunsten der Inflammation beeinflusst, so z.B. bei arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus und metabolischem Syndrom. Die im Einzelnen für diese sympathoadrenerge Immunomodulation verantwortlichen Faktoren sind größtenteils noch nicht untersucht. Die vorliegende Arbeit untersucht die potenziell sympathoadrenerg-vermittelte Regulation des pro-inflammatorisch wirkenden RAGE und seines Gegenspielers sRAGE in vivo und in vitro. Wir verwendeten in vivo ein Modell für das metabolische Syndrom,

die spontan hypertensive obese Ratte (SHRob), in der wir mittels renaler Denervation eine Modulation und Suppression der sympathoadrenergen Aktivität induzierten. Bei dem Rattenmodell, welches für diese Dissertation herangezogen wurde, erfolgte nach medianer Laparotomie die renale Denervation chirurgisch mit mechanischer und chemischer Elimination der sympathischen Afferenzen und Efferenzen der Nierenarterien. Das Vorgehen wird ausführlich im Material- und Methodenteil beschrieben.

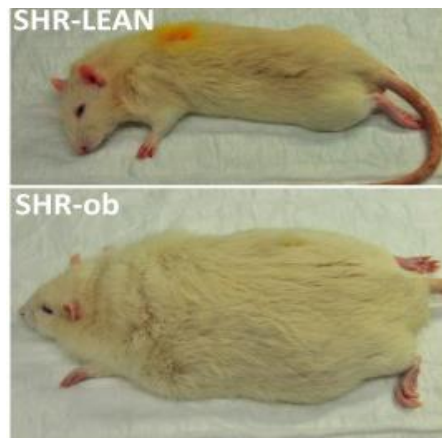
Der sRAGE-Serumgehalt und die Expression des RAGE und seiner Liganden HMGB1 und CML in Herz- und Nierengewebe wurden in renal denervierten spontan hypertensiven obesen Ratten (SHRobRDN) und in Sham-operierten spontan hypertensiven obesen Ratten (SHRob) verglichen zu schlanken spontan hypertensiven Ratten (SHR) und Sprague-Dawley-Kontrollratten (Kontrolle) untersucht. Der fibrotische Organumbau wurde mittels Piko-Siriusrot-Färbungen an Paraffin-Schnitten analysiert. Um rein blutdruckabhängige Effekte auf die RAGE/sRAGE-Regulation auszuschließen, führten wir In-vitro-Untersuchungen an humanen PBMCs, Ratten-Splenozyten, an frisch isolierten kardialen sowie renalen Fibroblasten und an HEK-Zellen durch. Die Zellen wurden mittels Isoproterenol, einem  $\beta_1+\beta_2$ -Adrenorezeptor-Agonisten stimuliert. Zum Teil wurden die Zellen gleichzeitig mit und ohne  $\beta$ -Adrenorezeptor-spezifischer Blockade behandelt. Anschließend wurde die membranöse RAGE-Expression und die sRAGE-Ausschüttung untersucht. Ein besseres Verständnis der RAGE-regulierenden Mechanismen könnte zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze zur Behandlung RAGE-assoziiierter Erkrankungen wie dem metabolischen Syndrom beitragen.

## 3.0 Material

### 3.1 Rattenmodell

Um die Einflüsse des Katecholaminspiegels auf die Regulation des RAGE und sRAGE zu untersuchen, wurde das in vivo Modell der spontan hypertensiven obesen Ratte (SHRob) genutzt. Als in vivo Modell für das metabolische Syndrom dienten männliche spontan hypertensive, obese (SHRob) und männliche spontan hypertensive schlanke Ratten (SHR). Als Kontrolltiere wählten wir normotensive, schlanke Sprague-Dawley-Ratten (Kontrolle). Den Unterschied des äußeren Phänotyps zeigt Abbildung 10. Die Ratten wurden von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) im Alter von 10 Wochen erworben. Um den Katecholaminspiegel systemisch zu senken, wurde bei 5 der SHRob im Alter von 32 Wochen die renale Denervation durchgeführt, während die verbliebenen 5 SHRob einen Placeboeingriff erhielten. Die renale Denervation wurde zu einem Zeitpunkt durchgeführt, an dem das metabolische Syndrom und die Nephropathie noch nicht vollständig ausgebildet waren. Somit ergaben sich vier Gruppen: die schlanken, normotensiven Kontrollratten (Kontrolle, n=5), die schlanken, spontan hypertensiven Ratten (SHR, n=6), die übergewichtigen, spontan hypertensiven Ratten mit Placebo-Eingriff (SHRob, n=5) und die renal denervierten, übergewichtigen, spontan hypertensiven Ratten (SHRobRDN, n=5). Alle Tiere wurden in Standard-Käfigen untergebracht, erhielten Standard-Futter (standard diet No. 1320; Altonium, Lage, Deutschland) und Leitungswasser ad libitum. Die Ratten wurden im Alter von 45 Wochen geopfert. Die Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit den Bestimmungen der nationalen Leitlinien für Pflege und Nutzung von Labortieren sowie dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. (Linz et al., 2012). Alle Rattenmodelle (Sprague-Dawley-Kontrollen, SHR, SHRob) wurden im Institut für Herz-Kreislauf-Forschung der Sanofi-Aventis Deutschland GmbH (Diabetes Division and Biomedicine, Industriepark Höchst, 65926 Frankfurt, Germany) gezüchtet. Die operativen Eingriffe (Renale Denervation, Placeboeingriff, Implantation der Telemetriesonden zur invasiven Blutdruckmessung, Implantation des Millar Tip Katheters zur Messung des linksventrikulären Drucks) sowie die kardiofunktionelle, laborchemische und metabolische Charakterisierung wurden von den Mitarbeitern von Sanofi-Aventis durchgeführt (s. Tabelle 10). Die kardialen und renalen Gewebeproben wurden uns zur weiteren Charakterisierung im Rahmen dieser Doktorarbeit zur Verfügung gestellt.





**Abbildung 10: Äußerer Phänotyp von schlanken, spontan hypertensiven Ratten (SHR) und spontan hypertensiven, obesen Ratten (SHRob). (Linz et al., 2012)**

### **3.2 Rattengewebe zur Isolation mononukleärer Zellen aus der Milz und Fibroblastenisolation aus Herz und Niere**

Für die Isolation von mononukleären Zellen aus der Milz sowie renale und kardiale Fibroblasten wurden 12 Monate alte Sprague-Dawley Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Tötung der Ratten erfolgte durch rasche Entnahme der Herzen unter tiefer Narkose (Rompun/Ketavet).

### **3.3 Human Embryonic Kidney 293 (HEK) – Zelllinie**

Die eukaryotische HEK-Zelllinie stammt von transformierten menschlichen embryonalen Nierenzellen ab. Durch ihre Eigenschaft adhärenz zu wachsen können diese besonders gut kultiviert werden. Für unsere Experimente wurden diese von Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) erworben.

### 3.4 Verwendete Substanzen

**Tabelle 2: Chemikalien, Zellkulturmedien und Reaktionskits**

Substanz	Firma
293 Cell Line human; 85120602 from human kidney	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Acrylamid/Bis Solution 29:1, 30 %	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules
Agarose Ultrapure Elektrophoresis	Gibco, Life technologies
Ammoniumpersulfat	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Aqua ad injectabile	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Biocoll Separating Solution	Biochrom GmbH, Berlin
BSA, 7,5 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Cacodylic acid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Calciumchlorid, 0,1 M	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
CGP (20712A)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Collagenase, 2 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
DAPI (4,6-Diamidinon-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
DCTM Protein Assay Reagenz A	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)
DCTM Protein Assay Reagenz B	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)
DEPC-H2O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Diethylpyrokarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dispase I	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dithiorethiol (DTT), 1M	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
DMEM Nährmedium	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
DNase I, RNase free (PeqLab)	VWR Life Science, Erlangen
ECL	GE Healthcare GmbH, Solingen
Entwickler G 153 für Curix 60 A	Agfa, Mortsel, Belgien
Entwickler G 153 für Curix 60 B	Agfa, Mortsel, Belgien
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	VWR International GmbH, Darmstadt
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
FKS (Fetales Kälberserum)	Gibco-Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Gelatine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glycin	Fluka
HighCap cDNA RT Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
ICI (118551)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isoproterenol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Krebs HEPES Buffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Leupeptin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
M 199+ Glutamax Nährmedium	Gibco-Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Magermilchpulver	TSI GmbH & Co. KG, Zeven

Methanol	VWR International GmbH, Darmstadt
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumbicarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS), 10 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Omniscript Reverse Transcription Kit 200	Quiagen
Penicillin/ Streptomycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
PeqGOLD Trifast	PeqLab, Erlangen
Phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF), 0,1mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ponceau S Solution	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Primer für RT PCR	Applied Biosystems
Rainbow Marker	Amersham
Recombinant RNAsin Ribonuclease Inhibitor	Promega GmbH, Mannheim
RPMI-Nährmedium 1640	Gibco-Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Saccharose	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
TaqMan GenEx Mastermix (No. 4369016)	Applied Biosystems
Tris (base), 1M	VWR International GmbH, Darmstadt
Tris, 1 M pH 6,8	VWR International GmbH, Darmstadt
Triton X-100 Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trypsin, 2,5 %	Gibco-Life Technologies GmbH, Darmstadt
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Western Blocking Solution	Roche, Mannheim
Zinkchlorid	Merck, Darmstadt

### 3.5 Verwendete Antikörper

#### 3.5.1 Verwendete Antikörper für Western Blot

**Tabelle 3: Primäantikörper für Western Blot**

Name	Ziel	Ursprung	Spezies	Firma	Cat.No	Verdünnung
anti-RAGE polyklonaler Antikörper	RAGE	rabbit	Human, mouse, rat, cow	Abcam, Cambridge, UK	ab 37647- 200	1:1000
anti-GAPDH monoklonaler Antikörper	GAPDH	mouse	Human, mouse, rat, rabbit, cat, dog, fish	EMD Millipore	MAB 374	1:5000

Name	Ziel	Ursprung	Spezies	Firma	Cat.No	Verdünnung
anti-HMGB1 polyklonaler Antikörper	HMGB1	rabbit	Human, mouse, rabbit	Abcam, Cambridge, UK	ab 18256- 100	1:1000
anti-CML monoklonaler Antikörper	CML	mouse	independent	Abcam. Cambridge, UK	ab 27684	1:2000

**Tabelle 4: Sekundärantikörper für Western Blot**

Name	Entwickelt in	Firma	Cat.No.	Verdünnung
anti-Mouse IgG (whole molecule) - Peroxidase	goat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	A5278- 1ML	1:10.000
anti-Rabbit IgG (whole molecule) - Peroxidase	goat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	A9169- 2ML	1:10.000

### 3.5.2 Verwendete Antikörper für Immunfärbungen

**Tabelle 5: Primärantikörper für Immunfärbungen**

Name	Firma	Cat.No.	Verdünnung
Rabbit-polyclonal-anti- Fibronectin-IgG	abcam	ab23750	1:30
Rabbit-polyclonal-anti- $\alpha$ - Glattmuskelaktin-IgG	abcam	ab9694	1:100

**Tabelle 6: Sekundärantikörper für Immunfärbungen**

Name	Firma	Cat.no.	Verdünnung
Anti-Rabbit-IgG-TRITC	abcam	ab6718	1:30

### 3.6 Verwendete Puffer

#### 3.6.1 Puffer für Western Blot Analyse

##### Laufgel: 12 % (10 ml)

Aqua dest. 3,3 ml, 30% Acrylamid-Mix 4,0 ml, 1,5 M Tris (pH 8.8) 2,5 ml, 10 % SDS 0,1 ml, 10 % Ammonium Persulfat 0,1 ml, TEMED 0,004 ml

##### Sammelgel (2 ml):

Aqua dest. 1,4 ml, 30 % Acrylamid-Mix 0,33 ml, 1,0 M Tris (pH 6.8) 0,25 ml, 10 % SDS 0,02 ml, 10 % Ammonium Persulfat 0,02 ml, TEMED 0,002 ml

##### Elektrophorese-Puffer 10x:

Glycin 720 g, Tris 151,5 g, SDS 50 g, auf 5 l mit Aqua dest. auffüllen  
Zum Gebrauch 1:10 mit Aqua dest. verdünnen.

##### Transferpuffer:

Tris 2,9 g (= 25 mM), Glycin 14,5 g (= 190 mM), Methanol (= 20 %) 200 ml, Aqua dest. ad 1000 ml; pH auf 8,3 einstellen.

1. Substanzen abwiegen 2. Aqua dest. vorlegen 3. Methanol dazugeben 4. pH auf 8,3 einstellen 5. auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen.

##### Ladepuffer (1x):

Glycerol 2,0 ml, 10 % SDS 2,0 ml, Stacking Gel Buffer 2,5 ml, Aqua dest. 3,0 ml, Bromphenol Blau 0,25 mg

Jeweils vor Gebrauch frisch 50 µl 1 M Dithiothreitol + 950 µl Ladepuffer mischen.

##### 10x PBS:

NaCl 80 g, KCl 2 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,4 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 14,4 g, Aqua dest. 900 ml, dann mit KOH auf pH 7,4 einstellen, auf 1000 ml mit Aqua dest. Auffüllen.

##### Stripping Buffer:

1 M Tris-HCl pH 6,8, 10 % SDS, 0,7 % β- Mercaptoethanol

##### Blocking Reagent:

1x PBS 49,5 ml, Western blocking Solution 0,5 ml

### 3.6.2 Puffer für Zellkultur

#### Hypotonic buffer:

0,25 M Tris base 2,5 ml; 0,25 M EDTA 0,5 ml; 0,1 M MgCl<sub>2</sub> 0,625 ml; auf 125 ml mit Aqua dest. auffüllen.

Zusätze: In 1 ml Hypotonic Buffer: Aprotinin 2,9 µl; PMSF 10 µl, Leupeptin 1 µl

#### Extraktionspuffer:

10 mM Cacodylic acid 0,8 g, 150 mM NaCl 4,4 g, 1 µM ZnCl<sub>2</sub> 68,2 µg, 20 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1,47 g, 1,5 mM NaN<sub>3</sub> (Natriumazid) 48,8 mg, 0,01 % Triton X-100 50 µl, 500 ml Aqua dest, auf pH 5,0 einstellen.

## 3.7 Primer für Real-Time-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

*Tabelle 7: Oligonukleotidsequenzen und -schmelztemperaturen*

Oligonukleotidname	Sequenz 5' → 3'	Tm [°C]
Ratte RAGE forward primer	CAACCCAGACTCGAGGAGAG	61,4
Ratte RAGE reverse primer	CTGAAGGAGACAGGGTTTGC	59,4
18S forward primer	TTGATTAAGTCCCTGCCCTTTGT	58,9
18S reverse primer	CGATCCGAGGGCCTAACTA	61,0

## 3.8 Sonstiges

*Tabelle 8: Geräte, Verbrauchsmaterial, Software*

Geräte/Software	Firma
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare GmbH, Solingen
Biofuge pico Heraeus	Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts USA
CK2 inverted Microscope	Olympus, Hamburg
CO <sub>2</sub> -Inkubator Heraeus Heracell 150	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Deckplatten	VWR International, Darmstadt
DU 730 Life Science Spectrophotometer	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Elektrophoresekammer Mini PROTEAN 3cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)
Entwicklerautomat Curix 60	Agfa, Mortsel, Belgien
Eppendorf Reaktionsgefäß 0,5ml, 1,5ml, 1,0ml	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht

## Material

---

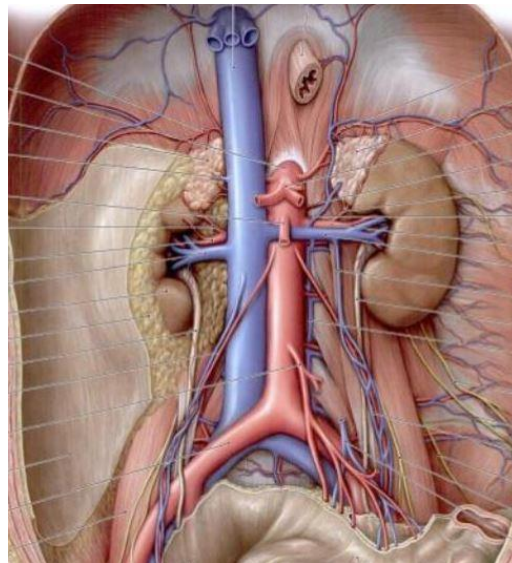
Eppendorf Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorfgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorfgefäße für PCR	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht
Falcon, Blue Max, 15 ml und 50 ml	Becton Dickinson, N.J., USA
Feinwaage, ABS 120-4	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Filterpapier Extra thick blot paper	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)
Gefrierschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gelgießständer	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)
Glasplatten zum Gele gießen	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)
Hamilton-Spritze	Hamilton Company, Nevada (USA)
Heizblock	HCL Laborsysteme, Aschaffenburg
Heraeus Megafuge 1.0R	Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts USA
Image Studio Light 4	LI-COR Biotechnology, Lincoln USA
Kühlzentrifuge Centri Napco 2019R	Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts USA
Magnetrührer CAT 6.1	Ingenieurbüro CAT, M. Zipperer GmbH, Staufen
Lucia G	Nikon, Düsseldorf
Mikroskop Eclipse Ti-S/L100	Nikon GmbH, Düsseldorf
Nadel BSS Microlance 3	Becton Dickinson, N. J., US
NanoDrop 2000	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Nitrocellulose Membran 0,2µm	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)
pH Elektrode SenTix 22	WTW, Weilheim
pH-Meter, Eutech Instruments, pH 510 Zentrifuge Galaxy 16DH	VWR, Darmstadt
Photometer Küvetten	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht
Pipettierhilfe „Pipetboy“	INTEGRA Biosciences AG, Zizers (CH)
Pipettenspitzen 10µl, 100µl, 1000µl	Sarstedt, Nümbrecht
Plattformschüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
Powerpack	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)
SafeSeal Reagiergefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Scanner CanoScan LIDE 90	Canon
Seven compact S220 PH-Meter	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
S-Monovette 10ml Natriumcitrat	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht
Sonifier, Branson 250	Branson Ultrasonics, Danbury, USA
Spritze 1ml BD Plastipak	Becton Dickinson, N. J., US
Stabpipetten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
StepOne Software	Applied Biosystems, Waltham Massachusetts USA
StepONEPlus Real Time PCR System	Applied Biosystems, Waltham Massachusetts USA
Sterilbank Safe 2020 (Klasse II)	Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts USA
Trans Blot semi dry transfer cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)
Transferpipetten	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht
Überkopfschüttler Reax 2	VWR International GmbH, Darmstadt
Vortex Mixer VV3	VWR International GmbH, Darmstadt
Zellkulturschalen	TPP, Trasadingen, Schweiz

## 4.0 Methoden

### 4.1 In vivo Experimente

#### 4.1.1 Chirurgische renale Denervation der Ratten

Die Denervation erfolgte durch eine mediane Laparotomie unter 1,5 % - 2,5 % Isofluran Narkose und anschließender mechanischer sowie chemischer Unterbindung der sympathischen Afferenzen und Efferenzen der Hilusgefäße beider Nieren. Abbildung 11 zeigt schematisch die Lage der Harnorgane in situ nach Eröffnen der Bauchdecke. Mechanisch wurden alle sichtbaren Nervenfasern durchtrennt sowie zusätzlich 2-4 mm der Adventitia der Arteria renalis entfernt. Anschließend wurde das präparierte Areal mit einer 20 % Phenol/Ethanol Lösung 10-15 Minuten benetzt (Linz et al., 2015). Die renale Denervation der Ratten wurde von den Mitarbeitern von Sanofi-Aventis in Kooperation mit PD Dr. Dr. Linz durchgeführt.



**Abbildung 11: Lage der Harnorgane in situ zur Veranschaulichung der operativen renalen Denervation im Rattenmodell**

*Dargestellt ist die Lage der Harnorgane in situ nach medianer Laparotomie. Die Durchführung der renalen Denervation der Ratte, wird chirurgisch durchgeführt. Dabei werden die Nierenarterien frei präpariert und anschließend die sympathischen Afferenzen und Efferenzen der Hilusgefäße beider Nieren mechanisch sowie chemisch unterbunden. (Schünke et al., 2009).*



### 4.1.2 Bestimmung kardialer, metabolischer und renaler Parameter in vivo

Die im Folgenden erläuterten Daten der in vivo erhobenen Parameter wurden bereits im Vorfeld durch die Arbeitsgruppe PD Dr. Dr. Linz erhoben und wurden dieser Dissertation freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Zur Verständlichkeit der hierfür verwendeten Methodik wird in diesem Abschnitt das entsprechende Paper zitiert. Der Blutdruck wurde telemetrisch gemessen, indem am Tag der renalen Denervation bei jeweils sieben SHRobRDN, bei SHRob und Kontrollratten Telemetriesensoren implantiert wurden. Dadurch war es möglich den systolischen und diastolischen Blutdruck sowie den errechneten mittleren Blutdruck und die Herzfrequenz kontinuierlich über einen Zeitraum von vierzehn Wochen zu messen (Linz et al., 2015). Die metabolischen Parameter wurden zwei Wochen vor der renalen Denervation bestimmt. Blutproben wurden dem retroorbitalen Plexus entnommen. Zur Messung der Blutzuckerkonzentration, des glykierten Hämoglobins und des Kreatinins wurden Standardkits verwendet. Die Glomeruläre Filtrationsrate ( $GFR = \frac{\text{Kreatinin im Urin} \times \text{Urinvolumen}}{\text{Kreatinin im Plasma} \times \text{Zeit} \times \text{Körpergewicht}}$ ) wurde berechnet und die linksventrikuläre Funktion wurde mittels MRT bestimmt (Linz et al., 2015). Druckmessungen des linken Ventrikels wurden im Alter von 48 Wochen mittels Milliar Tip Katheter (Milliar Instruments, Houston, TX) durchgeführt. Die Datenaufzeichnung erfolgte digital unter Verwendung spezialisierter Software (HEM; Notocord, Croissy, France). Die erhobenen hämodynamischen Parameter beinhalteten den enddiastolischen Druck des linken Ventrikels (Linz et al., 2015).

Nach Durchführung der in-vivo-Experimente durch Mitarbeiter von Sanofi-Aventis unter Mitarbeit von PD Dr. Dr. Linz wurden uns die Organe der Tiere zur weiteren Untersuchung im Rahmen dieser Promotionsarbeit zur Verfügung gestellt.

### 4.1.3 Histologie der kardialen und renalen Gewebeproben

Nachdem die Tiere schmerzlos getötet wurden, wurden Herz und Nieren entnommen. Der Teil des linken Ventrikels, der die Papillarmuskel enthält, und ein Teil der Niere wurden für 24 Stunden in 4 % Paraformaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Aus beiden Organen wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt, diese wurden deparafinisiert und rehydriert, um anschließend mittels Piko-Siriusrot-Kollagen Färbung gefärbt zu werden. Mit dieser Methode kann die interstitielle und perivaskuläre beziehungsweise glomeruläre Fibrose dargestellt werden. Die Nierenschnitte wurden zusätzlich mittels Standard Hämatoxylin-Eosin Färbung angefärbt, um den Anteil der Glomerulosklerose sichtbar zu machen.

### Pikro-Siriusrot-Kollagenfärbung

Durch die Pikro-Siriusrot-Kollagenfärbung werden Kollagen Typ I, Typ III und Typ IV angefärbt. Bei Betrachtung unter polarisiertem Licht kann eine quantitative Messung des Kollagens erfolgen. Somit kann man Rückschlüsse auf die Menge und die Verteilung der Fibrose in Herz und Niere ziehen.

### Protokoll der Pikro-Siriusrot-Kollagenfärbung

Um die Schnitte zu entparafinieren, werden sie für 3 x 10 Minuten in Xylol gelegt, anschließend folgt die Bearbeitung mit einer absteigenden Alkoholreihe für je 3 Minuten pro Konzentration (100 %, 90 %, 70 % Isopropanol). Vor der Färbung werden die Schnitte für 2 x 5 Minuten mit Aqua dest. gewaschen. Der Färbevorgang dauert 60 Minuten und wird mit 0,1 % Pikro-Siriusrot-Lösung durchgeführt. Nach der Färbung werden die Schnitte erneut mit Aqua dest. gespült, bevor sie durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert werden. Diese wird wie folgt durchgeführt: 1 Minute 70 % Isopropanol, 2 x 1 Minute 90 % Isopropanol, 2 x 10 Minuten 100 % Isopropanol. Am Ende werden die Schnitte erneut für 3 x 3 Minuten in Xylol gelegt und mit Entellan unter einem Deckglas eingedeckt.

### Auswertung der Pikro-Siriusrot-Kollagenfärbung

Die Schnitte werden unter einem Lichtmikroskop (10x Objektiv + Okular 10x) begutachtet und der rot gefärbte Fibroseanteil berechnet. Kollagenfasern stellen sich nach der Färbung unter dem Lichtmikroskop rot dar, während das übrige Gewebe gelb zur Darstellung kommt. Unter dem Polarisationsmikroskop hebt sich das Kollagen rot-orange gegenüber einem schwarzen Hintergrund ab. Die Hintergrundintensität wird vom IOD-Wert (integrated optical density) subtrahiert. Die Daten werden als Anteil des Kollagens am gesamten Gewebe dargestellt (fractional area of collagen content in % of myocardial/renal tissue). Für die Auswertung wurde die NIS-Elements analysis Software (NIS-Elements, BR 3.2, Nikon Instruments, USA) verwendet.

#### 4.1.4 Probengewinnung für Western Blot und Real-Time-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

##### Zellyse und Homogenisierung

Die Gewebeproben aus Herz und Niere werden homogenisiert und in eiskaltem Extraktionspuffer (10 mmol/l cacodylic acid, pH 5,0; 0,15 mol/l NaCl; 1 µmol/l ZnCl<sub>2</sub>; 20 mmol/l CaCl<sub>2</sub>; 1,5 mmol/l NaN<sub>3</sub>; 0,01 % (v/v) Triton-X-100) unter pottern lysiert. Die benötigte Menge Extraktionspuffer lässt sich folgendermaßen bestimmen: Probenmasse in g x 5 = ml Menge Extraktionspuffer. Das homogenisierte Gewebe wird über Nacht bei 4 °C auf einem Überkoprotator weiter inkubiert. Anschließend werden die Homogenate bei 4 °C für 10 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird bei -80 °C aufbewahrt.

## 4.2 In vitro Experimente

### 4.2.1 Probengewinnung

#### 4.2.1.1 Fibroblastenisolation und Passage der Zellen

##### Fibroblastenisolation aus adulten Rattenherzen und -nieren

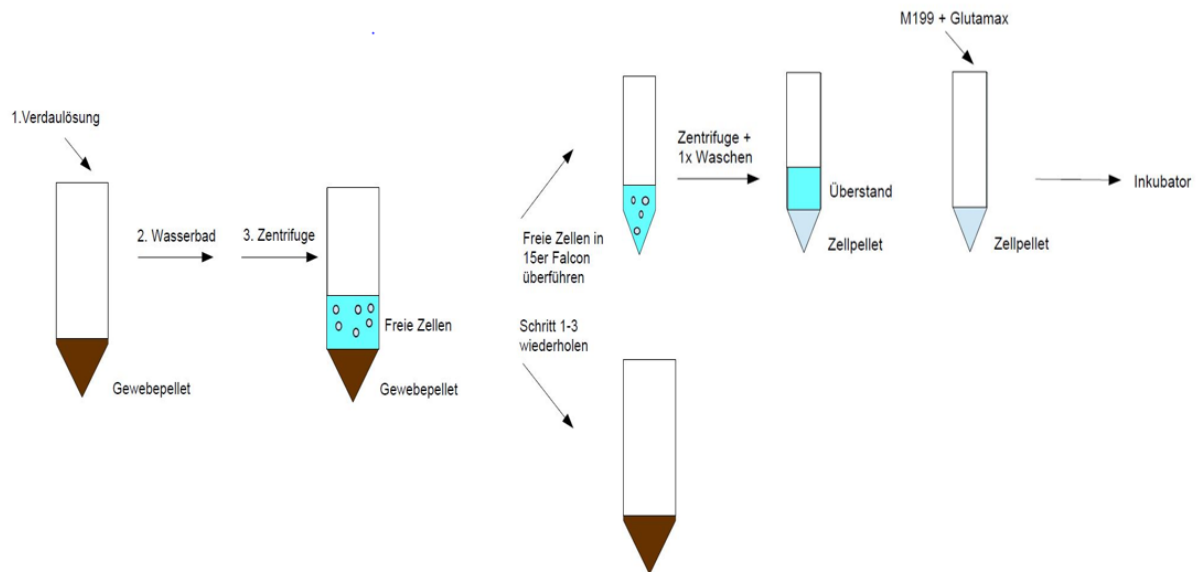
Nach der Organentnahme werden diese in sterilem, kaltem NaCl 0,9 % und anschließend in 1x PBS steril geschwenkt. Die Präparation der Niere erfolgt unter der Sterilbank auf einer 10 cm Zellkulturplatte, während man mit sterilem Besteck zunächst das Organ vom Fettgewebe, den Nierenkelchen und der Nierenkapsel frei präpariert und sie dann in möglichst kleine Stücke schneidet. Analog dazu geht man mit dem Herzen vor, wobei man es von den großen Gefäßen frei präpariert und zerkleinert. Die Gewebestückchen werden mit dem sterilen 1x PBS, welches sich auf der Platte befindet, in einer 25 ml Stabpipette aufgenommen und in ein frisches Falcon überführt.

Dieses Gewebehomogenat wird bei Raumtemperatur für 3 Minuten mit 1000 rpm zentrifugiert. Das PBS wird anschließend abgesaugt, sodass nur noch das Pellet, das dem Zellmaterial entspricht, übrigbleibt. In Abbildung 12 werden die im Folgenden beschriebenen Schritte zusätzlich schematisch veranschaulicht. Zum Pellet wird 5 ml Verdauungslösung hinzugegeben und für 15 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Es schließt sich eine erneute

Zentrifugation wie oben beschrieben an (Raumtemperatur, 3 Minuten, 1000 rpm). Der Überstand entspricht nun den freien Zellen, die durch die Inkubation aus dem Gewebe gelöst wurden. Dieser Überstand wird in ein 15 ml Falcon überführt und dieses für 5 Minuten mit 1200 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der klare Überstand verworfen, das Zellpellet in 100 µl Medium (M199+Glutamax) resuspendiert, anschließend auf bereits mit Medium vorgelegte Zellkulturplatten (Ø 6 cm) verteilt und im Inkubator bei 37 °C aufbewahrt. Währenddessen wird das übrige Gewebe im 50 ml Falcon erneut mit 5 ml Verdaulösung versetzt und die Inkubation im Wasserbad wie oben vorgenommen, sodass sich erneut Zellen herauslösen können. Dieses Prozedere wird so oft wiederholt bis sich das Gewebe aufgelöst hat. Die übrigen Gewebestückchen werden in 2 ml 199 + Glutamax-Medium aufgelöst und auf die zuvor beimpften Platten verteilt. Man inkubiert die Zellen für 2 Stunden im Brutschrank, saugt das Medium ab, wäscht es mit 1 ml 37 °C warmem 1x PBS und beschichtet die Platten mit 2 ml frischem Medium.

**Tabelle 9: Ansatz für Verdaulösung (steril filtriert):**

Substanz	Volumen für 1 Rattenniere/ -herz	Volumen für 1 Rattenniere + 1 -herz
KHB	50 ml	100 ml
0,1 M CaCl <sub>2</sub>	750 µl	1,5 ml
2,5 % Trypsin	240 µl	480 µl
7,5 % BSA (Sigma)	1805 µl	3,61 ml
Dispase I 2 mg in 830 µl Aqua ad inj	152 µl	304 µl
2 % Collagenase 20 mg in 1 ml Aqua ad inj.	900 µl	1,8 ml



**Abbildung 12: Schematische Darstellung des Ablaufs der Fibroblastenisolation**

Schritt 1-3 wird so oft wiederholt, bis das Gewebepellett (Braun) vollständig aufgelöst ist. Nach Schritt 3 erhält man jeweils ein Gemisch aus freien Fibroblasten (Graublau) und Verdauulösung (Hellblau). Dieses wird weiter zentrifugiert bis das Zellpellet (Graublau) übrigbleibt. Dieses wird zweimal in 1x PBS gewaschen, in Nährmedium resuspendiert und auf die Zellkulturplatten verteilt. Näheres s. Text.

### Passage der Fibroblasten

Nachdem die Zellen einige Tage im Inkubator kultiviert werden und jeden zweiten Tag das Medium gewechselt wird, müssen die Zellen bei 80 % Konfluenz passagiert werden. Das Medium wird zunächst abgesaugt und die Zellen werden mit 10 ml 1x PBS pro 10 cm Zellkulturplatte überschichtet. Das PBS wird abgesaugt und anschließend wird die Platte mit 3 ml Trypsin für 5-10 Minuten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Wenn sich die Zellen durch das Trypsin von der Platte abgelöst haben wird die Reaktion mit 6 ml Medium (199 + Glutamax-Medium + FKS 10 %) abgestoppt. Die Zellsuspension wird in ein 50 ml Falcon überführt und dieses bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 8 ml frischem Medium resuspendiert und auf zwei neue 10 cm Platten ausgesät. Diese, nun als Passage 1 bezeichneten Zellen, werden wieder bei 37 °C im Inkubator aufbewahrt, bis sich erneut ein Zellrasen bildet. Für die Stimulationsexperimente wurden stets Fibroblasten der Passage 1 oder 2 verwendet.

#### 4.2.1.2 Ficoll-Trennung zur Isolierung mononukleärer Zellen

Das Prinzip dieser Isolation beruht darauf, dass sich durch unterschiedliche Dichten und dadurch unterschiedliche Migration Schichten verschiedener Zellen bilden. Die dabei entstandene Interphase wird von mononukleären Zellen (MNCs) gebildet. Die humanen PBMCs (engl. „Peripheral blood monuclear cells“) werden aus peripher venösem Vollblut gesunder Probanden bzw. die Milz-MNCs aus Rattenmilzen mittels Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll, einem Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer, isoliert.

#### Ficoll-Auftrennung mononukleärer Zellen aus der Rattenmilz

##### Protokoll:

Zunächst werden die frisch entnommenen Milzen auf einer mit NaCl 0,9 % beschichteten Zellkulturschale unter der Sterilbank von überschüssigem Fett- und Bindegewebe gesäubert. Anschließend wird die Milz in einer mit 10 ml Milz-Puffer vorgelegten Zellkulturschale überführt und das Milzparenchym sorgfältig herausgeschabt, die leere Organhaut wird entfernt. Die Milzpulpa wird mehrfach resuspendiert und die Suspension über einen 70 µm Zellfilter in ein 50 ml Falcon überführt. Anschließend wird das Falcon mit sterilem 1x PBS auf 35 ml aufgefüllt und das Ficoll damit überschichtet, sodass zwei Phasen entstehen. Darauf folgt eine 20-minütige Zentrifugation bei 2400 rpm ohne Bremse. Die oberste Phase wird abpipettiert und verworfen, die Interphase mit den MNCs wird in ein neues Falcon überführt und mit sterilem 1x PBS auf 50 ml aufgefüllt. Erneut folgt eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 2400 rpm mit Bremse. Der Überstand wird abpipettiert, verworfen und das Zellpellet in 1 ml RPMI resuspendiert. Die Anzahl der gewonnenen MNCs wird mittels Neubauer Zählkammer ermittelt. Dazu gilt: 45 µl Medium + 5 µl Zellsuspension + 50 µl Türkslösung. Die Formel zur Ermittlung der Anzahl lautet: Gezählte Zellen x 20 = Zellzahl x 10<sup>4</sup>/ml. Zuletzt wird die Suspension auf Zellkulturplatten verteilt.

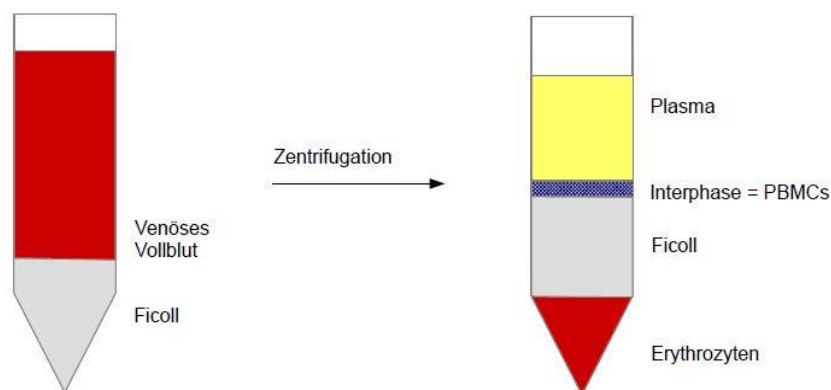
#### Ficoll Auftrennung humaner PBMCs (monokleäre zellen aus periphervenösem Blut)

**Tabelle 10: Gesunde Probanden für die Isolation humaner PBMCs**

Angaben zu gesunden Probanden	
Anzahl (gesamt)	20
Geschlecht (weiblich/männlich)	10/10
Alter (Jahre)	24,6 ± 0,67 * *Werte angegeben als Mittelwert+/- SEM
Kardiovaskuläre Risikofaktoren	Keine

Protokoll:

Es werden 40 ml venöses Vollblut von gesunden Probanden in Citrat-Monovetten abgenommen und anschließend mit 1x PBS 1:1 verdünnt. Mit diesem verdünnten Blut werden 15 ml Ficoll in einem Falcon vorsichtig überschichtet, sodass 2 Phasen entstehen. Die Proben werden mit 2400 rpm bei Raumtemperatur für 20 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Dabei entstehen vier Schichten, wobei die humanen PBMCs die schmale Interphase bilden (Abbildung 13). Die in der Interphase befindlichen humanen PBMCs werden in ein neues Falcon überführt. Daraufhin folgen drei Waschschrte. Beim ersten Waschschrte wird die PBMC-Suspension mit 1x PBS verdünnt und erneut bei 2400 rpm bei Raumtemperatur für 20 Minuten mit Bremse zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstands wird das Pellet in 1x PBS resuspendiert, woraufhin die Suspension erneut für 10 Minuten bei 2400 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert wird. Es folgt derselbe Waschschrte mit 5 ml RPMI Medium und die Zellzählung in der Neubauer Zählkammer unter dem 10x Objektiv (Formel: Gesamtzellzahl/10 ml (gezählte Zellen x 4) x  $10^4$  x 2 x 10). Der Überstand wird abgesaugt, das Pellet in der benötigten Menge RPMI Medium resuspendiert und anschließend zu gleichen Teilen auf die Zellkulturplatten verteilt. Das RPMI Medium enthält 10 % fetales Kälber Serum (FKS) zur Ernährung der Zellen und 1 % Penicillin und Streptomycin zum Schutz vor bakterieller Kontamination. Die Proben werden nun bis zur ersten Stimulation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank (Hera cell 150 von Heraeus) inkubiert.



**Abbildung 13: Erster Zentrifugationsschritt der Ficoll-Auftrennung humaner PBMCs (mononukleäre Zellen aus peripherenvenösem Blut)**

*Erstes Falcon: Überschichtete Ficollschicht mit venösem Vollblut. Zweites Falcon: Nach der Zentrifugation lassen sich vier Schichten voneinander abgrenzen. Erythrozyten (Rot) befinden sich in der Falconspitze, das Ficoll (Grau) trennt die Erythrozyten von den humanen PBMCs (Blau). Die oberste Schicht besteht aus Plasma. Für das weitere Vorgehen wird die Interphase (=PBMCs) in ein neues Falcon überführt und mit sterilem 1x PBS zentrifugiert. Näheres s. Text.*

### 4.2.1.3 HEK - Zellkultur

Die HEK-Zellen wurden als Zelllinie erworben (s. 3.3), in DMEM + 10 % FKS + 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert und ab der 3.- 4. Passage stimuliert. Die Passage der Zellen erfolgte analog zum oben beschriebenen Protokoll. Es wurde lediglich ein unterschiedliches Nährmedium verwendet.

### 4.2.2 Stimulationsexperimente

#### Stimulation mononukleärer Zellen, Fibroblasten und HEK-Zellen

Zur Reproduktion der Zusammenhänge zwischen Katecholaminspiegel und RAGE-Expression, die wir in vivo beobachten konnten, dienten die im Folgenden beschriebenen Versuche. Das Ziel dieser Versuchsreihe war es, den Zelltyp, der für die Veränderungen verantwortlich ist, ausfindig zu machen. Dazu wählten wir Fibroblasten aus Herz und Niere von adulten Ratten, HEK-Zellen sowie mononukleäre Zellen aus der Rattenmilz und humane PBMCs. Hierzu wurden die Zellen über insgesamt 72 Stunden alle 24 Stunden frisch mit Isoproterenol (0,1  $\mu\text{mol/l}$ ) stimuliert. Das nachfolgende Protokoll beschreibt den Vorgang für humane PBMCs, wobei das Stimulationsprotokoll abgesehen von verschiedenen Medien für alle oben beschriebenen Zellen analog ist.

#### Protokoll:

##### 1) Isoproterenol - Stimulation im Zeitverlauf über 72 Stunden

Für diesen Versuchsansatz werden die zuvor isolierten humanen PBMCs gewählt. Diese werden in drei Gruppen geteilt, die den Einfluss des Isoproterenol im Zeitverlauf über 72 Stunden veranschaulichen sollen. Die drei Gruppen ergeben sich aus der Zeit, die sie jeweils unter Katecholamineinfluss stehen: Die ersten werden nach 24 Stunden, die zweiten nach 48 Stunden und die dritten nach 72 Stunden geerntet.

Die erste Stimulation erfolgt vier Stunden nach der Isolation. Dabei wird zunächst das RPMI Medium abgesaugt und durch frisches RPMI Medium ersetzt. Um die Wirkung von Isoproterenol zu unterstützen, werden die humanen PBMCs, die in den folgenden 24 Stunden geerntet werden, mit RPMI-Hungermedium versetzt, dieses enthält 0,5 % FKS und 1 %



Penicillin und Streptomycin. Nach dem Wechsel des Mediums erfolgt die Stimulation mit Isoproterenol (0,1  $\mu\text{mol/l}$ ) unter Lichtschutz.

Nach jeweils 24 Stunden wiederholt sich der Vorgang für die 48- und die 72-Stunden-Zellen. Die Ernte erfolgt jeweils nach 24 Stunden wie folgt: Das Medium wird zunächst abpipettiert und bei -20 °C aufbewahrt. Dieses steht für weitere Versuche wie Western Blot zur Verfügung. Der Zellrasen wird mit 1 ml 1x PBS kurz überschichtet, um das verbliebene Medium abzuwaschen. Das 1x PBS wird verworfen und die am Boden haftenden Zellen durch 500  $\mu\text{l}$  Hypotonic buffer + Aprotinin + Leupeptin + PMSF (Ansatz: 2 ml Hypotonic buffer + 5,8  $\mu\text{l}$  Aprotinin + 2  $\mu\text{l}$  Leupeptin + 20  $\mu\text{l}$  PMSF) lysiert und mithilfe eines Zellschabers vom Plattenboden abgelöst. Die Zellsuspension wird bei -20 °C aufbewahrt und anschließend in weiteren Versuchen mittels Western Blot auf die RAGE-Expression untersucht.

### 2) Isoproterenol und CGP bzw. ICI Stimulation über 72 Stunden

Ein weiterer Versuchsaufbau diente zur Klärung der Frage, über welchen  $\beta$ -Adrenorezeptor das Isoproterenol auf die Zellen wirkt. Durch eine selektive Blockade des  $\beta_1$ - bzw. des  $\beta_2$ -Adrenorezeptors wurde dieser Frage nachgegangen. Hierfür wurden bei der Stimulation der humanen PBMCs CGP (20712A, Sigma) als selektiver  $\beta_1$ -Adrenorezeptor-Blocker und ICI (118551, Sigma) als selektiver  $\beta_2$ -Adrenorezeptor-Blocker eingesetzt.

Für die Stimulation der Zellen gilt folgendes Protokoll: Die Zellhomogenate werden zunächst mit CGP (0,3  $\mu\text{mol/l}$ ) bzw. ICI (0,1  $\mu\text{mol/l}$ ) behandelt und nach 30-minütiger Inkubation mit Isoproterenol (0,1  $\mu\text{mol/l}$ ) stimuliert. Dieser Vorgang wird ebenfalls über einen Zeitraum von 72 Stunden alle 24 Stunden wiederholt. Nach 72 Stunden werden die Zellen geerntet und bei -20 °C gelagert.

## 4.3 Probenverarbeitung

### 4.3.1 Immunfärbungen für $\alpha$ -Glattmuskelaktin und Fibronectin an der Zellkultur von adulten Nierenfibroblasten

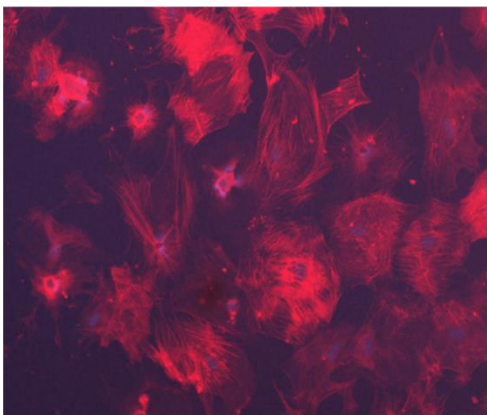
Um nachzuweisen, dass es sich bei den isolierten Nierenzellen um eine reine Fibroblastenpopulation handelt, wurden Immunfärbungen für  $\alpha$ -Glattmuskelaktin (Abbildung 14) und Fibronectin (Abbildung 15) durchgeführt. Das  $\alpha$ -Glattmuskelaktin, ein Teil des Zytoskeletts der Fibroblasten, und das von Fibroblasten gebildete Fibronectin wurden durch

Primärantikörper gebunden und mittels immunfluoreszierenden Sekundärantikörpern sichtbar gemacht. Bei der Auswertung konnte nachgewiesen werden, dass die Zellpopulation zu 96 % aus Fibroblasten besteht.

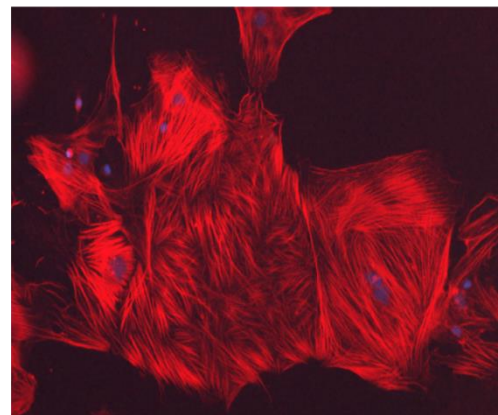
### Protokoll:

Auf Petrischalen kultivierte adulte Nierenfibroblasten der Ratte werden zunächst mit 1x PBS gewaschen und nachfolgend mit 4%-igem Paraformaldehyd (PFA)-Lösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert, gefolgt von 2 x 5 Minuten Waschen mit 1x PBS. Die oben genannte Verdünnung der Antikörper wird jeweils mit 0,1 % Tween-PBS angesetzt. Die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper erfolgt über 2 Stunden bei 37 °C Feuchtkammer im Wasserbad. Daraufhin werden die Zellen für erneut 3 x 5 Minuten mit 0,1 % PBS-Tween gewaschen und nachfolgend 4 Stunden mit jeweils TRITC-markiertem Sekundärantikörper bei 37 °C Feuchtkammer im Wasserbad angesetzt. Nach dem Waschen (3 x 0,1 % PBS-Tween und 2 x 1x PBS) werden die Zellen für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit DAPI (4,6-Diamidinon-2-phenylindol) versetzt, um die DNA bzw. die Zellkerne anzufärben. Nach der DAPI-Färbung werden die Fibroblasten mit Aqua dest. gewaschen, anschließend die angefärbten Areale mit Einbettungsmedium und Deckgläsern versehen und bei 4 °C unter Lichtschutz aufbewahrt. Die Bilder von repräsentativen Feldern der Zellpräparate wurden mit einem Nikon E600-Epifluoreszenzmikroskop aufgenommen.

A)

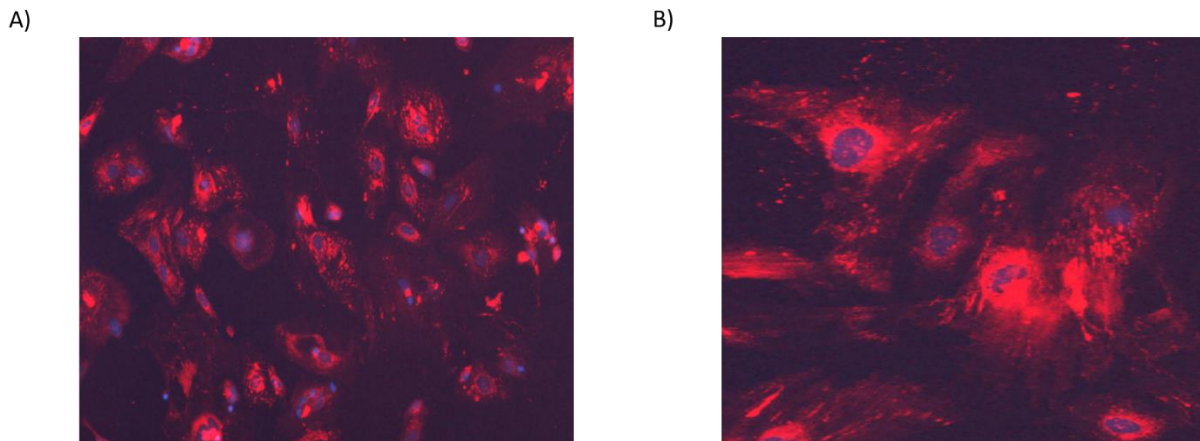


B)



**Abbildung 14: Immunfärbung für  $\alpha$ -Glattmuskelaktin in renalen Fibroblasten**

A) Ausschnitt des Zellrasens der Fibroblasten. Aktin als Bestandteil des Zytoskeletts (rot) und Zellkerne (violett) angefärbt, 10x Vergrößerung. B) Fibroblast mit angefärbtem Aktin (rot) und Zellkern (violett), 40x Vergrößerung.



**Abbildung 15: Immunfärbung für Fibronectin in renalen Fibroblasten**

A) Ausschnitt des Zellrasens der Fibroblasten. Fibronectin als Produkt der Fibroblasten (rot) und Zellkerne (violett) angefärbt, 10x Vergrößerung. B) Fibroblasten mit angefärbtem Fibronectin (rot) und Zellkernen (blau), 40x Vergrößerung.

#### 4.3.2 Ernte der Fibroblasten, mononukleären Zellen der Milz (MNCs), humanen mononukleären Zellen aus peripherenvenösem Blut (PBMCs) und HEK - Zellen

Die Zellen, die für die Western Blot-Analysen verwendet werden, werden in 50 µl hypotonischem Puffer (Ansatz: 2 ml hypotonischer Puffer + 2 µl Leupeptin + 5,8 µl Aprotinin + 20 µl PMSF) geerntet und bei - 20 °C aufbewahrt. Die Zellen, die für die RNA-Isolation und PCR geerntet werden, werden in 1 ml Trifast gelöst und bei - 80 °C eingefroren, oder direkt weiterverarbeitet.

#### 4.3.3 Zellmembranpräparation

Diese Methode dient der Trennung der Membran vom Zytosol. Die Trennung der Zellmembran vom Zytosol erfolgt durch Ultrazentrifugation. Dabei wird die gesamte in hypotonischem Puffer gelöste Zellsuspension bei 4 °C und 45.000 rpm für 2 Stunden ultrazentrifugiert. Es erfolgt eine Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry et al., 1951) sowohl vor als auch nach der Zentrifugation. Nach der Zentrifugation wird das Zytosol abpipettiert und das Pellet, das der Zellmembran entspricht zunächst in 50 µl hypotonischem Puffer (Ansatz: 2 ml hypotonischer Puffer + 2 µl Leupeptin + 5,8 µl Aprotinin + 20 µl PMSF) resuspendiert. Anschließend werden die Proben bei -20 °C gelagert und dienen als Material für die Western Blot Analyse des membranösen RAGE.

### Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Die Proteinbestimmung der Proben erfolgt nach der Methode von Lowry (Lowry et al., 1951), einer kolorimetrischen Methode. Im ersten Schritt wird ein Kupfer- Protein- Komplex in alkalischer Lösung gebildet. Dieser Komplex reduziert dann ein zugegebenes Phosphomolybdat-Phosphowolfram-Reagenz (Folin-Ciocateau-Phenol-Reagenz), wobei sich die Lösung in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration intensiv blau färbt. Die Messung erfolgt mittels des „detergent compatible kit“ DC Protein Assay (Bio-Rad).

20 µl Aqua dest. dienen als Leerwert. 2 µl Probe werden mit 18 µl Aqua dest. und 100 µl Lösung A versetzt. Nach Zugabe von 800 µl Bio-Rad Lösung B und 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption der Lösung bei 540 nm photometrisch gemessen (DU 730, Life science UV/VIS Spectrophotometer; Beckman Coulter). Die Lowry-Proteinbestimmung erfolgt pro Probe als Doppelbestimmung.

#### 4.3.4 Western Blot

Beim Western Blot handelt es sich um eine molekularbiologische Methode zum Nachweis der Proteinexpression in Gewebe und Zellen. Das Ziel des Western Blots ist es, das gesuchte Protein aus einem Proteingemisch zu detektieren. Dies wird in drei Schritten bewerkstelligt: Im ersten Schritt werden die Proteine anhand ihrer Ladung und Größe mittels Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt, anschließend erfolgt das Übertragen der aufgetrennten Proteine von dem SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran. Im dritten Schritt wird das gesuchte Protein durch eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion detektiert.

Nachdem die Gewebeproben lysiert und die in der Zellkultur gezüchteten Zellen und deren Medien, wie oben beschrieben, verarbeitet werden, erfolgt die Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry et al., 1951).

### Aufkonzentrierung der Proben

Während die Gewebeproben und die Proben der Zellmembranpräparation eine ausreichend hohe Proteinmenge für die Western Blot-Analyse aufweisen, bedürfen die Zellkulturmedien aufgrund niedrigerer Proteinkonzentration einer Aufkonzentrierung. Die Medien werden mithilfe von Zentrifugationsgeräten (Amicon Ultra-0,5 Centrifugal filter Devices) nach Herstellerangaben konzentriert: Es werden 500 µl Medium entsprechend den Herstellerangaben in die Zentrifugationsgefäße pipettiert.

Nach dem ersten Zentrifugationsschritt (13.400 rpm, 4 °C, 5 Minuten) kommt es zur Auftrennung in Überstand (Konzentrat) und Bodenstand (Filtrat). Das Konzentrat wird aus den Zentrifugationsgefäßen in eine weitere Zentrifugationsreihe transferiert und erneut zentrifugiert (3.600 rpm, 4 °C, 2 Minuten). Danach erfolgt eine Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry et al., 1951). Abbildung 16 gibt einen schematischen Überblick über die im Folgenden ausführlich beschriebenen weiteren Schritte des Western Blot.

### Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Probenvorbereitung erfolgt, indem 28 µl Probe mit 7 µl fünffachem Ladepuffer verdünnt und bei 95 °C für 5 Minuten gekocht wird. Die Proben werden auf ein 12 % SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und etwa 3 Stunden bei 50 V für die Sammelphase und 100 V für die Laufphase elektrophoretisch in der Elektrophoresekammer (Mini Protean Tetra Cell, Bio Rad) aufgetrennt. Zur Stromerzeugung wird ein Power Pac (HC, Bio-Rad) verwendet. Zur Identifikation der Banden läuft parallel zu den Proben ein Rainbow-Marker (Amersham), dessen Molekulargewichtsbereich 12 kDa bis 225 kDa umfasst.

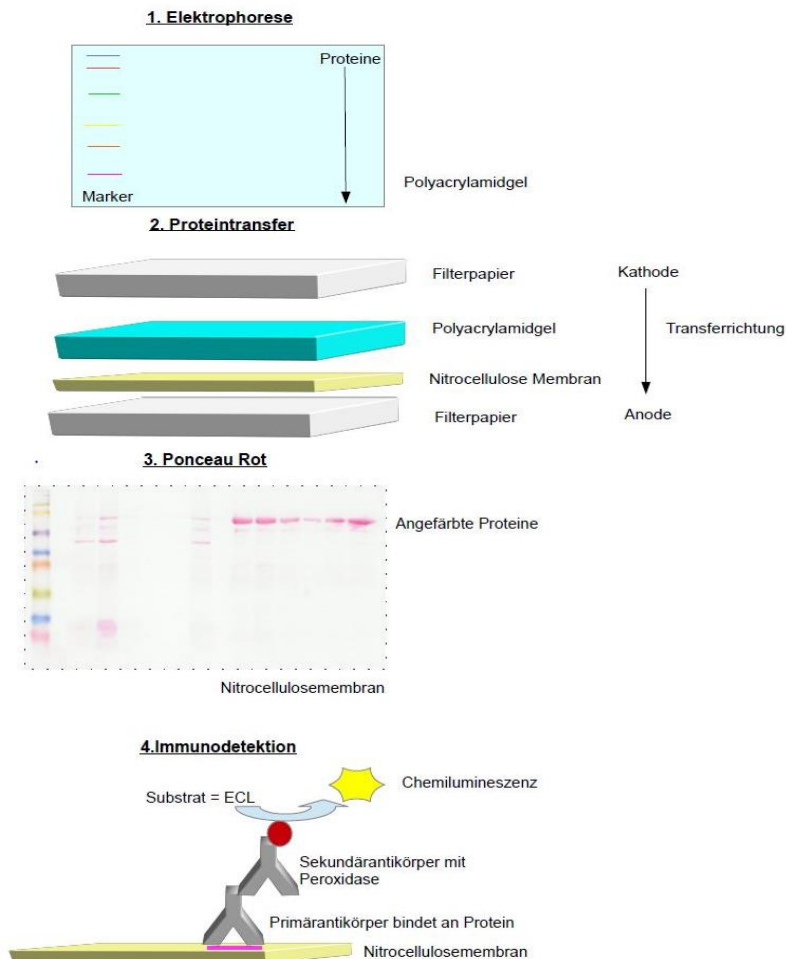
### Immunoblotting

Nach der Elektrophorese werden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose Membran (GE Healthcare, life sciences, Whatman, Sigma-Aldrich) mittels „semi-dry electrophoretic blotting“ transferiert. Dazu werden Gel, Nitrocellulose-Membran und Filterpapiere (Extra thick blot paper, Bio-Rad) mit Transferpuffer durchtränkt und luftblasenfrei aufeinandergelegt, sodass die Proteine aus dem Gel in Transferrichtung auf die Membran übertragen werden. Dabei bilden die Filterpapiere die oberste und die unterste Außenschicht. Der Transfer erfolgt bei einem Gleichstrom von 200 mA über 60 Minuten mithilfe der Blotting Vorrichtung (Trans Blot SD, Semi-dry transfer Cell, Bio-Rad). Zur Kontrolle der Gesamtproteinbeladung und des erfolgreichen Proteintransfers nach dem Blotten wird mittels Ponceau-Rot (SERVA, Heidelberg, Deutschland) 1 Minute gefärbt.

### Immunodetektion

Um unspezifische Bindungen zu reduzieren, wird die Membran anschließend in Blocker-Lösung (1 % Western blocking solution in 1x PBS-Tween verdünnt) bei Raumtemperatur für mindestens 1 Stunde geblockt. Dann wird die Membran mit dem RAGE/sRAGE-spezifischen primären Antikörper rabbit-anti-rage (rabbit polyclonal to RAGE, 1:1000, ab37647, Abcam), beziehungsweise dem CML- und HMGB1-spezifischen primären Antikörper mouse-anti-CML

(mouse monoclonal to CML, 1:2000, ab27684, Abcam) und rabbit-anti-HMGB1 (rabbit-polyclonal to HMGB1, 1:1000, ab18256-100) 0,1 % in 1x PBS-Tween verdünnt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen (2 x 5 Minuten PBS-Tween, 1 x 10 Minuten PBS-Tween, 2 x 3 Minuten PBS) wird die Membran mit den Peroxidase-konjugierten, 1:10000 verdünnten Sekundärantikörpern goat-anti-rabbit und goat-anti-mouse für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgen erneut die oben genannten Waschschrte. Die Entwicklung der Proteine erfolgt gemäß den Benutzerhinweisen des Herstellers mit dem Western-Blot-Detektions-Reagenz ECL (Western Blotting Detection Reagents, GE Healthcare, Amersham) durch eine Peroxidase-vermittelte Chemilumineszenzreaktion. Diese führt im Bereich der Banden, die durch den Antikörper markiert sind, zu einer Schwärzung der aufgelegten Röntgenfilme (GE Healthcare, Amersham Hyperfilm ECL).



**Abbildung 16: Schematische Darstellung des Ablaufs des Western Blots**

Im ersten Schritt werden die Proteine durch die Gelelektrophorese nach Ladung und Größe getrennt. Im zweiten Schritt erfolgt das sogenannte Blotting der Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran. Die aufgetragenen Proteine können durch die Ponceau Rot Färbung im dritten Schritt sichtbar gemacht werden. Im vierten Schritt ist hier die Immunodetektion dargestellt, die nach der Inkubation mit dem Primär- und Sekundär-Antikörper erfolgt. Hierbei bindet der Primärantikörper direkt an das gesuchte Protein, während der Peroxidasegekoppelte Sekundärantikörper an dessen Fc-Teil bindet. Durch Zugabe des ECL erfolgt eine Chemilumineszenzreaktion. Durch diese Reaktion erscheinen die Banden, an denen der Primärantikörper bindet auf dem der Membran aufgelegten Film als schwarze Banden auf hellem Grund.

### Membranstripping

Um dieselbe Nitrocellulosemembran auf verschiedene Proteine zu untersuchen, bietet sich das Membranstripping als geeignete Methode an. In unserem Fall wurde die Membran sowohl auf RAGE als auch auf das Housekeeping-Protein, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), untersucht.

Durch das Membranstripping werden die gebundenen Antikörper von ihrer spezifischen Bindung gelöst und von der Membran abgewaschen. Anschließend ist es möglich, die Membran mit anderen Antikörpern zu inkubieren.

### Protokoll:

Die Membran wird für 25 Minuten mit 15 ml Stripping Puffer bei 57 °C im Hybridisierungssofen inkubiert. Anschließend folgen mehrere Waschschrte bei Raumtemperatur: 4 x 5 min in 1x PBS-Tween; 2 x 5 Minuten und 1 x 10 Minuten in 1x PBS.

Das folgende Prozedere entspricht dem der Immunodetektion (s.o). Als Primärantikörper wird mouse-anti-GAPDH (1:1000 in 1 % PBS) und als Sekundärantikörper goat-anti-mouse (1:5000 in 1 % PBS + 1 % Magermilch) verwendet.

## 4.3.5 Real-Time-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

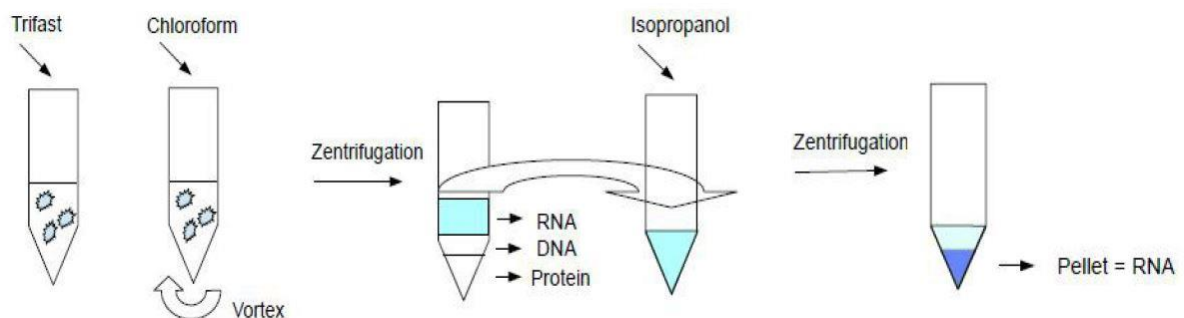
### RNA Isolation

Das Verfahren beruht auf einer Phasenextraktion und wird nach der single-step-Methode von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski et al., 1987) durchgeführt. Beim Umgang mit der RNA ist darauf zu achten, dass diese besonders empfindlich gegenüber RNAsen ist, welche möglichst früh denaturiert werden müssen. Um die Probe vor äußerer RNA- und DNA-Kontamination zu schützen, erfolgt die Isolation unter einem Gasabzug. Im Folgenden wird die RNA-Isolation vom Zeitpunkt der Ernte bis zur Messung beschrieben.

### Protokoll:

Das Medium der Zellen wird abgenommen und bei -20 °C aufbewahrt. Die Zellen werden in 1 ml phenolhaltigem PeqGold Trifast geerntet. Für die RNA-Isolation aus Gewebe wird das zuvor homogenisierte Gewebe mit 1 ml PeqGold Trifast versetzt. Die folgenden Schritte sind für Gewebe und Zellen gleich, sodass exemplarisch von Zellen gesprochen wird. Das Vorgehen erfolgt für das Gewebe gleichermaßen. Nach Überführen in ein Eppendorfgefäß werden die

Zellen für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bei diesem Schritt werden die Zellen lysiert, die RNA in Phenol gelöst und gleichzeitig die RNAsen denaturiert und inaktiviert. Anschließend werden 200 µl Chloroform hinzugefügt und die Proben für 10 Minuten bei Raumtemperatur unter ständigem Vortexen inkubiert. Daran schließt sich die Zentrifugation an: 5 Minuten, 12000 x g, 4 °C. Dadurch werden die Proben in drei Phasen geteilt. Die obere wässrige Phase enthält die RNA, die Intermediärphase die DNA und die unterste Phase die Proteine. Beim Überführen der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß muss sorgfältig gearbeitet werden, um die übrigen Phasen nicht zu berühren. Zum neuen Reaktionsgefäß werden 500 µl 100 % Isopropanol hinzugefügt und die Proben für 5-15 Minuten auf Eis gelegt. Eine erneute Zentrifugation für 10 Minuten bei 12000 x g und 4 °C schließt sich an. Der Überstand wird erneut in ein neues Eppendorfgefäß überführt und in 1 ml 75 % Ethanol gelöst, worauf die letzte Zentrifugation für 10 Minuten bei 12000 x g bei 4 °C folgt. Dieser Waschschrift wird insgesamt zweimal durchgeführt, um die Probe von Salzen zu befreien. Anschließend lässt man das Pellet an der Luft trocknen und löst es dann in 15 µl Aqua ad inj., um die Proben dann bei 60 °C für 5 Minuten zu inkubieren. Abbildung 17 dient der Veranschaulichung des oben beschriebenen Protokolls der RNA-Isolation. Die Messung der RNA erfolgt an dem NanoDrop 2000 Spectrophotometer (PiqLab). Hierfür wird 1 µl unverdünnte Probe eingesetzt. Das von der RNA absorbierte Spektrum liegt zwischen 260 nm und 280 nm. Aus den beiden Wellenlängen lässt sich der Quotient bestimmen, welcher Rückschlüsse auf den Reinheitsgrad der isolierten RNA zulässt. Nach der Messung kann direkt der DNase-Verdau erfolgen, oder die Proben werden bei - 80 °C aufbewahrt.



**Abbildung 17: Schematische Darstellung des Ablaufs der RNA (Ribonukleinsäure) - Isolation**

Nach Zugabe von TriFast und Chloroform zu den geernteten Zellen (Graublau), wird das Homogenat zentrifugiert. Nach der Zentrifugation entstehen drei Phasen. Die oberste Phase (Türkis) enthält die RNA, in der mittleren Phase (Weiß) befindet sich die DNA. Die unterste Phase (Weiß) enthält Proteine. Die oberste Phase (Türkis) wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt und erneut zentrifugiert. Nach diesem Schritt sind zwei Phasen voneinander abgrenzbar. Die obere Phase (Hellblau) wird verworfen, das Pellet = untere Phase (Dunkelblau) enthält die RNA. Näheres siehe Text.



### DNase-Verdau

Um die isolierte RNA von kontaminierender chromosomaler DNA zu befreien, werden die Proben einem DNase-Verdau unterzogen. Dabei baut DNase 1 (Pepqab, Cat. 04-1180) die dsDNA ab.

### Protokoll:

Dazu versetzt man jeweils 10 µl RNA-Probe mit 10 µl Master-Mix, inkubiert es im Thermocycler (VWR) für 30 Minuten bei 37 °C und stoppt die Reaktion für 5 Minuten bei 75 °C ab. Anschließend wird die nun von DNA gereinigte RNA bei -80 °C gelagert oder direkt in die Reverse Transkription eingesetzt.

**Tabelle 11: Ansatz Master-Mix für DNase (Desoxyribonuklease) - Verdau  
(Volumen 10µl pro Probe)**

Substanz	Menge
Aqua ad inj.	5,5 µl
DNase I (Pepqab, Cat. 04-1180)	2,0 µl
RNAse Inhibitor (40 U/µl von Promega, Cat.N2611)	0,5 µl
10 x PCR Puffer	2,0 µl

### Reverse -Transkription

Um die im vorherigen Versuch isolierte einzelsträngige RNA in komplementäre doppelsträngige DNA (copy DNA = cDNA) umzuschreiben, bedarf es der Reversen Transkription. Zur Reversen Transkription wird der Master-Mix unter anderem mit der Reversen Transkriptase und Nukleotiden versetzt, die das Umschreiben der RNA erst ermöglichen. Für den Mater-Mix und die Inkubation im Thermocycler (VWR) wird das Kit und das Protokoll der Firma Applied Biosystems verwendet (High capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Cat. 4368814). Die gewonnene cDNA wird bei -20 °C bis zur Durchführung der Real-Time PCR aufbewahrt.

**Tabelle 12: Protokoll für Reverse Transkription (Versetzen von 10µl RNA mit 10 µl Master-Mix)**

Substanz	Menge
Aqua ad inj.	3,2 µl
10 x RT Puffer	2,0 µl
10 x RT Random Primer	2,0 µl
25 x dNTP Mix (100mM)	0,8 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1,0 µl
RNAse Inhibitor	1,0 µl

**Tabelle 13: Protokoll für Reverse Transkription: Inkubation im Thermocycler**

	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Temperatur [°C]	25	93	Auf Eis	-20
Zeit [Minuten]	10	120	5	unendlich

### Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine molekularbiologische Methode zur exponentiellen Vervielfältigung von bestimmten DNA-Sequenzen in vitro. Das Prinzip beruht auf drei Schritten: 1. Denaturierung der DNA, 2. Primer-Annealing und 3. Elongation

Im ersten Schritt werden die Doppelstränge der DNA getrennt, sodass Einzelstränge vorliegen. An diese können im zweiten Schritt die Primer binden und die DNA-Polymerase im dritten Schritt einen komplementären Strang synthetisieren. Alle Schritte werden durch unterschiedlich hohe Temperaturen gesteuert. Da die Primer spezifisch an das jeweilige 3`-Ende der zu amplifizierenden Sequenz binden, ist es möglich diesen Teil der DNA nachzuweisen. In unserem Fall ist dies der Abschnitt, der für RAGE kodiert. Die Reaktion läuft in Richtung 5`-Ende unter Verbrauch von Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs) ab. Die nach dem ersten Zyklus doppelt vorliegenden Sequenzen werden in einem neuen Zyklus wieder verdoppelt, bis die Anzahl exponentiell angestiegen ist.

### Real-Time-quantitative PCR

Die Real-Time-PCR wird wie eine reine Polymerasekettenreaktion durchgeführt, ermöglicht jedoch während der PCR eine quantitative Bestimmung der DNA in Echtzeit. Während eines PCR-Zyklus wird mittels Fluoreszenz die amplifizierte DNA und die Geschwindigkeit der PCR gemessen. Dadurch kann auf eine Bestimmung der Genexpression durch Gelelektrophorese verzichtet werden. In diesem Fall wurde als Fluoreszenzfarbstoff SYBR®Green verwendet. Dieser Farbstoff interkaliert mit doppelsträngiger DNA, während das Signal von Zyklus zu Zyklus zunimmt und Rückschlüsse auf die Menge der amplifizierten DNA ermöglicht (Abbildung 18). Für diesen Versuch wird die im Vorfeld gewonnene cDNA eingesetzt.

Es wird das SYBR®Green-Kit und das Protokoll der Firma Applied Biosystems verwendet. Im SYBR®Green-PCR-Master-Mix sind bereits der PCR-Puffer sowie die thermostabile DNA-Polymerase und die Nukleotide enthalten. Für die Durchführung der PCR werden zum SYBR®Green-PCR-Master-Mix ein forward und reverse Primer sowie die cDNA hinzugefügt. Für die PCR wird das Gerät Step One Plus der Firma Applied Biosystems verwendet.

Protokoll:

Die Primer werden 1:20 mit Aqua ad inj. verdünnt, bevor sie zum Master-Mix hinzu pipettiert werden. Um die Effizienz der PCR zu überprüfen, wird für die Proben eine Standard-Verdünnungsreihe erstellt. Dabei entspricht die Amplifikation der Konzentration der cDNA in der verdünnten Probe und es entsteht mit ansteigender Konzentration analog dazu eine entsprechend ansteigende Kurve. Die Effizienz der PCR lässt sich aus der Steigung der Kurve berechnen.

**Tabelle 14: Protokoll für die von uns gewählte Standardreihe für PCR**

Reihe	Vorgehen	Verdünnung
<b>Standard 1</b>	20 µl cDNA + 80 µl Aqua ad inj	1: 5
<b>Standard 2</b>	20 µl Standard 1 + 20 µl Aqua ad inj	1: 10
<b>Standard 3</b>	20 µl Standard 2 + 20 µl Aqua ad inj	1: 20
<b>Standard 4</b>	20 µl Standard 3 + 20 µl Aqua ad inj	1: 40
<b>Standard 5</b>	20 µl Standard 4 + 20 µl Aqua ad inj	1: 80

**Tabelle 15: Protokoll für Ansatz für q(ualitative)RT-PCR (25 µl pro Target)**

Substanz	Menge
Aqua ad inj.	13,5 µl
Power SYBR®Green-PCR-Master-Mix	5,5 µl
Primer forward	0,5 µl
Primer reverse	0,5 µl
cDNA	3,0 µl

**Tabelle 16: Protokoll für PCR: Thermocyclerprogramm**

Temperatur	Zeit	
95,0 °C	10 Minuten	
95,0 °C	15 sec	} 40X
57,4 °C	1 Minute	

Sobald der Mindestwert der DNA-Bildung erreicht ist, erscheint auf dem Bildschirm eine Exponentialkurve. Der Schwellenwert bzw. Cycle Threshold (Ct-Wert) bezeichnet den Anfang des exponentiellen Wachstums der PCR-Kurve. Dieser korreliert mit der mRNA-Konzentration in der Probe. Die Geschwindigkeit der Reaktion korreliert mit der Anzahl des vorhandenen Produkts und wird somit gegen Ende langsamer, da weniger Substrate, in dem Fall dNTPs, vorhanden sind. Die bei uns untersuchte RAGE-Expression wird auf ein Housekeeping-Gen genormt, dessen Expression als Kontrolle parallel dazu abläuft. Das hier verwendete Housekeeping-Gen ist 18S rRNA.

Auswertung:

Der Versuch wird durch die komparative Ct – Methode ( $\Delta\Delta Ct$ ) ausgewertet:

$\Delta Ct$  gibt den Unterschied in Bezug auf die 18S RNA an:

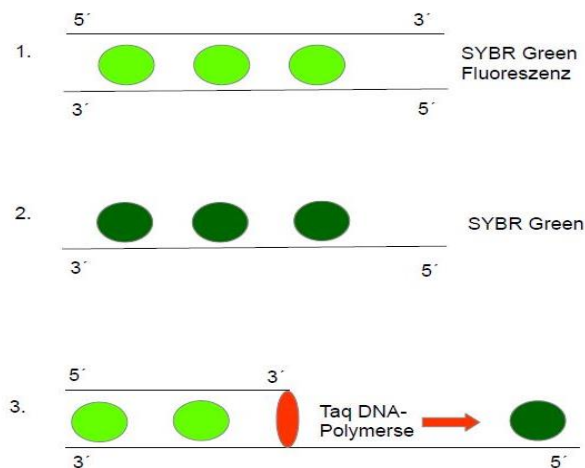
$\Delta Ct = \text{Ziel mRNA Ct Wert} - \text{Houskeeping Ct Wert}$

$\Delta\Delta Ct$  gibt den Unterschied zwischen zwei Gruppen an:

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{Gruppe1}) - \Delta Ct (\text{Kontrolle})$

Das Verhältnis der beiden Gruppen wird wie folgt berechnet:  $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$

Die Effizienz der PCR lässt sich wie folgt berechnen:  $E = 10^{(-1/m)}$



**Abbildung 18: Schematische Darstellung des Ablaufs des SYBR<sup>®</sup>Green Assays**

1. Der Farbstoff SYBR<sup>®</sup>Green interkaliert mit doppelsträngiger DNA und fluoresziert, wenn es interkaliert (Hellgrün).  
2. Bei Anlagerung an einzelsträngige DNA fluoresziert dieser nicht (Dunkelgrün). 3. Zeigt die Synthese eines komplementären Stranges (oben) zum bereits vorliegenden Einzelstrang (unten) durch die Taq-DNA-Polymerase (Rot). Hierbei beginnt das SYBR<sup>®</sup>Green zu fluoreszieren, sobald es mit der doppelsträngigen DNA interkaliert.

## 4.4 Auswertung

### 4.4.1 Western Blot, Immunfärbungen für $\alpha$ -Glattmuskelaktin bzw. Fibronectin und Real-Time-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Alle Western Blots wurden mittels CanoScan LIDE 90 (Canon) densitometrisch ausgewertet. Die Signalstärken der jeweiligen Banden wurden gegenüber dem Hintergrund korrigiert. Die Pikro-Siriusrot gefärbten Schnitte wurden mittels Nikon Eclipse 600 Mikroskop untersucht. Die Analyse und Quantifizierung der interstitiellen Fibrose erfolgte hintergrundkorrigiert mit der Digital Image Lucia G (Nikon, Düsseldorf) Software. Die Auswertung der immungefärbten Fibroblasten erfolgte mittels Nikon Eclipse 600 Mikroskop. Die Quantifizierung der Genexpression erfolgte mittels StepOne Plus PCR Gerät + Software nach der komparativen Ct-Methode.

### 4.4.2 Statistische Analysen

Messwerte sind stets als Mittelwert  $\pm$  SEM (standard error of the mean) angegeben. Alle statistischen Analysen erfolgten mittels Graph Pad Prism (Version 5.0; GraphPad Software, San Diego California, USA). Statistische Signifikanz wurde mittels One-way-ANOVA und Tukey-Post-Hoc-Test ermittelt beim Vergleich mehrerer Gruppen bzw. mittels Student-t-Test oder Mann-Whitney-Test beim Vergleich von nur zwei Gruppen. P-Werte  $< 0.05$  wurden als statistisch signifikant angesehen. Korrelationen wurden mittels Spearman-Korrelationsanalysen bei ungleich verteilten Parametern durchgeführt.

## 5.0 Ergebnisse

Um die Auswirkungen der renalen Denervation zu untersuchen, wurden 3 Gruppen miteinander verglichen: die renal denervierten, spontan-hypertensiven, obesen Ratten (SHRobRDN), die spontan-hypertensiven, obesen Ratten, die keinem Eingriff unterzogen wurden (SHRob) sowie die schlanken, spontan-hypertensiven Ratten (SHR). Als Kontrolle dienten die Ratten, die weder übergewichtig noch hypertensiv waren und nicht renal denerviert wurden (Kontrolle).

### 5.1 Effekte der renalen Denervation auf renale, metabolische und kardio-funktionelle Parameter

Tabelle 17 gibt einen Überblick über die renalen und metabolischen Parameter sowie über die Durchschnittswerte der kardialen Funktionsparameter, die zum Teil aus kardio-MRT-Ergebnissen abgeleitet und zum Teil invasiv bestimmt wurden. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM.

#### 5.1.1 Renale und metabolische Parameter

Die Nierenfunktion, die mittels GFR bestimmt wurde, war bei den SHRob-Versuchstieren im Vergleich zur SHR-Gruppe deutlich reduziert ( $0.2 \pm 0.02$  [l/kg/h] SHRob vs.  $0.4 \pm 0.02$  [l/kg/h] SHR,  $p < 0.001$ ). Nach renaler Denervation stieg diese jedoch signifikant im Vergleich zur GFR der unbehandelten Tiere an ( $0.3 \pm 0.07$  [l/kg/h] SHRobRDN vs.  $0.2 \pm 0.02$  [l/kg/h] SHRob,  $p = 0.019$ ). Bezüglich der Kreatininspiegel zeigten sowohl die SHR-Versuchstiere ( $29 \pm 0.9$  [ $\mu$ mol/l] SHR vs.  $21 \pm 1.3$  [ $\mu$ mol/l] Kontrolle) als auch die SHRob-Gruppe ( $32.3 \pm 5.3$  [ $\mu$ mol/l] SHRob vs.  $21.0 \pm 1.3$  [ $\mu$ mol/l] Kontrolle) erhöhte Werte im Vergleich zu den Kontrolltieren. Nach renaler Denervation zeigten die Versuchstiere ähnliche Werte wie die der Kontrolltiere ( $21.3 \pm 7.3$  [ $\mu$ mol/l] SHRobRDN vs.  $21.0 \pm 1.3$  [ $\mu$ mol/l] Kontrolle) und waren damit signifikant niedriger als bei den Tieren ohne Eingriff ( $32.3 \pm 5.3$  [ $\mu$ mol/l] SHRob vs.  $21.3 \pm 7.3$  [ $\mu$ mol/l] SHRobRDN,  $p = 0.038$ ). Die Nüchtern-Insulinspiegel waren, wie zu erwarten, bei den SHRob-Versuchstieren im Vergleich zu den SHR-Versuchstieren signifikant erhöht ( $10126 \pm 1518$  [pg/ml] SHRob vs.  $1157 \pm 294$  [pg/ml] SHR,  $p < 0.0001$ ). Die Kontrolltiere zeigten wiederum

niedrigere Nüchtern-Insulinspiegel als die SHR-Versuchstiere ( $854 \pm 231$  [pg/ml] Kontrolle vs.  $1157 \pm 294$  [pg/ml] SHR). Nach renaler Denervation verbesserten sich diese Werte im Vergleich zur SHRob-Gruppe, waren jedoch weiterhin im Vergleich zu den anderen Gruppen erhöht ( $7714 \pm 1289.3$  [pg/ml] SHRobRDN). In allen drei Gruppen ließen sich ähnlich hohe HbA1c-Werte nachweisen ( $3.9 \pm 0.01$  [%] Kontrolle vs.  $3.6 \pm 0.04$  [%] SHR vs.  $3.7 \pm 0.1$  [%] SHRob). Auch nach dem Eingriff zeigte sich kein Unterschied des HbA1c-Wertes ( $3.7 \pm 0.14$  [%] SHRobRDN). Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die obesen Tiere noch keinen manifesten Diabetes mellitus entwickelt haben.

### 5.1.2 Kardiale Funktionsparameter

Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF), die mittels kardio-MRT gemessen wurde, war bei der SHRob-Gruppe im Vergleich zu den SHR-Versuchstieren leicht erniedrigt ( $45.7 \pm 1.6$  [%] SHRob vs.  $51.2 \pm 1.2$  [%] SHR,  $p < 0.05$ ), verbesserte sich jedoch nach renaler Denervation signifikant ( $54.1 \pm 1.2$  [%] SHRobRDN). Der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVedP), der invasiv gemessen wurde, war bei den SHRob-Versuchstieren im Vergleich zur SHR-Gruppe deutlich erhöht ( $16.1 \pm 2.3$  [mmHg] SHRob vs.  $6.0 \pm 2.7$  [mmHg] SHR) und konnte durch renale Denervation signifikant reduziert werden ( $7.4 \pm 2.2$  [mmHg] SHRobRDN,  $p < 0.05$ ). Die SHRob-Versuchstiere hatten im Vergleich zur SHR-Gruppe einen deutlich erhöhten mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) ( $224 \pm 5$  [mmHg] SHRob vs.  $199 \pm 5.6$  [mmHg] SHR). Dieser konnte bei renal denervierten Tieren wieder gesenkt werden ( $179 \pm 12.2$  [mmHg] SHRobRDN vs.  $224 \pm 5$  [mmHg] SHRob). Bei der Messung der Herzfrequenz konnten keine relevanten Unterschiede zwischen den SHR-Versuchstieren ( $305 \pm 13.7$  [bpm] SHR vs.  $328 \pm 1.3$  [bpm] Kontrolle), der SHRob-Gruppe ( $276 \pm 9.6$  [bpm] SHRob vs.  $328 \pm 1.3$  [bpm] Kontrolle) und den Kontrolltieren verzeichnet werden. Nach dem Eingriff konnte jedoch die Herzfrequenz im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert werden ( $277 \pm 13.4$  [bpm] SHRobRDN vs.  $328 \pm 1.3$  [bpm] Kontrolle).

**Tabelle 17: Renale, metabolische und kardio-funktionelle Parameter**

	Kontrolle n=5-6	SHR n=6-7	SHRob n=5-6	SHRobRDN n=5-6	Kontrolle vs. SHR	SHR vs. SHRob	SHRob vs. SHRob RDN	Kontrolle vs. SHRobRDN
Parameter	P-Wert							
Kreatinin ( $\mu\text{mol/l}$ )	21 $\pm$ 1.3	29 $\pm$ 0.9	32.3 $\pm$ 5.3	21.3 $\pm$ 7.3	0.062	0.437	0.038	0.958
GFR (l/kg/h)	0.6 $\pm$ 0.02	0.4 $\pm$ 0.02	0.2 $\pm$ 0.02	0.3 $\pm$ 0.07	<0.001	<0.001	0.019	<0.001
Renales Noradrenalin (pg/mg)	103.5 $\pm$ 14.7	98.2 $\pm$ 2.3	108.7 $\pm$ 8.9	10.9 $\pm$ 2.4	0.628	0.634	<0.001	<0.001
Insulin (pg/ml)	854 $\pm$ 231	1157 $\pm$ 294	10126 $\pm$ 1518	7714 $\pm$ 1289.3	0.809	<0.001	0.118	<0.001
HbA1C (%)	3.9 $\pm$ 0.01	3.6 $\pm$ 0.04	3.7 $\pm$ 0.1	3.7 $\pm$ 0.14	0.132	0.464	0.462	0.879
EF (%)	66.0 $\pm$ 1.8	51.2 $\pm$ 1.2	45.7 $\pm$ 1.6	54.1 $\pm$ 1.2	<0.001	0.041	<0.007	<0.001
LVedP (mmHg)	4.7 $\pm$ 1.4	6.0 $\pm$ 2.7	16.1 $\pm$ 2.3	7.4 $\pm$ 2.2	0.703	0.012	0.051	0.494
RR (MAP) (mmHg)	116 $\pm$ 2.9	199 $\pm$ 5.6	224 $\pm$ 5	179 $\pm$ 12.2	<0.001	0.031	<0.001	<0.001
HR (bpm)	328 $\pm$ 1.3	305 $\pm$ 13.7	276 $\pm$ 9.6	277 $\pm$ 13.4	0.285	0.119	0.994	0.026

Messungen von PD Dr. Dr. Linz/Sanofi Aventis. Werte sind angegeben als Mittelwert +/- SEM



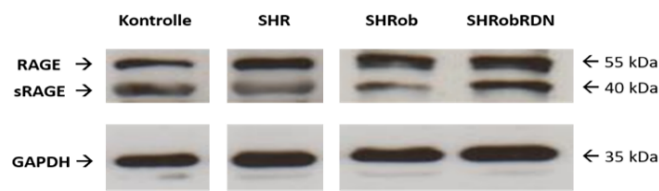
## 5.2 Effekte der renalen Denervation auf die renale und myokardiale RAGE/sRAGE-Expression

Das Verhältnis zwischen RAGE und dem protektiven Antagonisten sRAGE spielt neben der reinen RAGE-Expression ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Pathogenese und im Verlauf kardiovaskulärer und metabolischer Erkrankungen. Nachdem in Kooperation mit der Arbeitsgruppe PD Dr. Dr. Linz die Einflüsse der renalen Denervation auf die in Tabelle 17 genannten Parameter *in vivo* analysiert wurden, sollten die Effekte auf die Expression des RAGE und des sRAGE in Herz, Niere und Serum untersucht werden. Hierfür erhielten wir Gewebe- und Serumproben für die weiteren Experimente. Unsere Fragestellung diente der Aufklärung, ob es einen direkten Zusammenhang zwischen dem Sympathikotonus und der Expression der beiden Rezeptorisoformen gibt.

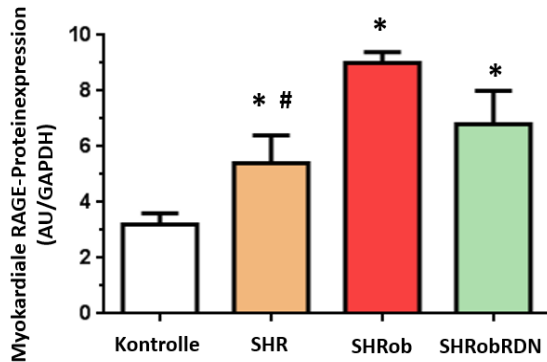
### 5.2.1 Renale Denervation verringert die RAGE- und erhöht die sRAGE-Expression im Myokard

Die RAGE- und sRAGE-Expression aus myokardialen Gewebehomogenaten wurde jeweils mittels Western Blot gemessen (Abbildung 19). Die Expression des RAGE war bei den SHRob-Versuchstieren im Vergleich zur SHR-Gruppe und den Kontrolltieren deutlich erhöht ( $9.0 \pm 0.4$  [AU/GAPDH] SHRob vs.  $5.4 \pm 1.0$  [AU/GAPDH] SHR und  $3.2 \pm 0.4$  [AU/GAPDH] Kontrolle;  $p=0.003$  für beide Vergleiche). Durch die renale Denervation konnte zwar keine signifikante Reduktion der RAGE-Expression erzielt werden, es zeigte sich jedoch ein Trend, dass RAGE in der SHRobRDN-Gruppe herunterreguliert wird ( $9.0 \pm 0.4$  [AU/GAPDH] SHRob vs.  $6.8 \pm 1.2$  [AU/GAPDH] SHRobRDN). Umgekehrt verhielt es sich bei der Analyse des sRAGE. Dabei zeigte sich in der SHRob-Gruppe ein signifikant reduzierter sRAGE-Gehalt im Vergleich zu den SHR-Versuchstieren und den Kontrolltieren ( $0.6 \pm 0.1$  [AU/GAPDH] SHRob vs.  $1.3 \pm 0.2$  [AU/GAPDH] SHR vs.  $2.6 \pm 0.2$  [AU/GAPDH] Kontrolle;  $p=0.042$  für SHRob vs. SHR). Durch den Eingriff konnte bei der SHRobRDN-Gruppe der sRAGE-Gehalt gegenüber der SHRob-Gruppe signifikant angehoben werden ( $1.2 \pm 0.1$  [AU/GAPDH] SHRobRDN vs.  $0.6 \pm 0.1$  [AU/GAPDH] SHRob;  $p=0.043$ ). Wir konnten eine positive Korrelation zwischen renalem Noradrenalinegehalt und kardialer RAGE-Expression feststellen ( $n=10$ ;  $r=0.93$ ;  $p=0.0003$ ) (Abbildung 20).

**A) Repräsentativer Western Blot der myokardialen RAGE- und sRAGE-Proteinexpression**



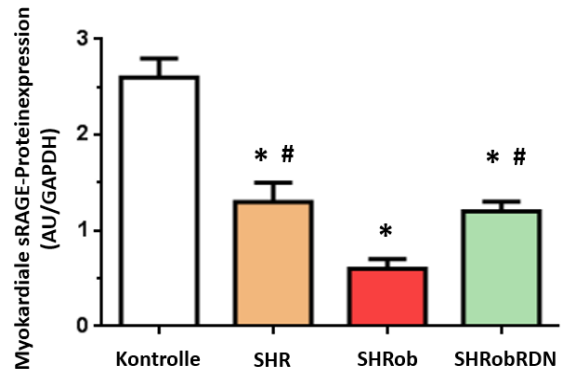
**B) Western Blot-Analyse der myokardialen RAGE-Proteinexpression**



\* p<0.05 vs. Kontrolle  
# p< vs. SHRob

Myokardiale	Kontrolle (n=5)	SHR (n=6)	SHRob (n=5)	SHRobRDN (n=5)
RAGE-Proteinexpression (AU/GAPDH)	3.2 ± 0.4	5.4 ± 1.0	9.0 ± 0.4	6.8 ± 1.2

**C) Western Blot-Analyse der myokardialen sRAGE-Proteinexpression**



\* p<0.05 vs. Kontrolle  
# p< vs. SHRob

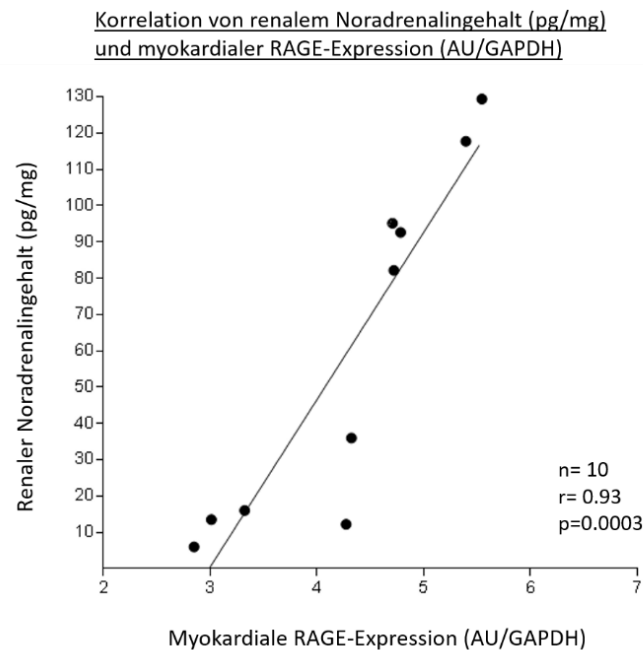
Myokardiale	Kontrolle (n=5)	SHR (n=6)	SHRob (n=5)	SHRobRDN (n=5)
sRAGE-Proteinexpression (AU/GAPDH)	2.6 ± 0.2	1.3 ± 0.2	0.6 ± 0.1	1.2 ± 0.1

**Abbildung 19: Western Blot-Analyse der myokardialen RAGE- und sRAGE-Proteinexpression**

**A) Repräsentativer Western Blot:** Myokardiale Gewebekomponenten von Kontrolltieren (n=5), SHR (n=6), SHRob (n=5) und SHRobRDN (n=5).

**B) Myokardiale RAGE-Proteinexpression:** Densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden in Bezug zur GAPDH-Proteinexpression. \*p<0.05 vs. Kontrolle; #p<0.05 vs. SHRob. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM.

**C) Myokardiale sRAGE-Proteinexpression:** Densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden in Bezug zur GAPDH-Proteinexpression. \*p<0.05 vs. Kontrolle; #p<0.05 vs. SHRob. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM.



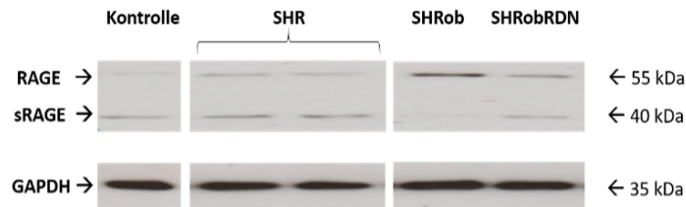
**Abbildung 20: Korrelation von renalem Noradrenalingehalt und myokardialer RAGE-Proteinexpression.**

Positive Korrelation zwischen renalem Noradrenalingehalt (pg/mg) und myokardialer RAGE-Proteinexpression (AU/GAPDH). Spearman-Korrelationsanalyse (n=10; r=0.93; p=0.0003).

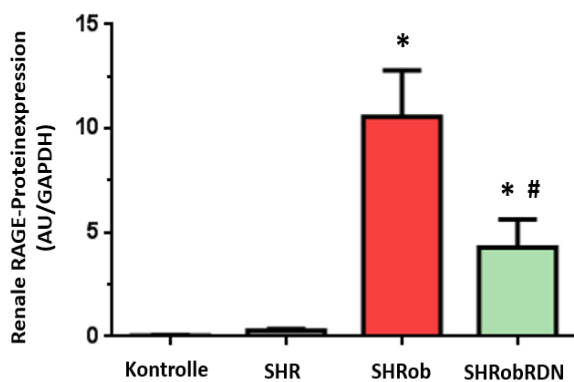
### 5.2.2 Renale Denervation verringert die RAGE- und erhöht die sRAGE-Expression im Nierengewebe

Die mittels Western Blot bestimmte renale RAGE- und sRAGE-Expression (Abbildung 21) zeigte bei den SHRob-Versuchstieren eine sehr starke Heraufregulation der RAGE-Expression im Vergleich zu den Kontrolltieren und den SHR-Versuchstieren ( $10.556 \pm 2.24$  [AU/GAPDH] SHRob vs.  $0.288 \pm 0.08$  [AU/GAPDH] SHR vs.  $0.042 \pm 0.01$  [AU/GAPDH] Kontrolle). Nach renaler Denervation war diese im Vergleich zu Kontrolltieren und SHR-Versuchstieren noch erhöht, wobei aber eine deutlich signifikante Herunterregulation des RAGE gegenüber den SHRob-Versuchstieren zu verzeichnen war ( $4.285 \pm 1.34$  [AU/GAPDH] SHRobRDN vs.  $10.556 \pm 2.24$  [AU/GAPDH] SHRob). Umgekehrt verhielt es sich mit der sRAGE-Expression, wobei die höchsten Werte die Kontrolltiere ( $10.72 \pm 2.85$  [AU/GAPDH] Kontrolle) und die niedrigsten Werte die SHRob-Versuchstiere ( $4.383 \pm 0.81$  [AU/GAPDH] SHRob) aufzeigten. Nach renaler Denervation war eine Zunahme der sRAGE-Expression zu verzeichnen ( $10.192 \pm 1.93$  [AU/GAPDH] SHRobRDN).

**A) Repräsentativer Western Blot der renalen RAGE- und sRAGE-Proteinexpression**



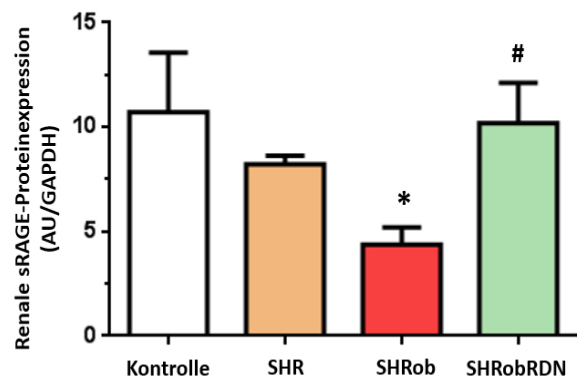
**B) Western Blot-Analyse der renalen RAGE-Proteinexpression**



\* $p < 0.05$  vs. Kontrolle und SHR  
# $p < 0.05$  vs. SHRob

Renale RAGE-Proteinexpression (AU/GAPDH)	Kontrolle (n=5)	SHR (n=6)	SHRob (n=5)	SHRobRDN (n=5)
	0.042 ± 0.01	0.288 ± 0.08	10.556 ± 2.24	4.285 ± 1.34

**C) Western Blot-Analyse der renalen sRAGE-Proteinexpression**



\* $p < 0.05$  vs. Kontrolle und SHR  
# $p < 0.05$  vs. SHRob

Renale sRAGE-Proteinexpression (AU/GAPDH)	Kontrolle (n=5)	SHR (n=6)	SHRob (n=5)	SHRobRDN (n=5)
	10.72 ± 2.85	8.218 ± 0.41	4.383 ± 0.81	10.192 ± 1.93

**Abbildung 21: Western Blot-Analyse der renalen RAGE- und sRAGE-Proteinexpression**

**A) Repräsentativer Western Blot:** Renale Gewebekomponenten von Kontrolltieren (n=5), SHR (n=6), SHRob (n=5) und SHRobRDN (n=5).

**B) Renale RAGE-Proteinexpression:** Densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden in Bezug zur GAPDH-Proteinexpression. \* $p < 0.05$  vs. Kontrolle und SHR; # $p < 0.05$  vs. SHRob. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM.

**C) Renale sRAGE-Proteinexpression:** Densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden in Bezug zur GAPDH-Proteinexpression. \* $p < 0.05$  vs. Kontrolle und SHR; # $p < 0.05$  vs. SHRob. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM.

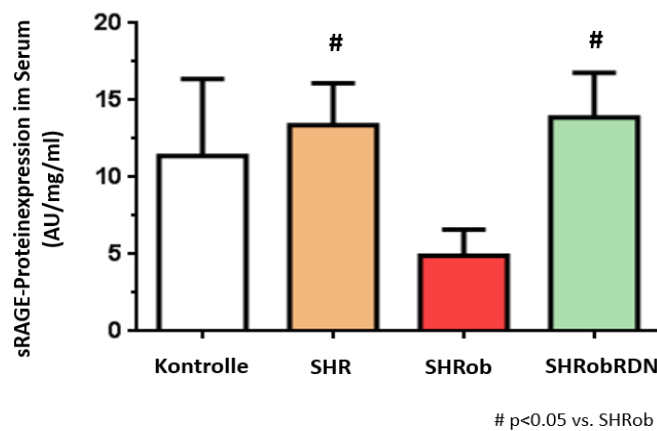
### 5.3 Renale Denervation erhöht die sRAGE-Expression im Serum

Um der Frage weiter auf den Grund zu gehen, inwiefern sich die renale Denervation systemisch auf den Organismus auswirkt, untersuchten wir den Einfluss der Drosselung des Sympathikus auf die sRAGE-Expression im Serum (Abbildung 22). Western Blot-Analysen aus Seren unserer Rattenmodelle zeigten, dass die sRAGE-Expression im Serum der SHRob-Versuchstiere im Vergleich zur SHR-Gruppe signifikant reduziert war ( $4.9 \pm 1.7$  [AU/mg/ml] SHRob vs.  $13.4 \pm 2.7$  [AU/mg/ml] SHR;  $p=0.006$ ). Nach renaler Denervation stieg die sRAGE Expression jedoch bei den SHRobRDN-Versuchstieren signifikant an ( $13.9 \pm 2.9$  [AU/mg/ml] SHRobRDN vs.  $4.9 \pm 1.7$  [AU/mg/ml] SHRob;  $p=0.033$ ).

**A) Repräsentativer Western Blot der sRAGE-Proteinexpression im Serum**



**B) Western Blot-Analyse der sRAGE-Proteinexpression im Serum**



sRAGE-Protein-expression im Serum (AU/mg/ml)	Kontrolle (n=5)	SHR (n=6)	SHRob (n=5)	SHRobRDN (n=5)
	$11.4 \pm 5.0$	$13.4 \pm 2.7$	$4.9 \pm 1.7$	$13.9 \pm 2.9$

**Abbildung 22: Western Blot-Analyse der sRAGE-Proteinexpression im Serum**

**A) Repräsentativer Western Blot:** Serumproben von Kontrolltieren (n=5), SHR (n=6), SHRob (n=5) und SHRobRDN (n=5).

**B) sRAGE-Proteinexpression:** Quantifizierung der Proteinbanden in Bezug zur GAPDH-Proteinexpression. # $p<0.05$  vs. SHRob. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM.

## 5.4 Auswirkungen der renalen Denervation auf RAGE-Liganden

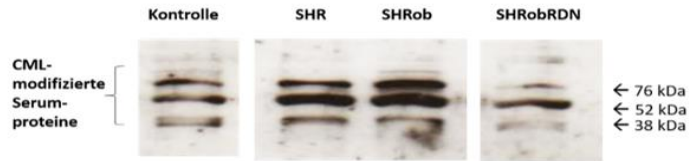
Nachdem bislang das Hauptaugenmerk auf den Rezeptor und dessen lösliche Isoform gerichtet war, sollte nun die Auswirkung des verminderten Katecholaminspiegels auf die Liganden des Rezeptors untersucht werden. Hierfür führten wir Western Blot-Analysen aus Seren sowie Myokard- und Nierengewebe der Versuchstiere durch, um die Proteinexpression des CML und HMGB1 zu detektieren. CML ist einer der Hauptvertreter der AGEs und HMGB1 ein zentraler Entzündungsmediator (Reddy et al., 1995; Nguyen et al., 2016; Lotze et al., 2005; Wang et al., 1999). Daher lässt die Höhe der CML- und HMGB1-Expression vor und nach renaler Denervation Rückschlüsse auf eine mögliche Immunomodulation in Abhängigkeit des Katecholaminspiegels zu.

### 5.4.1 Renale Denervation senkt den Serumspiegel sowie die myokardiale und renale Expression des CML (N $\epsilon$ -Carboxymethyllysin)

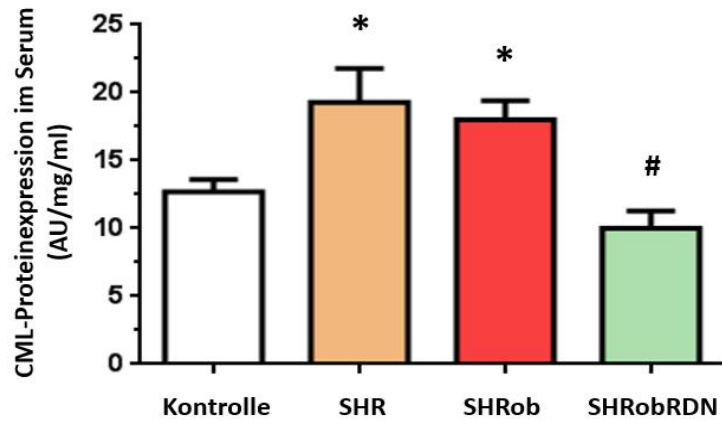
Die SHR-Versuchstiere und SHRob-Versuchstiere wiesen ähnlich hohe und im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich erhöhte CML-Serumspiegel auf ( $12.7 \pm 0.9$  [AU/mg/ml] Kontrolle vs.  $19.3 \pm 2.5$  [AU/mg/ml] SHR und  $18.0 \pm 1.4$  [AU/mg/ml] SHRob). Durch renale Denervation konnte eine signifikante Abnahme der CML-Bildung im Serum im Vergleich zur SHRobRDN-Gruppe verzeichnet werden ( $10.0 \pm 1.3$  [AU/mg/ml] SHRobRDN vs.  $18.0 \pm 1.4$  [AU/mg/ml] SHRob) (Abbildung 23A). Analog verhielt es sich mit der CML-Proteinexpression im Myokard (Abbildung 23B). Sowohl die SHR-Gruppe als auch die SHRob-Gruppe zeigten eine signifikant höhere CML-Proteinexpression im Myokard im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $12.1 \pm 1.2$  [AU/GAPDH] Kontrolle vs.  $16.5 \pm 1.4$  [AU/GAPDH] SHR und  $19.2 \pm 1.2$  [AU/GAPDH] SHRob). Auch hier konnte man eine signifikante Reduktion der CML-Proteinexpression nach renaler Denervation der SHRobRDN-Versuchstiere im Vergleich zu den SHRob-Versuchstieren ohne Eingriff feststellen ( $14.4 \pm 0.8$  [AU/GAPDH] SHRobRDN vs.  $19.2 \pm 1.2$  [AU/GAPDH] SHRob). Noch deutlicher als im Myokard zeigt sich das Verhalten der CML-Proteinexpression im Nierengewebe (Abbildung 23C). Während, wie zu erwarten, die geringste CML-Expression bei den Kontrolltieren zu vermerken ist ( $1.981 \pm 0.48$  [AU/GAPDH] Kontrolle), haben die SHR-Versuchstiere und die SHRob-Versuchstiere ähnlich hohe Werte ( $6.814 \pm 1.48$  [AU/GAPDH] SHR,  $8.25 \pm 0.85$  [AU/GAPDH] SHRob). Nach renaler Denervation sanken diese auf ähnlich niedrige Werte wie die der Kontrolltiere ab ( $2.164 \pm 0.36$  [AU/GAPDH] SHRobRDN).

**A) CML-Proteinexpression im Serum**

**1. Repräsentativer Western Blot der CML-Proteinexpression im Serum**



**2. Western Blot-Analyse der CML-Proteinexpression im Serum**

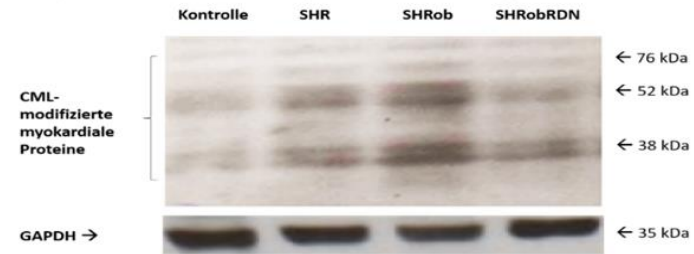


\*p<0.05 vs. Kontrolle; # p<0.05 vs. SHRob

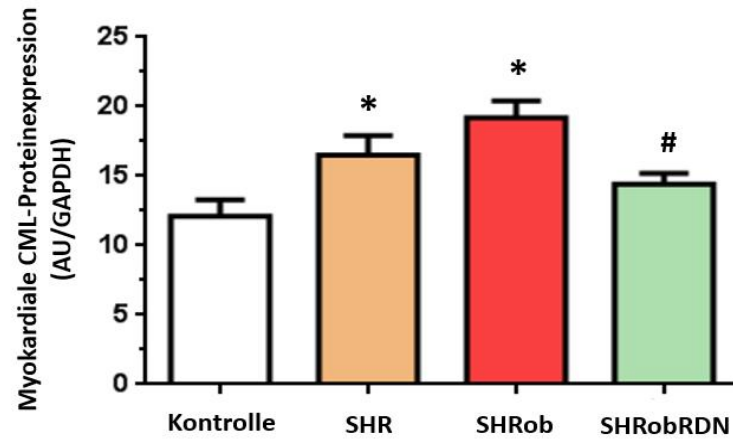
CML-Protein-expression im Serum (AU/mg/ml)	Kontrolle (n=5)	SHR (n=6)	SHRob (n=5)	SHRobRDN (n=5)
	12.7 ± 0.9	19.3 ± 2.5	18.0 ± 1.4	10.0 ± 1.3

**B) Myokardiale CML-Proteinexpression**

**1. Repräsentativer Western Blot der myokardialen CML-Proteinexpression**



**2. Western Blot-Analyse der myokardialen CML-Proteinexpression**

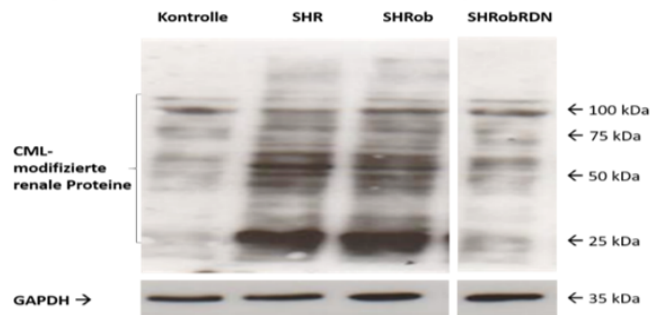


\*p<0.05 vs. Kontrolle; # p<0.05 vs. SHRob

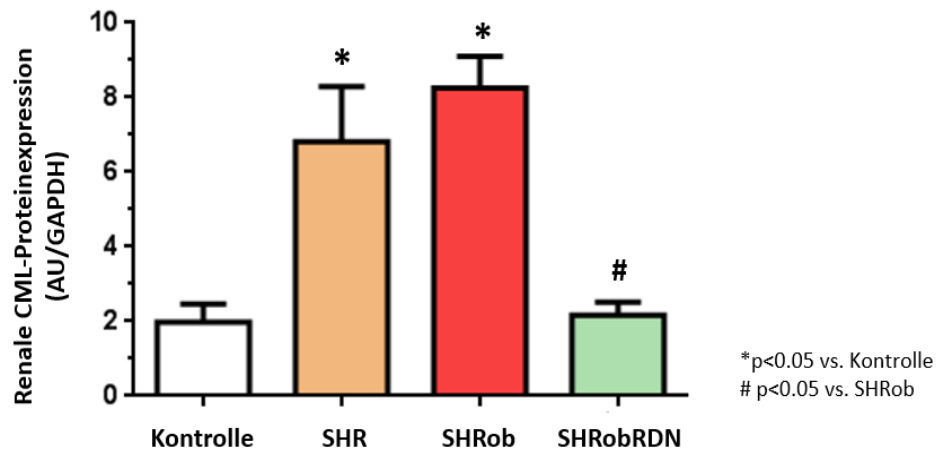
Myokardiale CML-Protein-expression (AU/GAPDH)	Kontrolle (n=5)	SHR (n=6)	SHRob (n=5)	SHRobRDN (n=5)
	12.1 ± 1.2	16.5 ± 1.4	19.2 ± 1.2	14.4 ± 0.8

### C) Renale CML-Proteinexpression

#### 1. Repräsentativer Western Blot der renalen CML-Proteinexpression



#### 2. Western Blot-Analyse der renalen CML-Proteinexpression



Renale CML-Protein-expression (AU/GAPDH)	Kontrolle (n=5)	SHR (n=6)	SHRob (n=5)	SHRobRDN (n=5)
	1.981 ± 0.48	6.814 ± 1.48	8.25 ± 0.85	2.164 ± 0.36

**Abbildung 23: Western Blot-Analyse der CML (Nε-Carboxymethyllysin) - Proteinexpression in Serum, Myokard und Niere**

**A) Western Blot-Analyse der CML-Proteinexpression im Serum:** 1. **Repräsentativer Western Blot:** Serumproben von Kontrolltieren (n=5), SHR (n=6), SHRob (n=5) und SHRobRDN (n=5). 2. **Densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden:** Die Werte sind jeweils auf die Serumproteinkonzentration bezogen. \*p<0.05 vs. Kontrolle; #p<0.05 vs. SHRob. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM.

**B) Western Blot-Analyse der myokardialen CML-Proteinexpression:** 1. **Repräsentativer Western Blot:** Myokardiale Gewebekomponenten von Kontrolltieren (n=5), SHR (n=6), SHRob (n=5) und SHRobRDN (n=5). 2. **Densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden:** Die Werte sind in Arbitrary units in Bezug auf die GAPDH-Proteinexpression angegeben. \*p<0.05 vs. Kontrolle; #p<0.05 vs. SHRob. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM.

**C) Western Blot-Analyse der renalen CML-Proteinexpression:** 1. **Repräsentativer Western Blot:** Renale Gewebeprobe von Kontrolltieren (n=5), SHR (n=6), SHRob (n=5) und SHRobRDN (n=5). 2. **Densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden:** Die Werte sind in Arbitrary units in Bezug auf die GAPDH-Proteinexpression angegeben. \*p<0.05 vs. Kontrolle; #p<0.05 vs. SHRob. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM.



#### 5.4.2 Renale Denervation senkt die Serumspiegel sowie die myokardiale und renale Expression des HMGB1 (High-Mobility-Group-Box 1)

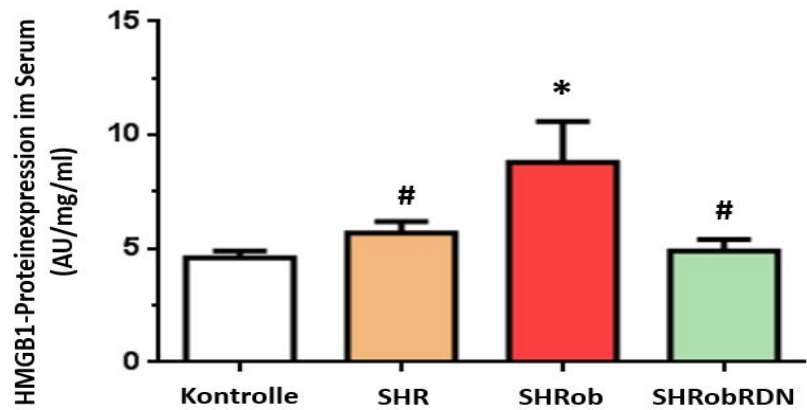
Als weiterer wichtiger RAGE-Ligand sollte HMGB1 und seine Expression im Myokard, den Nieren sowie seine Serumspiegel vor und nach renaler Denervation analysiert werden (Abbildung 24). Zwischen der SHRob-, der SHR- und der Kontrollgruppe zeigte sich ein signifikanter Unterschied der HMGB1-Serumspiegel, wobei die SHRob-Versuchstiere deutlich höhere Serumspiegel aufwiesen ( $8.8 \pm 1.8$  [AU/mg/ml] SHRob vs.  $5.7 \pm 0.5$  [AU/mg/ml] SHR und  $4.6 \pm 0.3$  [AU/mg/ml] Kontrolle;  $p=0.02$  für SHRob vs. SHR). Durch renale Denervation ließen sich diese signifikant reduzieren ( $4.9 \pm 0.5$  SHRobRDN vs.  $8.8 \pm 1.8$  [AU/mg/ml] SHRob;  $p=0.003$ ). Auch im Myokard der SHRob-Versuchstiere zeigte sich eine deutlich höhere HMGB1-Expression im Vergleich zur SHR-Gruppe und zu den Kontrolltieren ( $3.5 \pm 0.6$  [AU/GAPDH] SHRob vs.  $1.5 \pm 0.3$  [AU/GAPDH] SHR und  $1.5 \pm 0.2$  [AU/GAPDH] Kontrolle,  $p=0.005$  für jeden Vergleich). Auch hier konnten nach dem Eingriff dieselben Effekte, die wir bereits im Serum festgestellt haben, beobachtet werden. So sanken die Werte der HMGB1-Expression im Myokard der SHRobRDN-Versuchstiere auf ähnliche Werte wie die der SHR-Gruppe sowie der Kontrolltiere ( $1.7 \pm 0.4$  [AU/GAPDH] SHRobRDN vs.  $1.5 \pm 0.3$  [AU/GAPDH] SHR und  $1.5 \pm 0.2$  [AU/GAPDH] Kontrolle). Sehr deutlich zeigte sich eine erhöhte HMGB1-Expression im Nierengewebe der SHRob-Versuchstiere im Vergleich sowohl zu den Kontrolltieren als auch zur SHR-Gruppe ( $15.906 \pm 6.2$  [AU/GAPDH] SHRob vs.  $1.053 \pm 0.24$  [AU/GAPDH] SHR und  $0.30 \pm 0.02$  [AU/GAPDH] Kontrolle). Hier konnte ebenfalls nach renaler Denervation eine deutliche Reduktion des renalen HMGB1-Gehaltes verzeichnet werden ( $1.983 \pm 0.69$  [AU/GAPDH] SHRobRDN).

**A) HMGB1-Proteinexpression im Serum**

**1. Repräsentativer Western Blot der HMGB1-Proteinexpression im Serum**



**2. Western Blot-Analyse der HMGB1-Proteinexpression im Serum**

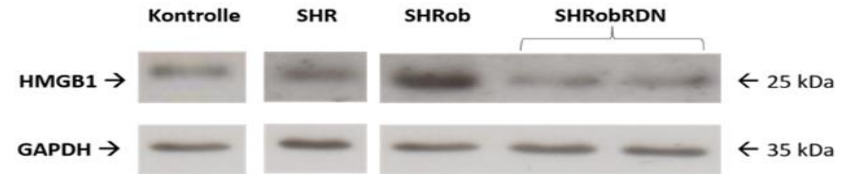


\*p<0.05 vs. Kontrolle  
#p<0.05 vs. SHRob

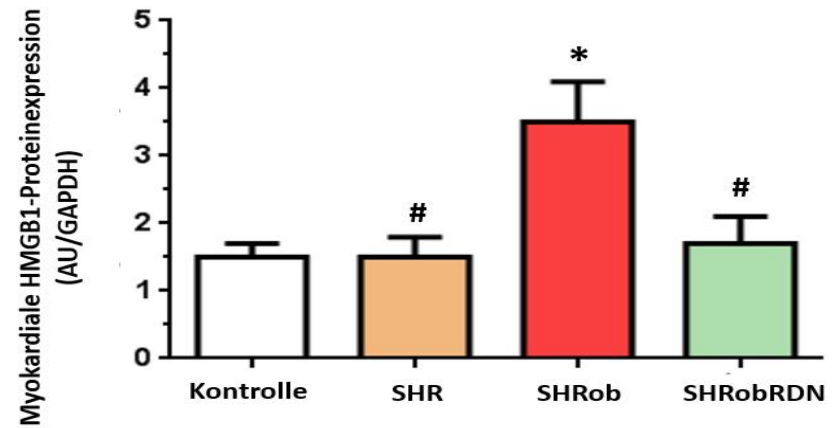
HMGB1-Protein-expression im Serum (AU/mg/ml)	Kontrolle (n=5)	SHR (n=6)	SHRob (n=5)	SHRobRDN (n=5)
	4.6 ± 0.3	5.7 ± 0.5	8.8 ± 1.8	4.9 ± 0.5

**B) Myokardiale HMGB1-Proteinexpression**

**1. Repräsentativer Western Blot der myokardialen HMGB1-Proteinexpression**



**2. Western Blot-Analyse der myokardialen HMGB1-Proteinexpression**

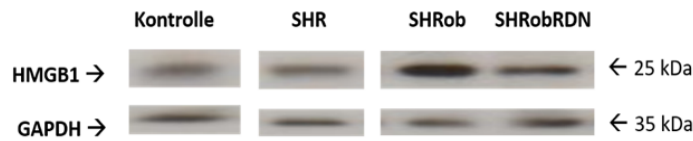


\*p<0.05 vs. Kontrolle  
#p<0.05 vs. SHRob

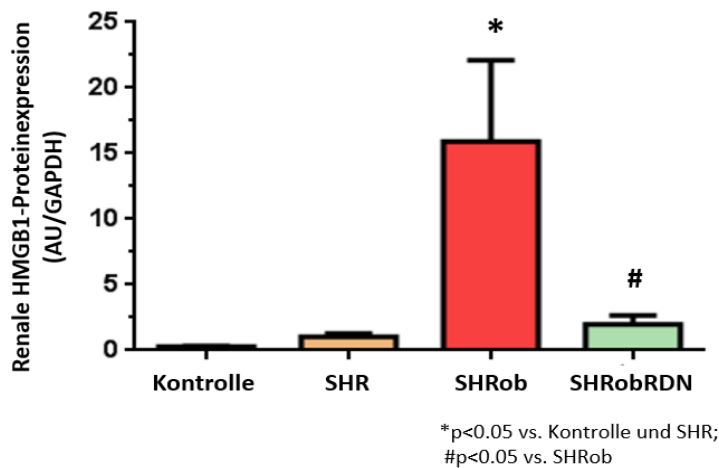
Myokardiale HMGB1-Protein-expression (AU/GAPDH)	Kontrolle (n=5)	SHR (n=6)	SHRob (n=5)	SHRobRDN (n=5)
	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.3	3.5 ± 0.6	1.7 ± 0.4

**C) Renale HMGB1-Proteinexpression**

**1. Repräsentativer Western Blot der renalen HMGB1-Proteinexpression**



**2. Western Blot-Analyse der renalen HMGB1-Proteinexpression**



Renale HMGB1-Proteinexpression (AU/GAPDH)	Kontrolle (n=5)	SHR (n=6)	SHRob (n=5)	SHRobRDN (n=5)
	0.30 ± 0.02	1.053 ± 0.24	15.906 ± 6.2	1.983 ± 0.69

**Abbildung 24: Western Blot-Analyse der HMGB1 (High Mobility Group Box 1) - Proteinexpression in Serum, Myokard und Niere**

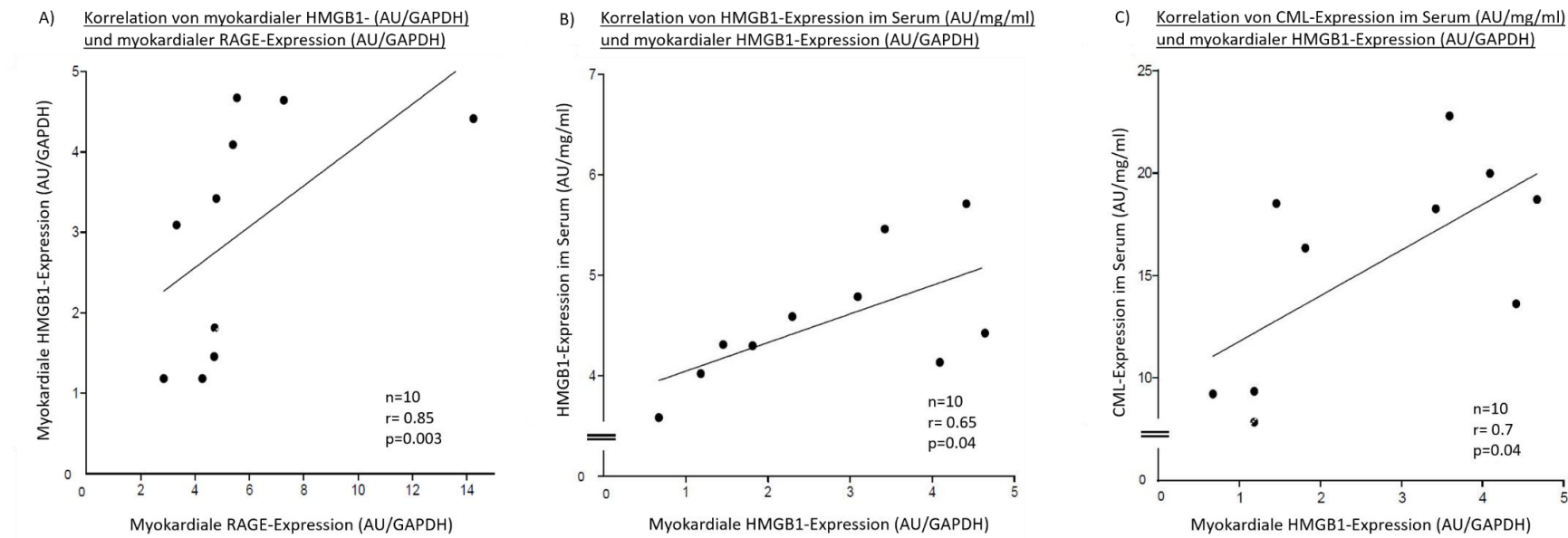
**A) Western Blot-Analyse der HMGB1-Proteinexpression im Serum: 1. Repräsentativer Western Blot:** Serumproben von Kontrolltieren (n=5), SHR (n=6), SHRob (n=5) und SHRobRDN (n=5). **2. Densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden:** Die Werte sind jeweils als Arbitrary units auf die Serumproteinkonzentration bezogen. \*p<0.05 vs. Kontrolle; #p<0.05 vs. SHRob. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM.

**B) Western Blot-Analyse der myokardialen HMGB1-Proteinexpression: 1. Repräsentativer Western Blot:** Myokardiale Gewebekomponenten von Kontrolltieren (n=5), SHR (n=6), SHRob (n=5) und SHRobRDN (n=5). **2. Densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden:** Die Werte sind in Arbitrary units in Bezug auf die GAPDH-Proteinexpression angegeben. \*p<0.05 vs. Kontrolle; #p<0.05 vs. SHRob. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM.

**C) Western Blot-Analyse der renalen HMGB1-Proteinexpression: 1. Repräsentativer Western Blot:** renale Gewebekomponenten von Kontrolltieren (n=5), SHR (n=6), SHRob (n=5) und SHRobRDN (n=5). **2. Densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden:** Die Werte sind in Arbitrary units in Bezug auf die GAPDH-Proteinexpression angegeben. \*p<0.05 vs. Kontrolle und SHR; #p<0.05 vs. SHRob. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM.

### 5.4.3 Korrelationen zwischen CML- sowie HMGB1-Expression und myokardialer RAGE-Expression

Wir prüften zudem die Korrelation zwischen myokardialer HMGB1-Expression und myokardialer RAGE-Expression sowie der HMGB1-Expression im Serum bzw. der CML-Expression im Serum (Abbildung 25). Hierbei konnten wir feststellen, dass bei den SHRob- und den SHRobRDN-Versuchstieren die myokardiale HMGB1-Expression zur myokardialen RAGE-Expression signifikant positiv korrelierte (myokardiale HMGB1-Expression vs. myokardialer RAGE-Expression;  $n=10$ ,  $r=0.85$ ,  $p=0.003$ ). Ebenso korrelierte die myokardiale HMGB1-Expression signifikant positiv zur HMGB1-Expression im Serum ( $n=10$ ;  $r=0.65$ ;  $p=0.04$ ), sowie zur CML-Expression im Serum ( $n=10$ ;  $r=0.7$ ;  $p=0.04$ ).



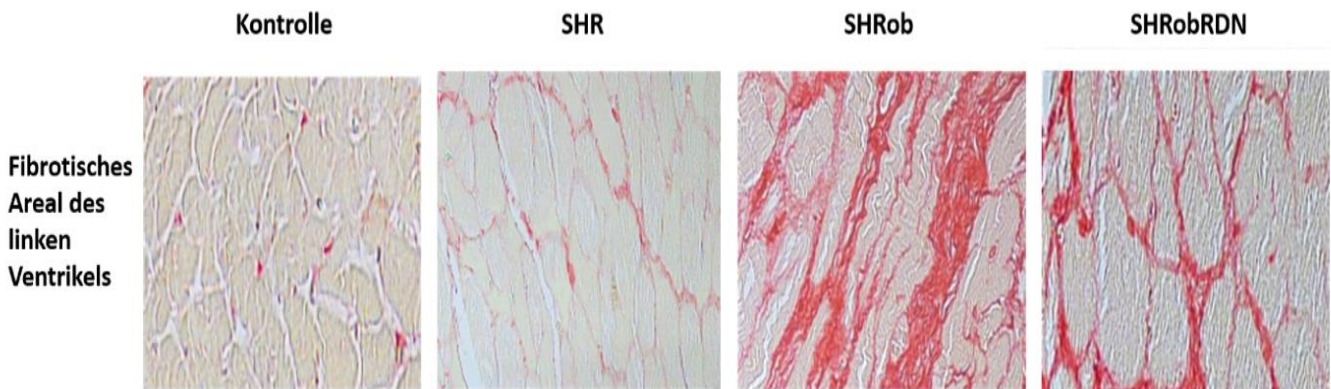
**Abbildung 25: Korrelation von myokardialer HMGB1-Proteinexpression und myokardialer RAGE-Proteinexpression, myokardialer HMGB1- und CML-Proteinexpression im Serum**

**A)** Positive Korrelation zwischen myokardialer HMGB1- (AU/GAPDH) und myokardialer RAGE-Proteinexpression (AU/GAPDH). Spearman-Korrelationsanalyse ( $n=10$ ;  $r=0.85$ ;  $p=0.003$ ). **B)** Positive Korrelation zwischen myokardialer HMGB1- (AU/GAPDH) und HMGB1-Proteinexpression (AU/GAPDH) im Serum. Spearman-Korrelationsanalyse ( $n=10$ ;  $r=0.65$ ;  $p=0.04$ ). **C)** Positive Korrelation zwischen myokardialer HMGB1- (AU/GAPDH) und CML-Proteinexpression (AU/GAPDH) im Serum. Spearman-Korrelationsanalyse ( $n=10$ ;  $r=0.7$ ;  $p=0.04$ ).

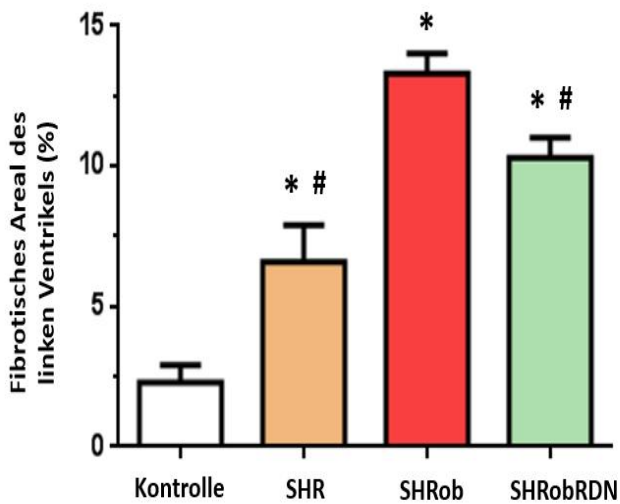
## 5.5 Effekte der renalen Denervation auf Myokardfibrose

Nachdem die Effekte der renalen Denervation auf die Expression des RAGE und dessen Liganden untersucht wurden, sollte die Ausdehnung der Fibrose in Herz und Niere untersucht und der Frage nachgegangen werden, ob die Drosselung der renalen Sympathikusaktivität diese positiv beeinflusst (Abbildung 26). Tatsächlich konnten wir nachweisen, dass die SHRob-Gruppe einen deutlich höheren Fibroseanteil im Myokard aufwies als die SHR-Gruppe ( $13.3 \pm 0.7$  [%] SHRob vs.  $6.6 \pm 1.3$  [%] SHR;  $p < 0.001$ ). Nach dem Eingriff nahm der Fibroseanteil signifikant ab ( $10.3 \pm 0.7$  [%] SHRobRDN vs.  $13.3 \pm 0.7$  [%] SHRob,  $p = 0.041$ ). Das myokardiale Fibroseareal korrelierte positiv zum renalen Noradrenaliningehalt ( $n = 10$ ;  $r = 0.72$ ;  $p = 0.02$ ) sowie zur CML-Expression im Serum ( $n = 10$ ;  $r = 0.76$ ;  $p = 0.04$ ) und negativ zur myokardialen sRAGE-Expression ( $n = 10$ ;  $r = -0.79$ ;  $p = 0.004$ ) (Abbildung 27).

**A) Picro-Siriusrot-Kollagenfärbung aus repräsentativen Schnitten des linken Ventrikels**



**B) Auswertung der Picro-Siriusrot-Kollagenfärbung des linken Ventrikels**



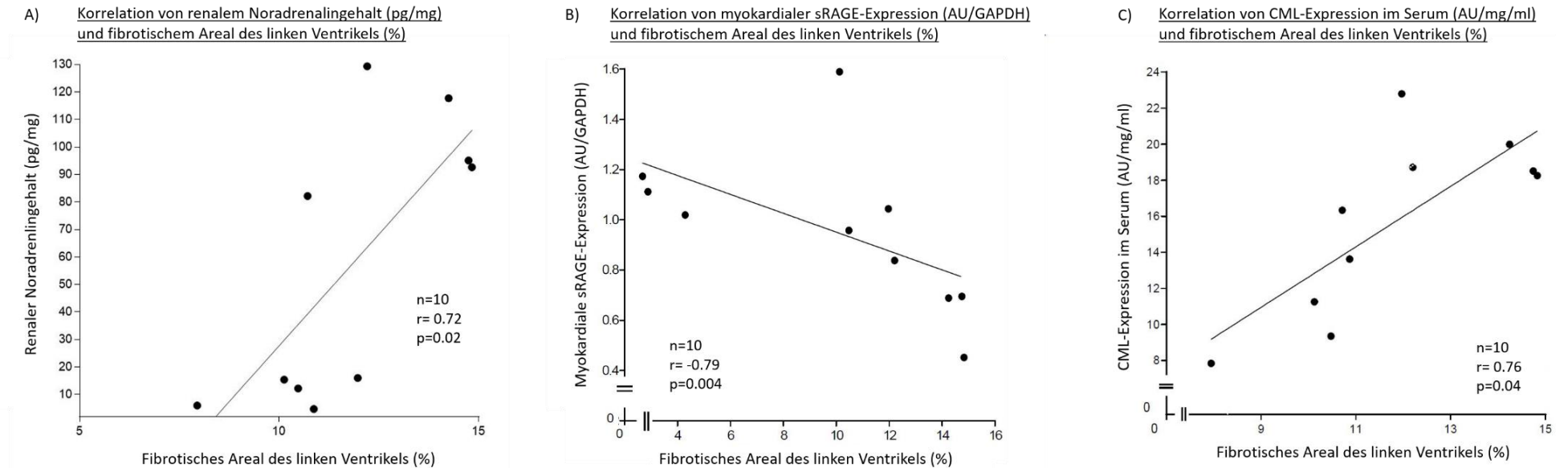
Fibrotisches Areal des linken Ventrikels (%)	Kontrolle (n=5)	SHR (n=6)	SHRob (n=5)	SHRobRDN (n=5)
	2.3 ± 0.6	6.6 ± 1.3	13.3 ± 0.7	10.3 ± 0.7

\*p<0.05 vs. Kontrolle  
# p<0.05 vs. SHRob

**Abbildung 26: Interstitielle Myokardfibrose**

**A) Picro-Siriusrot-Kollagenfärbung aus repräsentativen Schnitten des linken Ventrikels:** Vergrößerung 20x, Mikroskop Nikon TIS/L100 **B) Auswertung der Picro-Siriusrot-Kollagenfärbung des linken Ventrikels:** Angegeben als prozentualer Anteil des interstitiellen Kollagens aus Myokardgeweben der Kontrolltiere (n=5), SHR (n=6), SHRob (n=5) und SHRobRDN (n=5). \*p<0.05 vs. Kontrolle, #p<0.05 vs. SHRob. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM.

## Ergebnisse

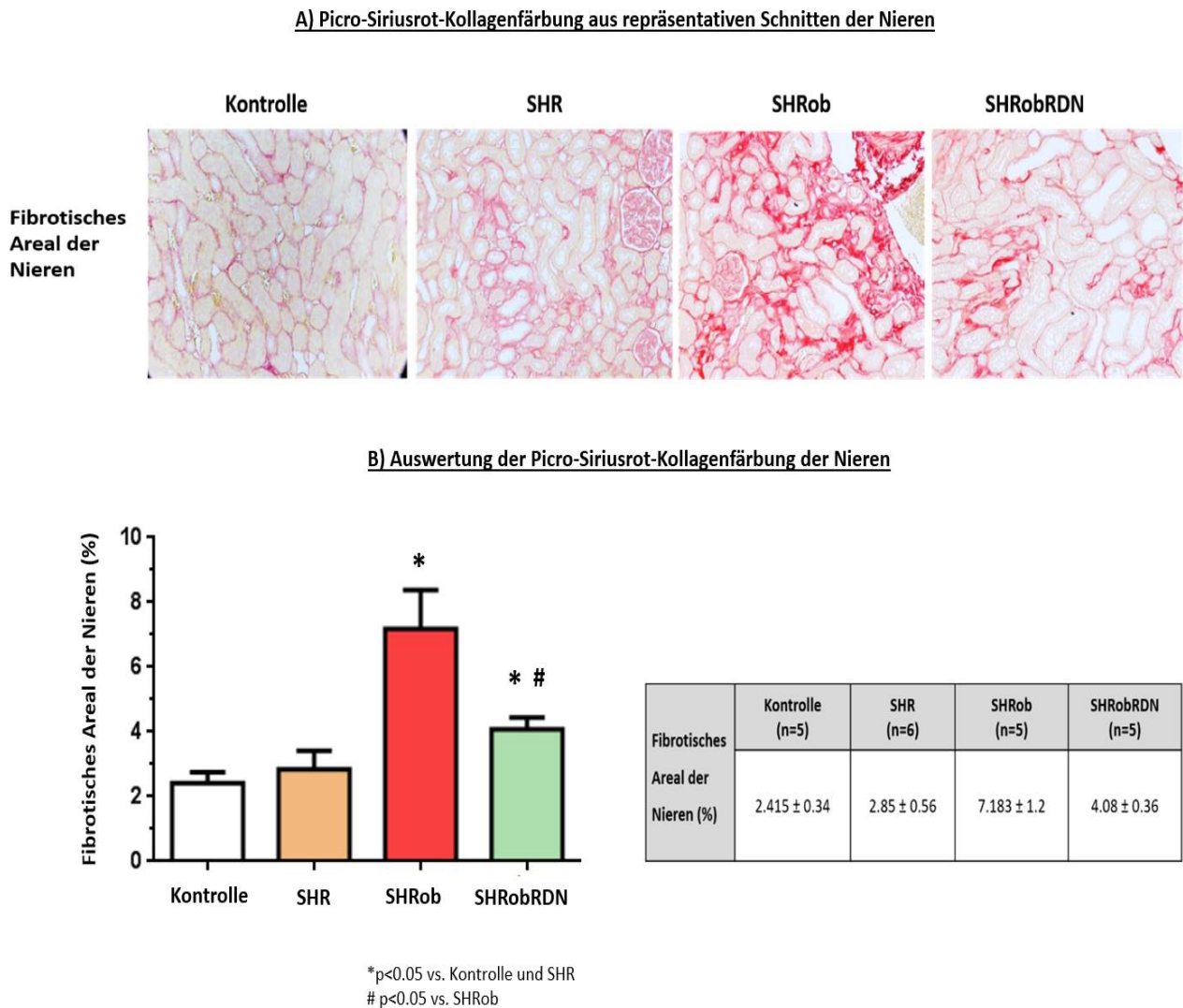


**Abbildung 27: Korrelation von interstitieller Myokardfibrose und renalem Noradrenalingehalt, myokardialer sRAGE-Proteinexpression und CML-Proteinexpression im Serum**

**A)** Positive Korrelation zwischen renalem Noradrenalingehalt (pg/mg) und interstitieller Myokardfibrose (%). Spearman-Korrelationsanalyse (n=10; r=0.72; p=0.02). **B)** Negative Korrelation zwischen myokardialer sRAGE-Proteinexpression (AU/GAPDH) und interstitieller Myokardfibrose (%). Spearman-Korrelationsanalyse (n=10; r=-0.79; p=0.004). **C)** Positive Korrelation zwischen CML-Proteinexpression im Serum (AU/mg/ml) und interstitieller Myokardfibrose (%). Spearman-Korrelationsanalyse (n=10; r=0.76; p=0.04).

## 5.6 Effekte der renalen Denervation auf renale Fibrose

Während die Kontrolltiere und die SHR-Versuchstiere ein ähnliches Ausmaß an fibrotischem Nierengewebe aufwiesen ( $2.415 \pm 0.34$  [%] Kontrolle vs.  $2.85 \pm 0.56$  [%] SHR), hatten die SHRob-Versuchstiere die am stärksten ausgeprägte renale Fibrose ( $7.183 \pm 1.2$  [%] SHRob). Diese zeigte sich nach dem Eingriff deutlich rückläufig ( $4.08 \pm 0.36$  [%] SHRobRDN) (Abbildung 28).



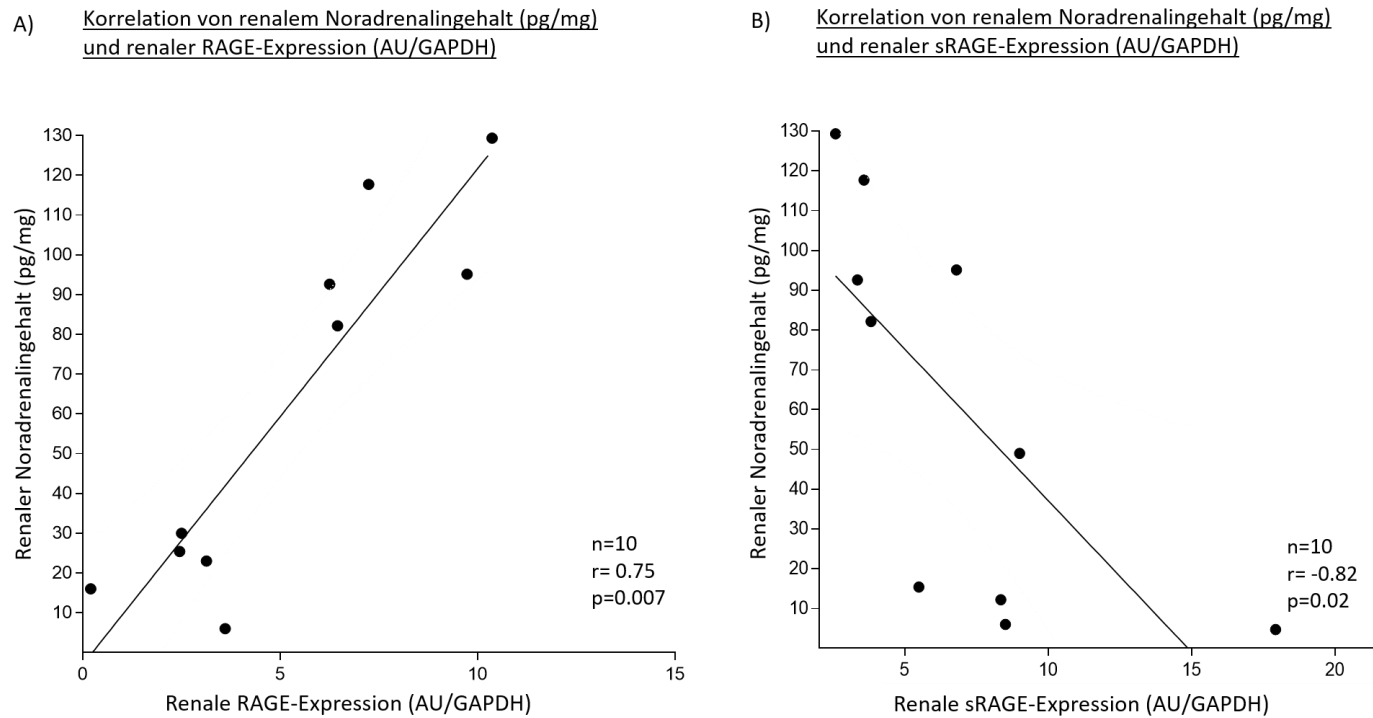
**Abbildung 28: Interstitielle renale Fibrose**

**A) Picro-Siriusrot-Kollagenfärbung aus repräsentativen Schnitten der Nieren:** Vergrößerung 20x, Mikroskop Nikon TiS/L100 **B) Auswertung der Picro-Siriusrot-Kollagenfärbung:** Angegeben als prozentualer Anteil des interstitiellen Kollagens aus Nierengewebe der Kontrolltiere (n=5), SHR (n=6), SHRob (n=5) und SHRobRDN (n=5). \* $p < 0.05$  vs. Kontrolle und SHR; # $p < 0.05$  vs. SHRob. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM.



### 5.6.1 Korrelation zwischen renalem Noradrenalingehalt und renaler RAGE- bzw. sRAGE-Expression

Der renale Noradrenalingehalt korrelierte positiv zur renalen RAGE-Expression ( $n=10$ ;  $r=0.75$ ;  $p=0.007$ ) und negativ zur renalen sRAGE-Expression ( $n=10$ ;  $r=-0.82$ ;  $p=0.02$ ) (Abbildung 29).



**Abbildung 29: Korrelation von renalem Noradrenalingehalt und renaler RAGE-Proteinexpression bzw. renaler sRAGE-Proteinexpression**

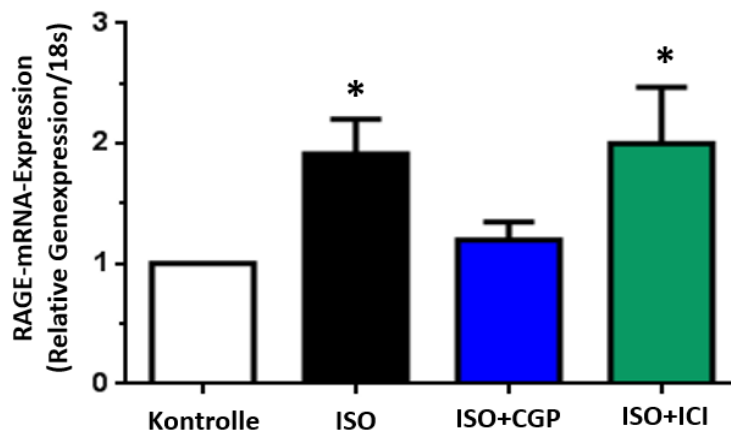
**A)** Positive Korrelation zwischen renalem Noradrenalingehalt (pg/mg) und renaler RAGE-Proteinexpression (AU/GAPDH). Spearman-Korrelationsanalyse ( $n=10$ ;  $r=0.75$ ;  $p=0.007$ ).  
**B)** Negative Korrelation zwischen renaler sRAGE-Proteinexpression (AU/GAPDH) und renalem Noradrenalingehalt (pg/mg). Spearman-Korrelationsanalyse ( $n=10$ ;  $r=-0.82$ ;  $p=0.02$ )

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in vivo durchgeführten Experimente einen positiven Einfluss der renalen Denervation auf das RAGE/sRAGE-Verhältnis sowie auf die Expression der RAGE-Liganden aufzeigen. Des Weiteren konnten positive Effekte auf die Fibrose in Herz und Niere sowie auf kardiale und renale Funktionsparameter verzeichnet werden. Um weiter zu prüfen, ob diese Beobachtungen bezüglich der RAGE- und sRAGE-Expression blutdruckunabhängig sind, folgten weitere in vitro Experimente. Dabei wurden verschiedene Zellpopulationen jeweils mit dem  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -sympathoadrenergen Agonisten Isoproterenol stimuliert und anschließend die Expression des RAGE und der protektiven, löslichen Isoform sRAGE auf Protein- und RNA-Ebene untersucht.

### **5.7 RAGE- und sRAGE-Expression in adulten Rattensplenozyten unter Katecholamineinfluss**

Frisch isolierte Rattensplenozyten wurden alle 24 Stunden über einen Zeitraum von 72 Stunden mit Isoproterenol (0,1  $\mu\text{mol/l}$ ) stimuliert. Hierbei konnten wir feststellen, dass sowohl die mRNA-Expression des RAGE (Abbildung 30) als auch die membranöse RAGE-Proteinexpression nach 72 Stunden signifikant anstieg (Abbildung 31 A). Genau umgekehrt verhielt es sich mit der sRAGE-Sekretion ins Zellkulturmedium (Abbildung 31 B). Hierbei kam es zu einer stetigen Abnahme der sRAGE-Sekretion unter Isoproterenol, welche nach 72 Stunden signifikant abgenommen hatte. Um zu prüfen, ob es eine mögliche  $\beta$ -Adrenorezeptoraffinität der Katecholamine bezüglich der membranösen RAGE-Expression sowie der Sekretion des löslichen RAGE (sRAGE) ins Zellkulturmedium gibt, wurden die Zellen zusätzlich zu Isoproterenol mit den  $\beta_1$ - bzw.  $\beta_2$ -selektiven Adrenorezeptorantagonisten behandelt. Die RAGE mRNA-Expression nahm durch die Stimulation mit Isoproterenol im Vergleich zur Kontrolle und den Zellen, die noch zusätzlich zu Isoproterenol mit dem  $\beta_1$ -selektiven-Adrenorezeptorblocker CGP behandelt wurden, deutlich zu. Auch zeigte die Stimulation mit Isoproterenol unter gleichzeitiger Behandlung mit dem  $\beta_2$ -selektiven Adrenorezeptorblocker ICI, eine signifikante Zunahme der RAGE-Expression im Vergleich zur Kontrolle und zur zeitgleichen Stimulation mit Isoproterenol und CGP. Western Blot-Analysen auf die Apoptosemarker BAX und BCL-2 zeigten eine ähnlich hohe Zellvitalität zwischen den Zellen, die mit Isoproterenol stimuliert wurden, und den Kontrollzellen. Daraus lässt sich schließen, dass die beobachteten Effekte nicht auf eine insgesamt verminderte Zelldichte zurückzuführen sind (keine Abbildung).

**RAGE-mRNA-Expression in Rattensplenozyten**



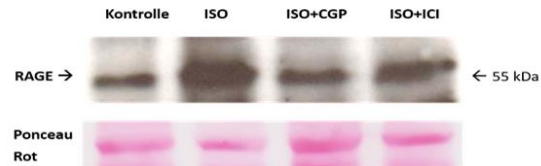
\*p<0.05 vs. Kontrolle und ISO+CGP

**Abbildung 30: Quantifizierung der RAGE-mRNA (messenger Ribonukleinsäure) - Expression in Rattensplenozyten**

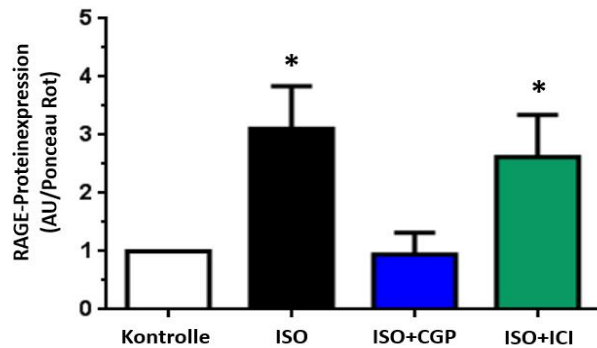
Quantifizierung der RAGE-mRNA-Expression in Kontrollzellen, Isoproterenol-stimulierten Zellen und jeweils Isoproterenol plus  $\beta_1$ -selektiven-Adrenorezeptorblocker CGP und  $\beta_2$ -selektiven-Adrenorezeptorblocker ICI. Die Daten werden angegeben als Ct-Werte in Relation zum internen Standard (Houskeeping-Gen) als Verhältnis von RAGE-mRNA-Expression zu 18s. \*p<0.05 vs. Kontrolle und ISO+CGP.

**A) Membranöse RAGE-Proteinexpression auf Rattensplenozyten**

**1. Repräsentativer Western Blot der RAGE-Proteinexpression auf Rattensplenozyten**



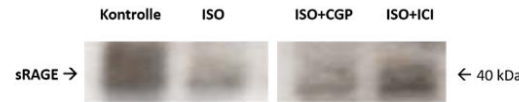
**2. Western Blot-Analyse der membranösen RAGE-Proteinexpression auf Rattensplenozyten**



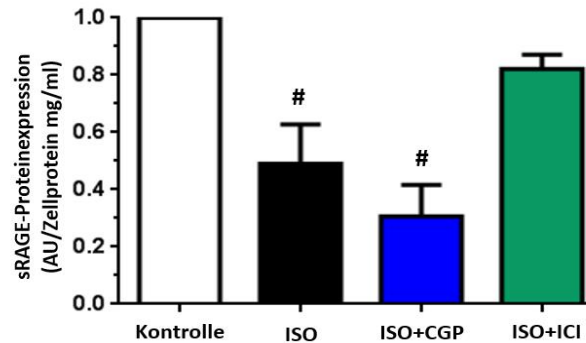
\*p<0.05 vs. Kontrolle und ISO+CGP

**B) sRAGE-Proteinexpression im Zellkulturmedium von Rattensplenozyten**

**1. Repräsentativer Western Blot der sRAGE-Proteinexpression im Zellkulturmedium von Rattensplenozyten**



**2. Western Blot-Analyse der sRAGE-Proteinexpression im Zellkulturmedium von Rattensplenozyten**



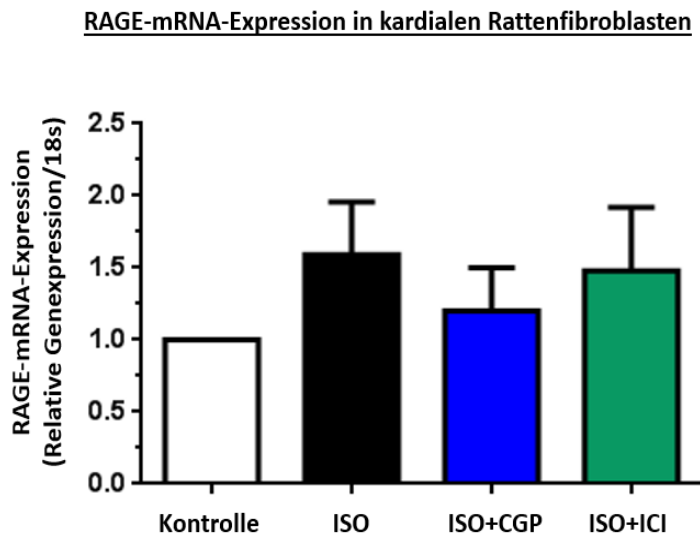
\*p<0.05 vs. Kontrolle und ISO+ICI

**Abbildung 31: Western Blot-Analyse der RAGE/sRAGE-Expression der Rattensplenozyten**

**A) Membranöse RAGE-Proteinexpression auf Rattensplenozyten 1. Repräsentativer Western Blot der RAGE-Proteinexpression auf Rattensplenozyten:** Zellhomogenate von Kontrollzellen, Isoproterenol-stimulierten und jeweils Isoproterenol plus  $\beta_1$ -selektiven-Adrenorezeptorblocker CGP und  $\beta_2$ -selektiven-Adrenorezeptorblocker ICI-stimulierten Zellen. **2. Densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden:** Die RAGE-Proteinexpression wird angegeben als Arbitrary units/Ponceau Rot. \*p<0.05 vs. Kontrolle und ISO+CGP. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM. **B) sRAGE-Proteinexpression im Zellkulturmedium von Rattensplenozyten 1. Repräsentativer Western Blot der sRAGE-Proteinexpression im Zellkulturmedium von Rattensplenozyten:** Zellkulturmedium von Kontrollzellen, Isoproterenol-stimulierten und jeweils Isoproterenol plus  $\beta_1$ -selektiven-Adrenorezeptorblocker CGP und  $\beta_2$ -selektiven-Adrenorezeptorblocker ICI-stimulierten Zellen. **2. Densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden:** Die sRAGE-Proteinexpression wird angegeben als Arbitrary units in Bezug zur Proteinkonzentration. #p<0.05 vs. Kontrolle und ISO+ICI. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM.

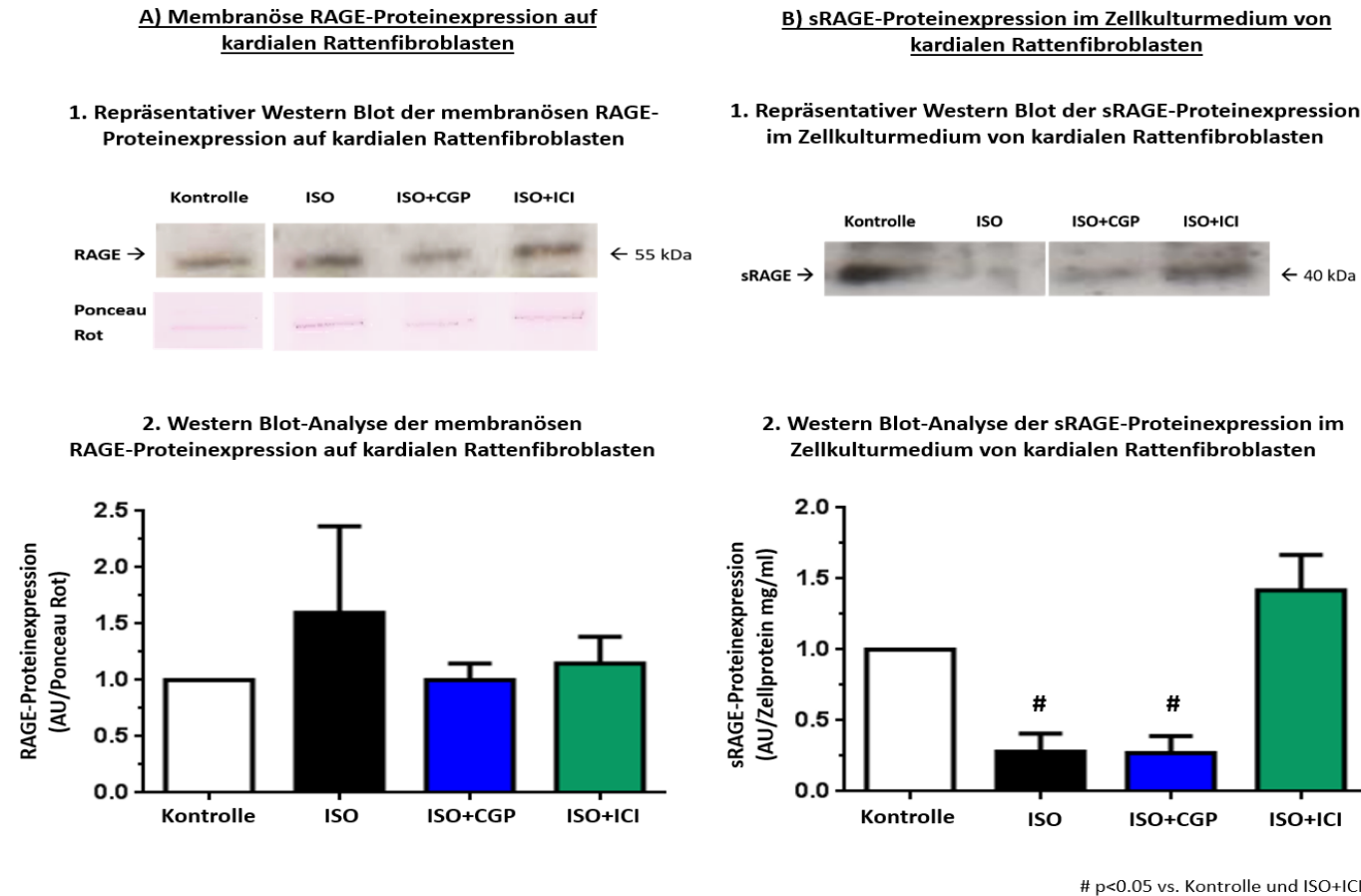
## **5.8 RAGE- und sRAGE-Expression in adulten kardialen Rattenfibroblasten unter Katecholamineinfluss**

Adulte kardiale Rattenfibroblasten (n=4) wurden ebenfalls direkt nach Isolation alle 24 Stunden über einen Zeitraum von 72 Stunden mit Isoproterenol (0,1  $\mu\text{mol/l}$ ) stimuliert. Dabei konnten wir beobachten, dass die sRAGE-Sekretion ins Zellkulturmedium zeitabhängig abnahm, sodass nach 72 Stunden die sRAGE-Sekretion im Vergleich zum Ausgangswert sank (Abbildung 33 B). Wie bei den Rattensplenozyten, zeigten Western Blot-Analysen auf die Apoptosemarker BAX und BCL-2 (keine Abbildung gezeigt), dass die Zellvitalität der mit Isoproterenol stimulierten Zellen ähnlich hoch wie die der Kontrolle war, sodass die beobachteten Effekte nicht auf eine insgesamt verminderte Zelldichte zurückzuführen sind. Die RAGE-Expression zeigte weder auf mRNA-Ebene (Abbildung 32) noch auf Proteinebene eine signifikante Zunahme der membranösen RAGE-Expression nach 72 Stunden (Abbildung 33 A). Auch bei den adulten kardialen Rattenfibroblasten galt es der Frage nachzugehen, ob die Effekte des Isoproterenol einer Rezeptorspezifität unterliegen. Daher führten wir auch an diesen Zellen Experimente mit  $\beta_1$ - bzw.  $\beta_2$ -selektiven Adrenorezeptorantagonisten durch (Abbildung 34 A). Hierbei konnten wir keine eindeutigen Unterschiede in der RAGE-Expression der verschiedenen Zellgruppen feststellen. Allerdings zeigte sich die Tendenz, dass die RAGE-Expression sowohl auf mRNA-Ebene als auch die membranöse RAGE-Expression unter Isoproterenol allein und mit zusätzlicher  $\beta_2$ -selektiven Adrenorezeptorblockade zunahm. Die Zellen, die mit  $\beta_1$ -selektiven Adrenorezeptorblocker behandelt wurden, exprimierten tendenziell weniger RAGE. Deutlich signifikante Ergebnisse erhielten wir bei der Untersuchung auf die sRAGE-Sekretion ins Zellkulturmedium (Abbildung 33 B). Hierbei sezernierten die Zellen, die mit Isoproterenol und Isoproterenol mit zusätzlicher  $\beta_1$ -selektiver Adrenorezeptorblockade behandelt wurden, erheblich weniger sRAGE in das Zellkulturmedium. Im Gegensatz dazu wiesen die Zellen, die mit Isoproterenol plus  $\beta_2$ -selektiven Adrenorezeptorantagonisten behandelt wurden, im Vergleich zur Kontrolle einen höheren sRAGE Gehalt im Zellkulturmedium auf.



**Abbildung 32: Quantifizierung der RAGE-mRNA-Expression in kardialen Rattenfibroblasten**

Quantifizierung der RAGE-mRNA-Expression in Kontrollzellen, Isoproterenol-stimulierten Zellen und jeweils Isoproterenol plus  $\beta_1$ -selektiven-Adrenorezeptorblocker CGP und  $\beta_2$ -selektiven-Adrenorezeptorblocker ICI. Die Daten werden angegeben als Ct-Werte in Relation zum internen Standard (Houskeeping-Gen) als Verhältnis von RAGE-mRNA-Expression zu 18s.



**Abbildung 33: Western Blot-Analyse der RAGE/sRAGE-Proteinexpression in kardialen Rattenfibroblasten**

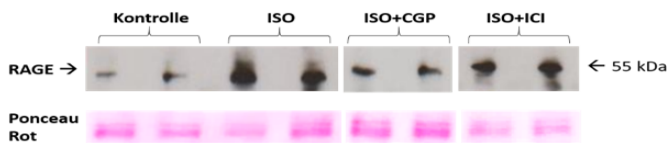
**A) Membranöse RAGE-Proteinexpression auf kardialen Rattenfibroblasten** 1. **Repräsentativer Western Blot:** Zellhomogenate von Kontrollzellen, Isoproterenol-stimulierten und jeweils Isoproterenol plus  $\beta_1$ -selektiven-Adrenorezeptorblocker CGP und  $\beta_2$ -selektiven-Adrenorezeptorblocker ICI-stimulierten Zellen. 2. **Densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden:** Die RAGE-Proteinexpression wird als Arbitrary units/Ponceau Rot angegeben. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM. **B) sRAGE-Proteinexpression im Zellkulturmedium der kardialen Rattenfibroblasten** 1. **Repräsentativer Western Blot:** Zellkulturmedien von Kontrollzellen, Isoproterenol-stimulierten und jeweils Isoproterenol plus  $\beta_1$ -selektiven-Adrenorezeptorblocker CGP und  $\beta_2$ -selektiven-Adrenorezeptorblocker ICI-stimulierten Zellen. 2. **Densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden:** Die sRAGE-Proteinexpression wird angegeben als Arbitrary units in Bezug zur Proteinkonzentration. #p<0.05 vs. Kontrolle und ISO+ICI. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM.

## 5.9 RAGE/sRAGE-Expression in HEK-Zellen und renalen Rattenfibroblasten

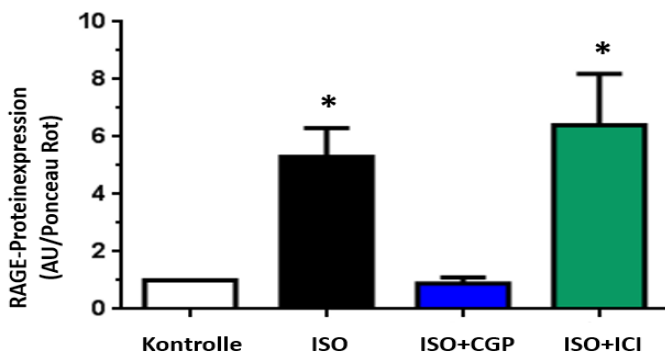
Den oben beschriebenen Versuchsaufbau der zeitabhängigen Stimulation führten wir auch an HEK-Zellen und renalen Rattenfibroblasten durch (Abbildung 34). Dabei konnten wir beobachten, dass die RAGE-Expression zeitabhängig zu- und die sRAGE-Sekretion ins Zellkulturmedium abnahm. Hierbei zeigte sich die Tendenz, dass die membranöse RAGE-Expression unter Isoproterenol allein und mit zusätzlicher  $\beta_2$ -selektiver Adrenorezeptorblockade zunahm, während die Zellen, die mit  $\beta_1$ -selektiver Adrenorezeptorblockade behandelt wurden, die Tendenz zeigten, weniger RAGE zu exprimieren.

### A) Western Blot-Analyse der membranösen RAGE-Proteinexpression auf HEK-Zellen

#### 1. Repräsentativer Western Blot der RAGE-Proteinexpression auf HEK-Zellen



#### 2. Western Blot-Analyse der membranösen RAGE-Proteinexpression auf HEK-Zellen



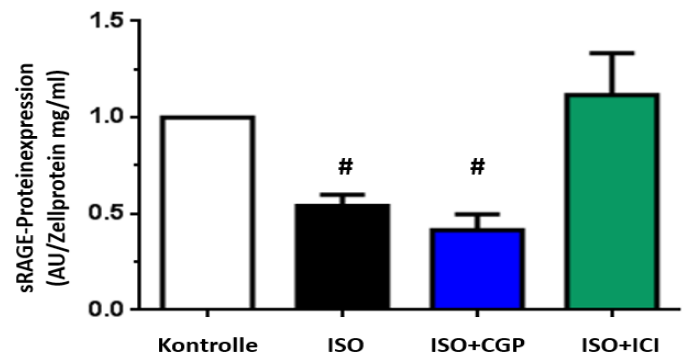
\*p<0.05 vs. Kontrolle und ISO+CGP

### B) sRAGE-Proteinexpression im Zellkulturmedium von HEK-Zellen

#### 1. Repräsentativer Western Blot der sRAGE-Proteinexpression im Zellkulturmedium von HEK-Zellen



#### 2. Western Blot-Analyse der sRAGE-Proteinexpression im Zellkulturmedium von HEK-Zellen

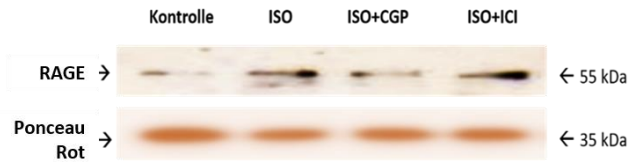


\*p<0.05 vs. Kontrolle und ISO+ICI

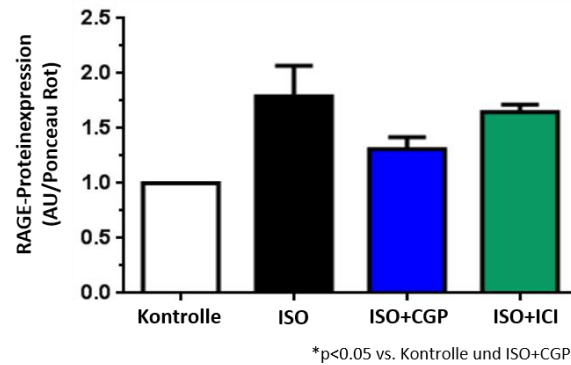


**C) Western Blot-Analyse der membranösen RAGE-Proteinexpression auf renalen Fibroblasten**

1. Repräsentativer Western Blot der RAGE-Proteinexpression auf renalen Fibroblasten

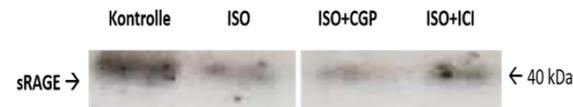


2. Western Blot-Analyse der membranösen RAGE-Proteinexpression auf renalen Fibroblasten

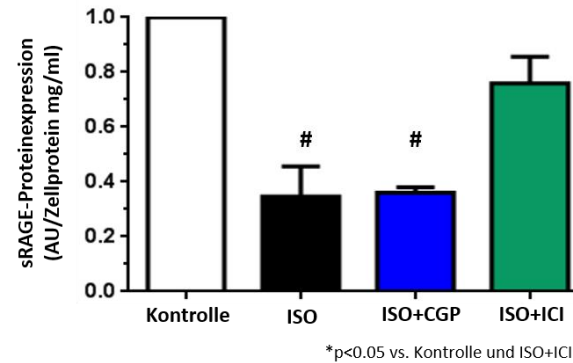


**D) sRAGE-Proteinexpression im Zellkulturmedium von renalen Fibroblasten**

1. Repräsentativer Western Blot der sRAGE-Proteinexpression im Zellkulturmedium von renalen Fibroblasten



2. Western Blot-Analyse der sRAGE-Proteinexpression im Zellkulturmedium von renalen Fibroblasten

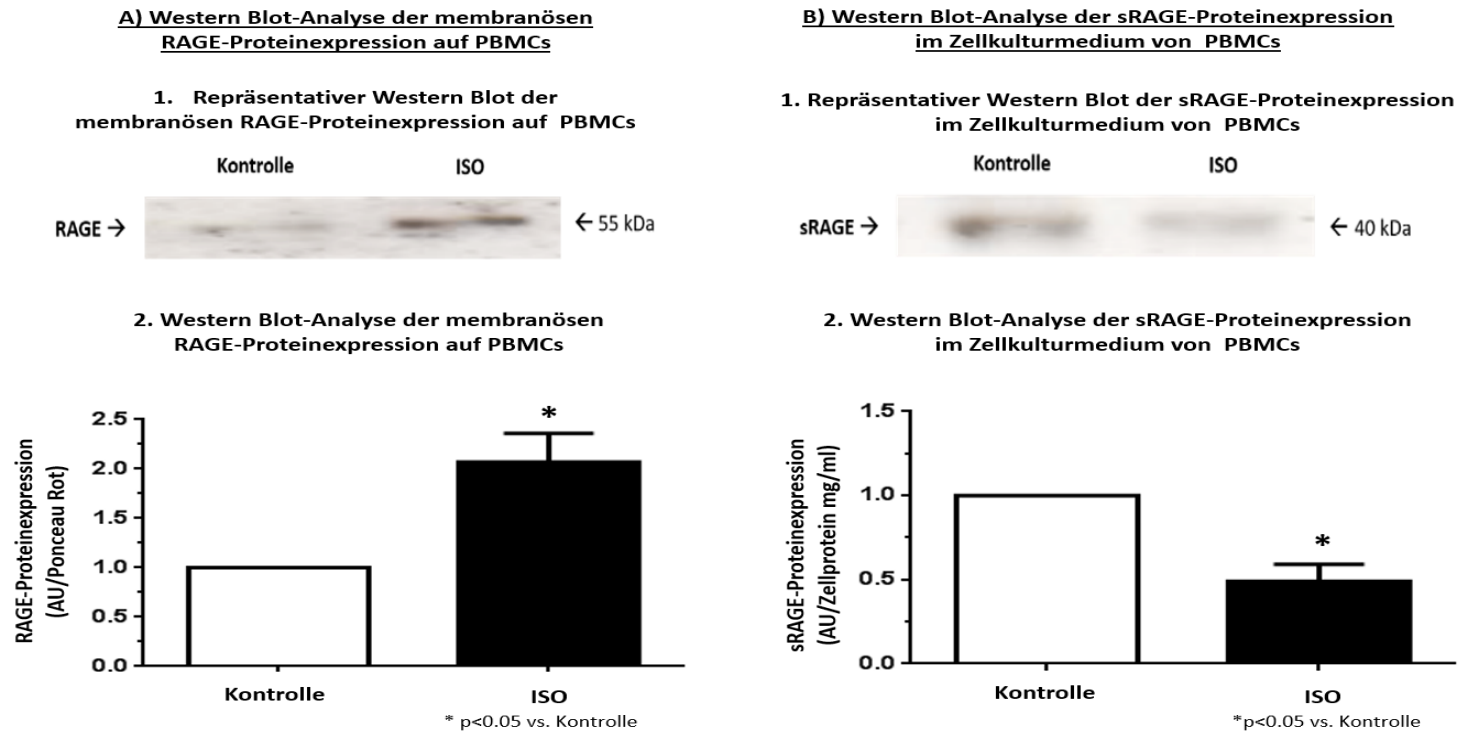


**Abbildung 34: Western Blot-Analyse der RAGE/sRAGE-Proteinexpression in HEK (Human Embryonic Kidney) - Zellen und renalen Rattenfibroblasten**

**A) Western Blot-Analyse der membranösen RAGE-Proteinexpression in HEK-Zellen:** Densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden: Die RAGE-Proteinexpression ist angegeben als Arbitrary units in Bezug zur GAPDH-Proteinexpression. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM. **B) Western Blot-Analyse der sRAGE-Proteinexpression im Zellkulturmedium der HEK-Zellen:** Densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden: Die RAGE-Proteinexpression wird angegeben als Arbitrary Units in Bezug zur Proteinkonzentration. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM. **C) Western Blot-Analyse der membranösen RAGE-Proteinexpression auf renalen Rattenfibroblasten:** Densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden: Die RAGE-Proteinexpression ist angegeben als Arbitrary units in Bezug zur GAPDH-Proteinexpression. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM. **D) sRAGE-Proteinexpression im Zellkulturmedium der renalen Rattenfibroblasten:** Die RAGE-Proteinexpression wird angegeben als Arbitrary Units in Bezug zur Proteinkonzentration. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM.

## 5.10 RAGE/sRAGE-Expression in humanen PBMCs

Um die Reproduzierbarkeit oben genannter tierexperimenteller Ergebnisse im Menschen zu überprüfen, führten wir eine zeitabhängige Stimulation humaner PBMCs mit Isoproterenol durch (Abbildung 35). Hierbei zeigte sich nach 72 Stunden eine signifikante Zunahme der RAGE-Proteinexpression auf der Zellmembran der humanen PBMCs nach Stimulation. Spiegelbildlich dazu nahm die sRAGE-Proteinexpression ins Zellkulturmedium signifikant ab.



**Abbildung 35: Western Blot-Analyse der RAGE/sRAGE-Proteinexpression in humanen PBMCs**

**A) Western Blot-Analyse der membranöse RAGE-Proteinexpression auf humanen PBMCs: Densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden:** Die Werte sind angegeben als Arbitrary units/Ponceau Rot. \*p<0.05 vs. Kontrolle. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM. **B) Western Blot-Analyse sRAGE-Proteinexpression im Zellkulturmedium der humanen PBMCs: Densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden:** Die Werte sind dargestellt als Arbitrary units/Ponceau Rot. \*p<0.05 vs. Kontrolle. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM.

## 6.0 Diskussion

In der Pathophysiologie zahlreicher Krankheitsbilder spielt eine Überaktivität des vegetativen Nervensystems, besonders der sympathischen Aktivität, eine wichtige Rolle. Zudem ist RAGE als ein zentraler Vermittler pathophysiologischer Prozesse, die mit Inflammation und einem erhöhten Sympathikotonus assoziiert sind, bekannt. Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit war, welche Auswirkungen eine Modulation des sympathischen Nervensystems auf das RAGE/sRAGE-System in vivo und in vitro hat. Weiterhin untersuchten wir, inwiefern sich die Modulation des Sympathikus mittels renaler Denervation auf metabolische, renale und kardiofunktionelle Parameter sowie auf die Fibrose dieser Organe auswirkt. Dabei haben wir festgestellt, dass eine Suppression der Sympathikus-Aktivität in vivo und in vitro das RAGE/sRAGE-Verhältnis zugunsten des sRAGE beeinflusst. Dieses wirkt sich wiederum positiv auf die kardio-renale Fibrose aus und führt in vivo zur Verbesserung von kardiofunktionellen, renalen und metabolischen Parametern.

### 6.1 Sympathoadrenerge Effekte auf metabolische, renale und kardiofunktionelle Parameter

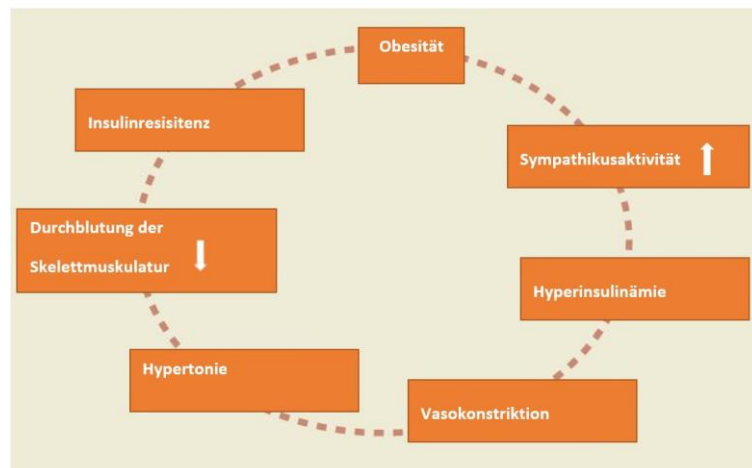
Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass ein überaktives sympathisches Nervensystem eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der arteriellen Hypertonie und anderer kardiovaskulärer Erkrankungen sowie Nierenerkrankungen und der Insulinresistenz spielt (Esler et al., 2010; Parati et al., 2012; Schlaich et al., 2011; Van den Hoek et al., 2008). Das metabolische Syndrom geht mit Insulinresistenz einher und ist ebenfalls mit einem erhöhten Sympathikotonus vergesellschaftet. Es wird eine bidirektionale Beziehung zwischen Sympathikus und Insulinresistenz beschrieben. So fördert ein überaktives sympathisches Nervensystem die Insulinresistenz, umgekehrt führt die Hyperinsulinämie wiederum zu erhöhtem Sympathikotonus und damit zu einem Teufelskreis, wie in Abbildung 36 dargestellt (Mancia et al., 2007). Da das sympathische Nervensystem bei Patienten mit resistenter Hypertonie, metabolischem Syndrom oder Diabetes mellitus in die Insulinsensitivität und im Glucosestoffwechsel involviert ist, liegt die Vermutung nahe, dass die Suppression der Aktivität des Sympathikus durch renale Denervation bedeutende Auswirkungen auf den Glucosemetabolismus bei Patienten mit Insulinresistenz haben könnte (Chen et al., 2016).

Unter dem Aspekt wurden einige klinische Studien durchgeführt, die sich zusätzlich zur Auswirkung der renalen Denervation auf die resistente Hypertonie mit den Auswirkungen auf den Glucosestoffwechsel beschäftigt haben.

Mahfoud et al. konnten 2011 in einer Pilotstudie zeigen, dass sich bei Patienten mit therapieresistenter Hypertonie die renale Denervation positiv auf den Glucosemetabolismus auswirkte. Drei Monate nach dem Eingriff waren unabhängig von Körpergewicht und Medikation die Insulinspiegel, C-Peptid-Konzentrationen und die Nüchtern-glucose signifikant reduziert (Mahfoud et al., 2011). Auch Witkowski et al. konnten 2011 positive Effekte der renalen Denervation auf den Glucosestoffwechsel feststellen. Dabei zeigten Patienten mit therapieresistenter Hypertonie und obstruktivem Schlafapnoesyndrom sechs Monate nach renaler Denervation sowohl positive Effekte auf den 2-Stunden-oralen-Glukosetoleranztest als auch eine Senkung des HbA1c-Wertes sowie positive Effekte auf den Apnoe-Hypopnoe-Index (Witkowski et al., 2011). Ähnliche Ergebnisse wurden bei Patientinnen mit Polyzystischem-Ovarial-Syndrom, welches neben Adipositas mit Insulinresistenz und Hypertonie einhergeht, gezeigt. Die Patientinnen hatten nach dem Eingriff unabhängig vom Körpergewicht eine verbesserte Insulinsensitivität und darüber hinaus eine geringere glomeruläre Hyperfiltration sowie eine verminderte Urinalbuminausscheidung (Schlaich et al., 2011).

Unsere Ergebnisse bezüglich der Nüchtern-Insulinspiegel stehen mit oben genannten Studien im Einklang. Die Untersuchungen an spontan-hypertensiven, obesen Ratten im Vergleich zu schlanken, normotensiven Kontrollratten zeigten, dass die Nüchtern-Insulinspiegel bei den spontan-hypertensiven, obesen Ratten im Vergleich zu den schlanken Ratten erwartungsgemäß signifikant erhöht waren. Nach renaler Denervation war jedoch eine Verbesserungstendenz der Nüchtern-Insulinspiegel zu verzeichnen. Dass die HbA1c-Werte der vier Gruppen keine deutlichen Unterschiede aufzeigten, ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die obesen Tiere keinen manifesten Diabetes mellitus aufwiesen.

Die pathophysiologischen Mechanismen, die dazu führen, dass die Insulinsensitivität durch die renale Denervation verbessert wird, könnten auf eine Abnahme der Glycogenolyse und Gluconeogenese durch die Aktivierung der Glucose-6-Phosphatase und der Phosphoenol-Pyruvat-Carboxykinase zurückzuführen sein, wie Chen et al. tierexperimentell an mit fettreicher Nahrung gefütterten Ratten nachgewiesen haben (Chen et al., 2016).



**Abbildung 36: Circulus vitiosus bei metabolischem Syndrom**

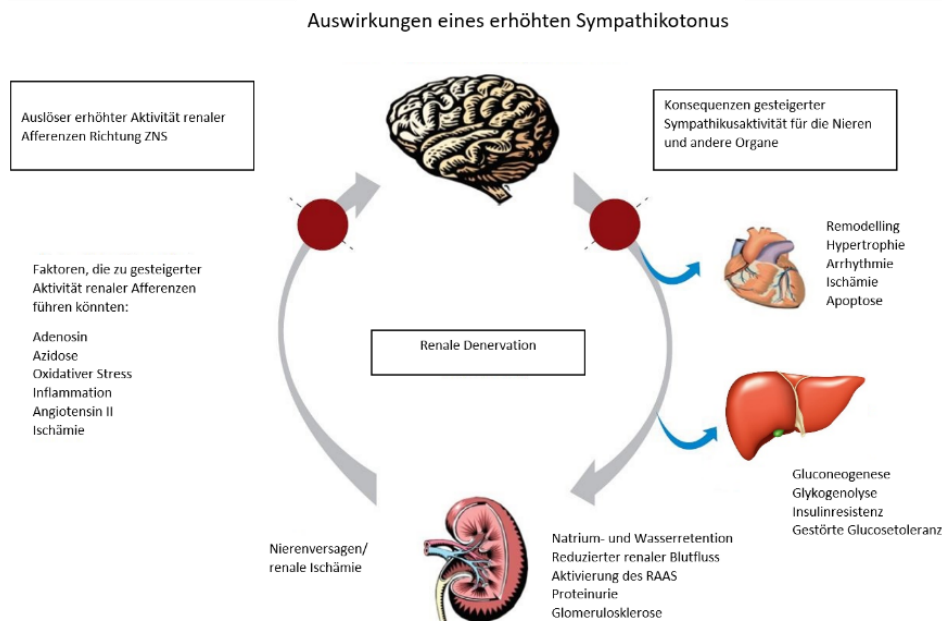
Ein überaktiver Sympathikotonus führt unter anderem über Vasokonstriktion zu arterieller Hypertonie und zur Umverteilung des Blutflusses von insulin-sensitiver quergestreifter Muskulatur zu insulin-insensitivem Fettgewebe und dadurch zur Insulinresistenz und Adipositas. Erhöhte Insulinspiegel führen wiederum zu einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems und damit zu einem Circulus vitiosus. (Modifiziert nach Mahfoud et al., 2013).

Eine kritische Rolle spielt das überaktive sympathoadrenerge System bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt der chronischen Niereninsuffizienz. Zudem steht es in einem engen Zusammenhang zum Schweregrad der Nierenfunktionsstörung sowie der Endorganschäden und lässt eine Prognose der kardiovaskulären und Gesamtmortalität der Patienten mit endgradiger Niereninsuffizienz zu (Tinucci et al., 2001; Schlaich et al., 2009; Neumann et al., 2004; Grassi et al., 2012; Grassi et al., 2011; Zoccali et al., 2002; Zoccali, et al., 2002). Diese pathophysiologischen Zusammenhänge legen nahe, dass sich eine Unterbrechung der sympathoadrenergen Überaktivität positiv bei diesen Patienten auswirken könnte, da hierdurch der in den Abbildungen 36 und 37 gezeigte Teufelskreis unterbrochen würde (Kiuchi et al., 2016). Ott et al. konnten zeigen, dass durch die renale Denervation die Abnahme der Nierenfunktion bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Stadium 3 und 4 verlangsamt oder zum Teil aufgehalten werden konnte (Ott et al., 2015). Auch in unserem Tiermodell zeigte sich durch die renale Denervation eine Verbesserung der Nierenfunktion, wie anhand der GFR und der Kreatininwerte gezeigt. Diese Resultate suggerieren eine nephroprotektive Komponente der renalen Denervation. Unsere Ergebnisse stimmen mit weiteren Studien überein. So haben Hering et al. nachgewiesen, dass die bilaterale renale Denervation bei Patienten mit einer  $eGFR \leq 60 \text{ mL/min/1.73m}^2$  weder zu akuter Funktionsstörung noch zu Langzeitfunktionsstörungen der Nieren geführt hat und dass darüber hinaus die Progression der Nierenfunktionsstörung unabhängig von Ausgangsblutdruckwerten aufgehalten werden konnte (Hering et al., 2017). Bei genauerer Betrachtung der zugrundeliegenden pathophysiologischen Prozesse liegen die

nephroprotektiven Effekte der renalen Denervation nahe. Tierexperimentelle Studien suggerieren, dass die Aktivierung renaler Nerven eine Schlüsselrolle bei renaler Inflammation und Beeinträchtigung der Nierenfunktion spielt. Die genauen Mechanismen, wodurch dies geschieht, sind noch ungeklärt. Es gibt dennoch Erklärungsansätze dafür, wie eine exzessive  $\beta$ -adrenerge Stimulation zu Nierenschäden führen könnte (Veelken et al., 2014). In der Niere haben Katecholamine direkten Einfluss auf die Proliferation der Tubuluszellen, die durch  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren vermittelt wird (Wolf et al., 1996). Zudem könnten Katecholamine die Podozytenfunktion und damit die glomeruläre Barriere beeinträchtigen, was zur Durchlässigkeit größerer Proteine, wie zum Beispiel Albumin führt (Pavenstädt et al., 2000). Peleli et al. führten die Verbesserung der GFR und die verminderte Proteinurie nach renaler Denervation an unilateral nephrektomierten und High-Salt-Diät-gefütterten Ratten auf eine verminderte NADPH- und Xanthinoxidasen-Expression und damit auf verminderte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zurück (Peleli et al., 2017). Des Weiteren scheint sich die renale Denervation positiv auf die renale Inflammation auszuwirken, was durch Reduktion der Akkumulation von Leukozyten und T-Zellen im Nierengewebe wiedergespiegelt wurde und konsekutiv mit einer Verringerung der renalen Fibrose und Albuminausscheidung einherging, wie Xiao et al. gezeigt haben (Xiao et al., 2015). Auch für unsere Resultate in einem Modell, das mit einem überaktiven sympathischen Nervensystem und subklinischer Inflammation einhergeht, könnten die oben genannten Theorien eine plausible Erklärung darstellen.

Sowohl das metabolische Syndrom als auch die Niereninsuffizienz sind Komorbiditäten der Herzinsuffizienz (Mancia et al., 2007; Hausberg et al., 2002). Herzinsuffizienz geht ebenfalls mit einem überaktiven sympathischen Nervensystem einher, welches beim Fortschreiten von mildem zu schwerem Organschaden eine Rolle spielt, und daher zur Pathogenese dieser Komorbiditäten beiträgt (Floras et al., 2009; Böhm et al., 2014). Am Herzen führt das durch sympathische Nerven freigesetzte Noradrenalin zu exzessiver  $\beta$ -Adrenorezeptorstimulation (Swedberg et al., 1984). Dabei korreliert das kardial und renal freigesetzte Noradrenalin mit der Schwere und Prognose der Herzinsuffizienz (Hasking et al., 1986; Petersson et al., 2005). Hohe Noradrenalinkonzentrationen im Serum sind mit erhöhter Mortalität bei chronischer Herzinsuffizienz assoziiert (Rector et al., 1987; Cohn et al., 1984). Konform dieser Tatsache konnten wir eine positive Korrelation zwischen renalem Noradrenalin und dem linksventrikulären enddiastolischen Druck sowie eine negative Korrelation zur linksventrikulären Ejektionsfraktion feststellen. Des Weiteren wurde durch den Eingriff der mittlere arterielle Blutdruck und die Herzfrequenz gesenkt, was die Annahme unterstützt, dass die Verbesserung der oben genannten Parameter auf die Hemmung des Sympathikotonus zurückzuführen ist. Um zu untersuchen, ob die kardialen Funktionsparameter noch weiter verbessert werden könnten, müssten weitere Untersuchungen mit längerer Beobachtungszeit durchgeführt werden. Unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit einigen tierexperimentellen

Studien, die mittels renaler Denervation eine Verbesserung der Herzfunktion und des Remodellings bei Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt (Hu et al., 2012; Hu et al., 2014; Zheng et al., 2016), bei Herzinsuffizienz durch Druckbelastung (Chen et al., 2017) und bei Isoproterenol-induzierter Herzinsuffizienz (Li et al., 2016) gezeigt haben. Klinische Studien lassen darauf schließen, dass oben genannte Beobachtungen bezüglich der verbesserten systolischen Herzfunktion beziehungsweise des Remodellings im Rattenmodell, welches mit arterieller Hypertonie und eingeschränkter Herzfunktion einherging, sowohl auf Patienten mit essentieller Hypertonie als auch auf Patienten mit bereits fortgeschrittener Herzinsuffizienz übertragen werden könnten (Fukuta et al., 2017; Schirmer et al., 2014; Mahfoud et al., 2014). Eine mögliche Erklärung für die Verbesserung der Organfunktionen könnte im Zusammenhang mit einem anti-fibrotischen Effekt stehen, den wir ebenfalls nach renaler Denervation festgestellt haben.



**Abbildung 37: Circulus vitiosus bei überaktivem Sympathikotonus**

Bei überaktivem Sympathikotonus kommt es zu pathophysiologischer Interaktion zwischen ZNS, Niere und anderen Organen wie Herz-Kreislaufsystem, Niere und Leber. Sympathische Efferenzen stimulieren periphere Organe zu fehlregulierten Reaktionen. In den Nieren wird der Blutfluss reduziert, das RAAS aktiviert und die Nierenfunktion verschlechtert. Afferenzen von den Nieren zum ZNS triggern einen weiteren Anstieg des Sympathikotonus. Dadurch wird ein Teufelskreis unterhalten, der unter anderem zu arterieller Hypertonie, kardialer Hypertrophie und Insulinresistenz führt. Die renale Denervation könnte ein Mechanismus darstellen diesen Teufelskreis zu durchbrechen. RAAS: Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. (Modifiziert nach Böhm et al., 2014).

## 6.2 Sympathoadrenerge Effekte auf kardio-renale Fibrose

Bei der Entwicklung chronischer Nieren- und Herzinsuffizienz spielt die kardio-renale Fibrose eine Schlüsselrolle (Liu et al., 2015). Dabei ist die kardio-renale Fibrose das Resultat verschiedener kardiovaskulärer Schäden und umgekehrt fördert Fibrose die Progression chronischer Herz- und Niereninsuffizienz (Rockey et al., 2015). Ventrikuläre Fibrose führt zu Steifigkeit des Myokards, welche linksventrikuläre Dysfunktion, ventrikuläre Herzrhythmusstörungen und plötzlichen Herztod zur Folge haben kann (Iles et al., 2011; Spirito et al., 2000). Elektrolytstörungen, Anämie, Hypertonie und Nierenversagen sind Folgen renaler Fibrose (Liu et al., 2015). Es ist bereits bekannt, dass chronische Überaktivität des sympathischen Nervensystems und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) eine Verknüpfung zwischen Fibrose und kardiovaskulären Erkrankungen herstellen (Koomans et al., 2004; Yu et al., 1998; Zoccali et al., 2002). Im Umkehrschluss stellt sich die Frage, welche Auswirkung eine Modulation des Sympathikus mittels renaler Denervation auf fibrotische Umbauprozesse im Herz- und Nierengewebe und damit auf kardiovaskuläre Erkrankungen hat. Tatsächlich konnten wir nachweisen, dass sowohl die myokardiale als auch die renale interstitielle Fibrose durch den Eingriff deutlich reduziert wurde. Dies liefert eine plausible Erklärung für die beobachtete Verbesserung der kardialen und renalen Funktionsparameter. Auch weitere Arbeitsgruppen, die sich mit dieser Frage beschäftigt haben, konnten positive Effekte der renalen Denervation auf die Fibrose feststellen. Liu et al. zeigten an Ratten mit Isoproterenol-induzierter Herzinsuffizienz anti-fibrotische Effekte der renalen Denervation in Herz und Niere der Tiere. Dies ging mit einer verminderten TGF- $\beta$ 1-Expression im Gewebe sowie weiterer Biomarker der Kollagensynthese einher (Liu et al., 2015). Auch Wang et al. untersuchten bei Ratten nach transversaler Aortenligatur und dadurch induzierter Herzinsuffizienz die Auswirkungen der renalen Denervation auf kardio-renale und hepatische Fibrose. Sie stellten eine Verbesserung der hepatischen, kardialen und renalen Funktionsstörungen sowie eine damit einhergehende Reduktion der Fibrose in diesen Organen fest. Sie erklärten sich diese Beobachtungen durch eine direkte Hemmung des RAAS und des oxidativen Stresses, die jeweils pro-fibrotische Effekte haben (Wang et al., 2016). Auch für unser Modell scheint dies eine mögliche Erklärung zu sein. Die spontan hypertensiven obesen Ratten, die sowohl die Kriterien der subklinischen Inflammation, einhergehend mit oxidativem Stress, als auch die eines verstärkten RAAS erfüllten, zeigten den höchsten Fibroseanteil in Herz und Nieren auf. Dies konnte mittels renaler Denervation reduziert werden. Des Weiteren liefern unsere Ergebnisse bezüglich der Herunterregulation des RAGE beziehungsweise der Heraufregulation des sRAGE eine plausible Erklärung für den beobachteten anti-fibrotischen Effekt im Gewebe der Ratten nach renaler Denervation (Linz et al., 2015). Es wurde bereits gezeigt, dass sRAGE, wenn man es Ratten nach Myokardinfarkt verabreicht, einen antifibrotischen Effekt hat (Aleshin et al., 2008). In unserer Studie korrelierte



das sRAGE deutlich negativ zur kardialen Fibrose, was zusätzlich die These unterstützt, dass sRAGE einen antifibrotischen Effekt hat. Zudem wurden durch renale Denervation sowohl die Blutserumspiegel des AGE CML als auch dessen Expression im Myokard und in der Niere herunterreguliert. Dies könnte eine weitere Erklärung für den antifibrotischen Effekt der renalen Denervation sein, da AGEs bekanntermaßen den Kollagenabbau verhindern (Campbell et al., 2012; Russo et al., 2016; Begieneman et al., 2015; Zhao et al., 2014). Nicht nur die Expression der AGEs und des RAGE allein, sondern auch deren Interaktion führt in Fibroblasten zur Expression von Matrixproteinen und zur Stimulation der Proliferation (Zhao et al., 2012). All das könnte eine Erklärung für die ausgeprägte kardio-renale Fibrose der spontan hypertensiven, obesen Ratten und die signifikante Reduktion des Kollagengehaltes und des RAGE/AGE-Gehaltes nach sympathoadrenerger Suppression mittels renaler Denervation sein. Da die pro-fibrotischen Prozesse des RAGE teilweise über TGF $\beta$  vermittelt werden (Oldfield et al., 2001), wäre interessant dessen Expression in unserem Modell in weiteren Untersuchungen zu bestimmen, wie durch Selejan et al. gezeigt (Selejan et al., 2018). Darüber hinaus könnte man in zukünftigen Projekten die Effekte der renalen Denervation auf die Fibrose mit einer Vergleichsgruppe, die mit TGF- $\beta$ -Blockern wie zum Beispiel Pirfenidon therapiert werden, vergleichen.

### **6.3 Sympathoadrenerge Effekte auf die Expression des RAGE/sRAGE und deren Liganden HMGB1 und CML**

Die Rolle RAGE in der Pathophysiologie metabolischer (Ramasamy et al., 2009; Tikellis et al., 2008; Li et al., 2011), kardiovaskulärer (Raposeiras-Roubín et al., 2010; Ha et al., 2013) und inflammatorischer bzw. immunologischer Krankheitsbilder (Ramasamy et al., 2009; Sadik et al., 2012; Huang et al., 2012) wurde bereits in zahlreichen Studien erforscht. Das metabolische Syndrom, welches mit Adipositas und Hypertonie vergesellschaftet ist, ist eine zunehmend relevante und häufige Komorbidität in der westlichen Welt. Eine chronisch erhöhte Aktivität des sympathoadrenergen Systems spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese der arteriellen Hypertonie, welche zu kardialem und renalem Endorganschaden mit nachfolgender Herz- und Niereninsuffizienz führt. Diese Erkrankungen gehen ebenso wie Diabetes mellitus Typ 2 und Adipositas wiederum mit einer erhöhten RAGE-Expression einher (Willemsen et al., 2012; Kanková et al., 2008; Selejan et al., 2012; Sobotka et al., 2011; Ewen et al., 2015; Böhm et al., 2014; Gaens et al., 2013). Es ist bekannt, dass RAGE-Überexpression eine zentrale Rolle in der Entwicklung mikrovaskulärer Spätkomplikationen bei Diabetes mellitus spielt (Yan et al., 2003). Eine zunehmende Evidenzlage suggeriert, dass sRAGE eine protektive Rolle zukommt, indem es als kompetitiver Hemmer des RAGE fungiert (Kanková et al., 2008;

Selejan et al., 2012; Sárkány et al., 2011). Dies geschieht nicht nur, indem es RAGE-Liganden bindet und neutralisiert, sondern auch indem es mit membrangebundenem RAGE Dimere bildet und dadurch die RAGE-Aktivierung verhindert (Sárkány et al., 2011). Hudson et al. zeigten, dass das metabolische Syndrom, beziehungsweise dessen einzelne Komponenten, mit einem niedrigen sRAGE-Spiegel einhergehen (Hudson et al., 2014). Bestätigt wurden diese Untersuchungen durch Ergebnisse von Momma et al., die umgekehrt zeigen konnten, dass erhöhte esRAGE-Spiegel mit einer geringeren Inzidenz des metabolischen Syndroms einhergingen (Momma et al., 2014). Passend hierzu stellten wir eine negative Korrelation zwischen der sRAGE-Expression und dem Insulinspiegel fest. In der Pathogenese der Hypertonie spielt die RAGE-AGE-Achse eine wichtige Rolle. Zum einen kommt es durch AGEs zu verstärkter Gefäßsteifigkeit, indem vermehrt Kollagen gebildet und glyciert wird. Zum anderen kommt es durch die Interaktion zwischen Liganden und Rezeptor zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies mit konsekutiver Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstandes (Prasad et al., 1990; Prasad et al., 1989; Prasad et al., 2017). Eine Herunterregulation des RAGE würde demnach zur Abnahme der Gefäßsteifigkeit und zur Reduktion des Blutdrucks führen (Prasad et al., 2017). Auch im Rahmen einiger Nierenerkrankungen trägt die dysregulierte Interaktion zwischen RAGE und seinen Liganden zu Inflammation sowie Proliferation und damit zu deren Pathogenese bei (Lee et al., 2013). RAGE-Liganden, die sich in Nieren ablagern, führen sowohl zu diabetischer als auch zu hypertensiver Nephropathie und Adipositas-assoziiierter Glomerulopathie (Lee et al., 2013; Fukami et al., 2015). Dabei zählen außer AGEs auch HMGB1 und S100 zu Liganden, die im Rahmen von Nierenerkrankungen erhöht sind (Lee et al., 2013). In Zusammenschau dieser Erkenntnisse scheint das Eingreifen in das RAGE/sRAGE-System einen interessanten therapeutischen Ansatzpunkt für zahlreiche Pathologien darzustellen. Die medikamentöse Regulation der RAGE/sRAGE-Expression bzw. dessen Liganden wurde unter anderem durch Eingriff in das RAAS gezeigt. Beispielsweise führte der ACE Hemmer Ramipril zu einer sRAGE-Zunahme bei diabetischen Ratten sowie zu einer Abnahme der AGEs bei Patienten mit Diabetes mellitus (Šebeková et al., 2003; Forbes et al., 2005). Die Angiotensin II Rezeptorblocker Telmisartan und Candesartan unterdrückten die Bildung von AGEs und führten zu einer Herunterregulation des RAGE sowie zu einer Erhöhung des sRAGE (Yoshida et al., 2008; Nakamura et al., 2005; Fan et al., 2004).

Soweit uns bekannt ist, beschäftigt sich diese Studie erstmals mit der Frage, welche Auswirkungen die direkte Modulation des sympathischen Nervensystems auf die Regulation des RAGE/sRAGE-Gleichgewichts und deren Liganden hat. Hierbei wurde bei spontanhypertensiven, obesen Ratten, die die Kriterien des metabolischen Syndroms erfüllten, eine renale Denervation mittels mechanischer und chemischer Unterbindung der sympathischen Nervenfasern durchgeführt. Die Expression des RAGE bzw. des sRAGE und deren Liganden CML und HMGB1 wurden anschließend auf Proteinebene mittels Western Blot und auf RNA-

Ebene mittels PCR ermittelt. Wir konnten eine Abnahme der kardialen und renalen RAGE-Expression und eine Zunahme der sRAGE-Expression in diesen Organen sowie im Serum nachweisen. Dies suggeriert einen positiven Effekt der Modulation des Sympathikus mittels renaler Denervation auf das RAGE/sRAGE-Gleichgewicht mit einer Umkehr des pro-inflammatorischen und pro-fibrotischen Verhältnisses. Diese These wird durch die Abnahme der kardialen und renalen Expression der RAGE-Liganden HMGB1 und des AGE CML unterstützt. Diese sind mit Inflammation und oxidativem Stress assoziiert und werden mit diabetischen Spät komplikationen in Verbindung gebracht (Baynes et al., 1991; Fu et al., 1992; Dyer et al., 1993; Sell et al., 1992; Mccance et al., 1993; Wang et al., 2016). Da AGEs zu Endotheldysfunktion, Gefäßsteifigkeit sowie gestörter myokardialer Kontraktilität führen, tragen diese maßgeblich zu kardiovaskulären Funktionsstörungen bei (Hartog et al., 2007). Demnach könnte in unserem Modell die Verbesserung einer eingeschränkten systolischen Pumpfunktion und die Abnahme der Fibrose auch auf die Reduktion des CML mittels Sympathikusmodulation zurückzuführen sein. Coughlan et al. zeigten, dass Ratten, die einer erhöhten AGE-Exposition ausgesetzt waren, zu verstärkter Schädigung der pankreatischen  $\beta$ -Zellen und konsekutiv zu gestörter Insulinsekretion neigten (Coughlan et al., 2011). Lee et al. führten die Apoptose der pankreatischen  $\beta$ -Zellen, die sie in ihren Experimenten an diabetischen Ratten beobachteten, auf eine Interaktion zwischen RAGE und HMGB1 mit konsekutiv verstärktem oxidativen Stress der Zellen zurück (Lee et al., 2010). Die Abnahme des RAGE und seiner Liganden könnte demnach auch unsere beobachtete Verbesserung der Nüchtern-Insulinspiegel nach renaler Denervation erklären. Während die obesen Ratten eine signifikant höhere HMGB1-Expression im Serum, Myokard und der Niere zeigten, konnten wir keinen deutlichen Unterschied der CML-Expression zwischen obesen und schlanken Tieren feststellen. Dennoch konnten wir sowohl im Herzgewebe als auch im Serum eine signifikante Korrelation zwischen sympathoadrenerger Aktivität und der Bildung von CML feststellen. Diese Beobachtungen können dahingehend interpretiert werden, dass das sympathoadrenerge System eine Rolle bei der Bildung der AGEs beim metabolischen Syndrom einnimmt. Zu beachten ist allerdings, dass metabolische Parameter, wie Glucosetoleranz und HbA1c, nach renaler Denervation nicht verändert waren und daher Veränderungen der AGEs, des HMGB1 und der RAGE/sRAGE-Expression nicht direkt mit einem verbesserten Glucosemetabolismus assoziiert sind.

Es ist weiterhin zu beachten, dass unsere in vivo-Untersuchungen auf einer chirurgischen renalen Denervation mittels mechanischer und chemischer Unterbindung der renalen Nerven basieren, und diese nicht, wie beim Menschen, mittels thermischer Energie (Radiofrequenz oder Ultraschall) abladiert werden (Kara et al., 2012; Mahfoud et al., 2013). Wei et al. zeigten 2017 jedoch beim direkten Vergleich zwischen chemischer Ablation und Radiofrequenzablation, dass beide Methoden zu vergleichbarer Blutdruckreduktion führten.

Zudem gab es keinen Unterschied hinsichtlich des anti-fibrotischen Effektes auf die kardio-renale Fibrose (Wei et al., 2017). Dies suggeriert, dass unsere Ergebnisse auch bei thermischer Ablation, wie sie in der Klinik durchgeführt wird, reproduzierbar sein könnten. Zudem stützen unsere Zellkulturexperimente an humanen peripheren mononukleären Zellen und HEK-Zellen die These, dass die tierexperimentell beobachteten Effekte auch auf den humanen Organismus übertragbar sein können.

Hier konnten wir durch die *in vitro* durchgeführte  $\beta$ -adrenerge Stimulation humaner PBMCs, mononukleärer Zellen aus Rattenmilzen, kardialer und renaler Fibroblasten sowie HEK-Zellen die direkten Effekte des sympathoadrenergen Systems auf die RAGE/sRAGE-Regulation zeigen. In allen Zelltypen konnten wir unter Isoproterenol-Stimulation eine Heraufregulation des RAGE und eine Herunterregulation des sRAGE im Vergleich zu unbehandelten Zellen nachweisen. Diese Befunde bestätigen die Ergebnisse, die wir *in vivo* in Herz, Niere und Serum erhalten haben. Darüber hinaus zeigen sie auch, dass die Effekte blutdruckunabhängig reproduzierbar sind. Die Ergebnisse aus der Stimulation mit Isoproterenol und gleichzeitiger Hemmung des  $\beta_1$ -selektiven Adrenorezeptors mittels CGP bzw. des  $\beta_2$ -selektiven Adrenorezeptors mittels ICI könnten auf den Signalweg schließen lassen, worüber RAGE und sRAGE beeinflusst werden. Unter Blockade des  $\beta_1$ -selektiven Adrenorezeptors kam es zu einer deutlichen Abnahme der RAGE-Expression im Vergleich zur alleinigen Isoproterenol-Stimulation, während die Blockade des  $\beta_2$ -selektiven Adrenorezeptors die Isoproterenol-induzierte RAGE-Expression nicht beeinflussen konnte. Dies suggeriert, dass die beobachteten sympathoadrenergen Effekte auf die RAGE-Expression hauptsächlich über den  $\beta_1$ -selektiven Adrenorezeptor vermittelt werden.

Des Weiteren wurde eine Herabregulation der sRAGE-Ausschüttung bei Stimulation des  $\beta_2$ -selektiven Adrenorezeptors beobachtet. Wie durch Selejan et al. gezeigt wurde, ist der Mechanismus der  $\beta_2$ -Adrenorezeptor-vermittelten sRAGE-Sekretion auf eine Deaktivierung der ADAM-10 (A-Disintegrin-And-Metalloprotease-10), die für die Abspaltung des sRAGE von der Zellmembran verantwortlich ist, zurückzuführen. Hierbei zeigten Selejan et al., dass die ADAM-10-Aktivität unter Isoproterenol-Stimulation deutlich abnahm, während die Effekte durch die Blockade des  $\beta_2$ -Adrenorezeptors reversibel waren (Selejan et al., 2018). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass beide Adrenorezeptoren an der RAGE/sRAGE-Dysbalance beteiligt sind. Und es wäre denkbar, dass die Sympathikus-vermittelte RAGE-assoziierte Inflammation durch die Aktivierung des  $\beta_1$ -Adrenorezeptors induziert und durch die  $\beta_2$ -Adrenorezeptor-vermittelte ADAM-10-Inaktivierung und konsekutiver sRAGE-Reduktion noch zusätzlich verstärkt wird. Darüber hinaus kann nicht ausgeschlossen werden, dass zusätzlich ein  $\alpha$ -adrenerger Signalweg der RAGE/sRAGE-Regulation an den beobachteten Effekten beteiligt ist. Allerdings liefern andere *in vitro*-Studien Ergebnisse, die aufzeigen, dass

besonders bei mononukleären Zellen der  $\beta$ -adrenerge Signalweg an den immunomodulatorischen Effekten beteiligt ist, während der  $\alpha$ -adrenerge Signalweg zu keiner Zytokinproduktion führt (Lubahn et al., 2014).

Zudem gibt es einige kontroverse Studien bezüglich der sRAGE-Serumspiegel, die im Zusammenhang mit unterschiedlichen Pathologien mittels ELISA gemessen wurden. Einige dieser Beobachtungen können darauf zurückgeführt werden, dass sRAGE renal ausgeschieden wird und dadurch bei Niereninsuffizienz akkumuliert und paradoxerweise vermehrt im Blut messbar ist. Zum einen könnte die sRAGE-Ausscheidung bei eingeschränkter Nierenfunktion gedrosselt sein, zum anderen könnte sRAGE vermehrt gebildet werden, um den toxischen Effekten der AGEs entgegenzuwirken (Renard et al., 1997; Kalousová et al., 2006). In unserer Studie wiesen die obesen Ratten eine geringere GFR als die schlanken Ratten auf. Diese verbesserte sich nach renaler Denervation parallel zum sRAGE Serumspiegel. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass wir mittels Western Blot Methode zwischen funktionsfähigem, ungebundenem sRAGE (40 kDa) und bereits an AGEs gebundenem sRAGE (55-60 kDa) unterscheiden konnten (Renard et al., 1997). In unsere Ergebnisse ging nur das ungebundene, funktionsfähige sRAGE im Serum ein, was den Unterschied zu den oben genannten ELISA-Ergebnissen, die alle sRAGE Formen umfassen, erklären könnte.

Welche Zelltypen für die Veränderungen der sRAGE-Expression in Niere, Myokard und Serum verantwortlich sind, ist noch nicht vollständig geklärt. Angesichts der Ergebnisse aus unseren Zellkulturexperimenten mit kardialen Rattenfibroblasten liegt es nahe, dass kardiale Fibroblasten an der Aufrechterhaltung des RAGE/sRAGE-Gleichgewichtes im Myokard verantwortlich sind. Demnach könnte ihnen eine immunomodulatorische Rolle im Myokard zukommen. Die Reproduzierbarkeit der oben genannten Ergebnisse in Experimenten mit renalen Fibroblasten suggerieren, dass diesen ebenfalls eine Rolle bei der sympathoadrenergen Immunomodulation im Nierengewebe zukommt. Da bereits bekannt ist, dass RAGE auf Podozyten (Tanji et al., 2000) und Mesangiumzellen (Suzuki et al., 2006) exprimiert wird, könnten auch diese zur RAGE/sRAGE-Dysbalance im Rahmen chronischer Sympathikusaktivität beitragen. Zusätzlich scheinen mononukleäre Zellen zum sRAGE-Pool im Serum beizutragen. Die Induktion des membranständigen RAGE auf mononukleären Zellen durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation derselben ist besonders interessant, weil RAGE die Zelladhäsion der Leukozyten an der Gefäßwand und deren Migration ins Gewebe fördert (Chavakis et al., 2003). Dies impliziert, dass das sympathoadrenerge System eine wichtige Rolle bei der Modulation der Migrationsfähigkeit mononukleärer Zellen spielt.

Durch die in vitro durchgeführten Experimente konnten wir zeigen, dass die Ergebnisse der RAGE/sRAGE-Expression in unserem Rattenmodell des metabolischen Syndroms zum Teil

blutdruckunabhängig sind. Die Symplicity-HTN-3 Studie konnte zwar keine signifikante Blutdruckreduktion nach renaler Denervation feststellen (Bhatt et al., 2014), die aktuelleren Studien SPYRAL HTN-ON MED (Kandzari et al., 2018), SPYRAL HTN-OFF MED (Townsend et al., 2017) und SPYRAL HTN-OFF MED Pivotal (Böhm et al., 2020) konnten schließlich die Wirksamkeit der renalen Denervation zur Blutdrucksenkung doch belegen. Des Weiteren haben abgesehen von unseren Daten auch andere Studien gezeigt, dass die renale Denervation über die Blutdruckreduktion hinaus zusätzliche günstige Effekte hat (Linz et al., 2015; Böhm et al., et al., 2014; Böhm et al., 2014; Ott et al., 2014; Linz et al., 2014).

## 6.4 Klinische Bedeutung und Ausblick

In dieser Arbeit konnten günstige Effekte der Suppression des Sympathikus durch die renale Denervation auf das RAGE/sRAGE-Gleichgewicht im Serum, Myokard und in der Niere spontan hypertensiver, obeser Ratten, einem Rattenmodell des metabolischen Syndroms, gezeigt werden. Durch die Modulation des Sympathikus konnte zudem die Expression der RAGE-Liganden N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin und High Mobility Group Box 1 reduziert werden. Weiterhin konnten durch die in vitro durchgeführte  $\beta$ -adrenerge Stimulation mononukleärer Zellen aus Rattenmilzen sowie kardialer und renaler Fibroblasten, HEK-Zellen und humanen PBMCs die direkten Effekte einer sympathoadrenergen Aktivierung auf die RAGE/sRAGE-Regulation gezeigt werden. Daraus kann man schließen, dass der RAGE-vermittelte Circulus vitiosus durch das sympathoadrenerge System induziert und aufrechterhalten wird, was schließlich zu Remodelling und kardio-renaler Fibrose beim metabolischen Syndrom führen kann. Eine Durchbrechung des Teufelskreises durch Modulation des Sympathikus, könnte daher ein attraktiver Ansatzpunkt für zukünftige Therapien bei metabolischen und kardiovaskulären Erkrankungen sein. Da es sich jedoch bei unseren Ergebnissen um experimentell erhobene Daten handelt, müsste der klinische Nutzen in weiteren prospektiven Studien untersucht werden. Des Weiteren könnten die Vorteile der renalen Denervation bezüglich des RAGE/sRAGE-Gleichgewichtes direkt mit medikamentöser Therapie wie zum Beispiel der ACE-Hemmer, Angiotensin-II-Rezeptorblocker und Statine verglichen werden. Würde sich dieser Nutzen klinisch bestätigen, könnten durch die Modulation des Sympathikus gegebenenfalls die Progression diabetischer und hypertensiver Spätkomplikationen, wie Herz- und Niereninsuffizienz verlangsamt und dadurch die Prognose dieser Patienten verbessert werden. Da die Regulation des RAGE außer bei kardiovaskulären und metabolischen Erkrankungen, auch bei autoimmunen Erkrankungen, Alterungsprozessen und malignen Erkrankungen von Bedeutung ist, könnte die Modulation des Sympathikus auch für diese Krankheitsbilder ein mögliches Therapieziel darstellen.

## 7.0 Literatur

1. Aleshin A., Ananthakrishnan R., Li Q., Rosario R., Lu Y., Qu W., Song F., Bakr S., Szabolcs M., D'Agati V., Liu R., Homma S., Schmidt AM., Yan S. F., Ramasamy R. (2008). RAGE modulates myocardial injury consequent to LAD infarction via impact on JNK and STAT signaling in a murine model. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 294(4): H1823–H1832.
2. Azizi M., Schmieder RE., Mahfoud F., Weber MA., Daemen J., Davies J., Basile J., Kirtane AJ., Wang Y., Lobo MD., Saxena M., Feyz L., Rader F., Lurz P., Sayer J., Sapoval M., Levy T., Sanghvi K., Abraham J., Renkin J., Sharp A., Fisher N., Bloch M., Reeve-Stoffer H., Coleman L., Mullin C., Mauri L. (2018). Endovascular ultrasound renal denervation to treat hypertension (RADIANCE-HTN SOLO): a multicentre, international, single-blind, randomised, sham-controlled trial. *Lancet*, 391(10137): 2335–2345.
3. Bangert A., Andrassy M., Müller AM., Bockstahler M., Fischer A., Volz CH., Leib C., Göser S., Korkmaz-Icöz S., Zित्रich S., Jungmann A., Lasitschka F., Pfitzer G., Müller OJ., Katus HA., Kaya Z. (2016). Critical role of RAGE and HMGB1 in inflammatory heart disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 113(2): E155–E164.
4. Basta G. (2008). Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications. *Atherosclerosis*, 196(1): 9–21.
5. Baumann M., Stehouwer C., Scheijen J., Heemann U., Struijker Boudier H., Schalkwijk C. (2008). N epsilon-(carboxymethyl)lysine during the early development of hypertension. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1126: 201–204.
6. Baynes JW. (1991). Perspectives in diabetes role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*, 40(4): 405-412.
7. Begieneman MPV., Rijvers L., Kubat B., Paulus WJ., Vonk ABA., van Rossum AC., Schalkwijk CG., Stooker W., Niessen HWM., Krijnen PAJ. (2015). Atrial fibrillation coincides with the advanced glycation end product Nε-(carboxymethyl)lysine in the atrium. *American Journal of Pathology*, 185(8): 2096–2104.
8. Behrends J., Bischofberger J., Deutzmann R., Ehmke H., Frings S, Grissmer S., Hoth M., Kurtz A., Leipziger J., Müller F., Pedain C., Rettig J., Wagner C., Wischmeyer E., (2010). *Duale Reihe Physiologie*. Thieme-Verlag, 1. Auflage, Kap. 16: 558-580.
9. Bhatt DL., Kandzari DE., O'Neill WW., D'Agostino R., Flack JM., Katzen BT., Leon MB., Liu M., Mauri L., Negoita M., Cohen SA., Oparil S., Rocha-Singh K., Townsend RR., Bakris GL. (2014). A controlled trial of renal denervation for resistant hypertension. *New England Journal of Medicine*, 370(15): 1393–1401.
10. Bierhaus A., Hofmann MA., Ziegler R., Nawroth PP. (1998). AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovascular Research*, 37(3): 586–600.

11. Bierhaus A., Humpert PM., Morcos M., Wendt T., Chavakis T., Arnold B., Stern DM., Nawroth PP. (2005). Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *Journal of Molecular Medicine*, 83(11): 876-886.
12. Böhm M., Linz D., Ukena C., Esler M., Mahfoud F. (2014). Renal denervation for the treatment of cardiovascular high risk-hypertension or beyond? *Circulation Research*, 115(3): 400–409.
13. Böhm M., Beuckelmann D., Brown L., Feiler G., Lorenz B., Näbauer M., Kemkes B., Erdmann E. (1988). Reduction of beta-adrenoceptor density and evaluation of positive inotropic responses in isolated, diseased human myocardium. *European Heart Journal*, 9(8): 844–852.
14. Böhm M., Diet F., Feiler G., Kemkes B., Kreuzer E., Weinhold C., Erdmann E. (1988). Subsensitivity of the failing human heart to isoprenaline and milrinone is related to beta-adrenoceptor downregulation. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 12(6): 726–732.
15. Böhm M., Gierschik P., Jakobs KH., Pieske B., Schnabel P., Ungerer M., Erdmann E. (1990). Increase of Gi alpha in human hearts with dilated but not ischemic cardiomyopathy. *Circulation*, 82(4):1249-1265.
16. Böhm M., Ewen S., Kindermann I., Linz D., Ukena C., Mahfoud F. (2014). Renal denervation and heart failure. *European Journal of Heart Failure*, 16(6): 608–613.
17. Böhm M., Ewen S., Linz D., Reil JC., Schirmer S., Ukena C., Mahfoud F. (2014). Renal denervation: a novel non-pharmacological approach in heart failure. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 7(3): 330-337.
18. Böhm M., Kario K., Kandzari DE., Mahfoud F., Weber MA., Schmieder RE., Tsioufis K., Pocock S., Konstantinidis D., Choi JW., East C., Lee DP., Ma A., Ewen S., Cohen DL., Wilensky R., Devireddy CM., Lea J., Schmid A., Weil J., Agdirlioglu T., Reedes D., Jefferson BK., Reyes D., D'Souza R., Sharp ASP., Sharif F., Fahy M., DeBruin V., Cohen SA., Brar S., Townsend RR. (2020). Efficacy of catheter-based renal denervation in the absence of antihypertensive medications (SPYRAL HTN-OFF MED Pivotal): a multicentre, randomised, sham-controlled trial. *Lancet*, 395(10234): 1444–1451.
19. Brenner T., Fleming TH., Spranz D., Schemmer P., Bruckner T., Uhle F., Martin EO., Weigand MA., Hofer S. (2013). Reactive metabolites and AGE-RAGE-mediated inflammation in patients following liver transplantation. *Mediators of Inflammation*, Vol. 2013, ID 501430.
20. Brett J., Schmidt AM., Yan SD., Zou YS., Weidman E., Pinsky D., Nowygrod R., Neeper M., Przysecki C., Shaw A. (1993). Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *American Journal of Pathology*, 143(6): 1699–1712.
21. Bucciarelli LG., Kaneko M., Ananthakrishnan R., Harja E., Lee LK., Hwang YC., Lerner S., Bakr S., Li Q., Lu Y., Song F., Qu W., Gomez T., Yu SZ., Shi FY., Schmidt AM., Ramasamy R. (2006). Receptor for advanced-glycation end products: key modulator of myocardial ischemic injury. *Circulation*, 113(9): 1226–1234.



22. Bucciarelli LG, Wendt T., Qu W., Lu Y., Lalla E., Rong LL., Goova MT., Moser B., Kislinger T., Lee DC., Kashyap Y., Stern DM., Schmidt AM. (2002). RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice. *Circulation*, 106(22): 2827–2835.
23. Campbell DJ., Somaratne JB., Jenkins AJ., Prior DL., Yii M., Kenny JF., Newcomb AE., Schalkwijk CG., Black MJ., Kelly DJ. (2012). Diastolic dysfunction of aging is independent of myocardial structure but associated with plasma advanced glycation end-product levels. *PLoS ONE*, 7(11): e49813.
24. Chavakis T., Bierhaus A., Al-Fakhri N., Schneider D., Witte S., Linn T., Nagashima M., Morser J., Arnold B., Preissner KT., Nawroth PP. (2003). The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *Journal of Experimental Medicine*, 198(10): 1507–1515.
25. Chavakis T., Bierhaus A., Nawroth P. (2004). RAGE (receptor for advanced glycation end products): a central player in the inflammatory response. *Microbes and Infection*, 6(13): 1219–1225.
26. Chen P., Leng S., Luo Y., Li S., Huang Z., Liu Z., Wang J., Lei X. (2017). Efficacy and safety of renal sympathetic denervation on dogs with pressure overload-induced heart failure. *Heart, Lung & Circulation*, 26(2): 194–200.
27. Chen W., Chang Y., He L., Jian X., Li L., Gao L., Yang Y., Zeng M., Liu H., Zhao AZ., Yang G. (2016). Effect of renal sympathetic denervation on hepatic glucose metabolism and blood pressure in a rat model of insulin resistance. *Journal of Hypertension*, 34(12): 2465–2474.
28. Cohn JN., Levine TB., Olivari MT., Garberg V., Lura D., Francis GS., Simon AB., Rector T. (1984). Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *New England Journal of Medicine*, 311(13): 819–823.
29. Coughlan MT., Yap FYT., Tong DCK., Andrikopoulos S., Gasser A., Thallas-Bonke V., Webster DE., Miyazaki J., Kay TW., Slattery RM., Kaye DM., Drew BG., Kingwell BA., Furlanos S., Groop P.H., Harrison LC., Knip M., Forbes JM. (2011). Advanced glycation end products are direct modulators of  $\beta$ -cell function. *Diabetes*, 60(10): 2523–2532.
30. Ding Q., Keller JN. (2005). Evaluation of rage isoforms, ligands, and signaling in the brain. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1746(1): 18–27.
31. Dyer DG., Dunn JA., Thorpe SR., Bailie KE., Lyons TJ., McCance DR., Baynes JW. (1993). Accumulation of maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *Journal of Clinical Investigation*, 91(6): 2463–2469.
32. Eckel RH., Grundy SM., Zimmet PZ. (2005). The metabolic syndrome. *Lancet*, 365(9468): 1415–1428.
33. Esler M. (2010). The 2009 Carl Ludwig Lecture: Pathophysiology of the human sympathetic nervous system in cardiovascular diseases: the transition from mechanisms to medical management. *Journal of Applied Physiology*, 108(2): 227–237.

34. Ewen S., Dörr O., Ukena C., Linz D., Cremers B., Laufs U., Hamm C., Nef H., Bauer A., Mancía G., Böhm M., Mahfoud, F. (2015). Blood pressure variability after catheter-based renal sympathetic denervation in patients with resistant hypertension. *Journal of Hypertension*, 33(12): 2512–2518.
35. Fan Q., Liao J., Kobayashi M., Yamashita M., Gu L., Gohda T., Suzuki Y., Wang LN., Horikoshi S., Tomino Y. (2004). Candesartan reduced advanced glycation end-products accumulation and diminished nitro-oxidative stress in type 2 diabetic KK/Ta mice. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 19(12): 3012–3020.
36. Feng H., Yu L., Zhang G., Liu G., Yang C., Wang H., Song X. (2016). Regulation of autophagy-related protein and cell differentiation by High Mobility Group Box 1 Protein in adipocytes. *Mediators of Inflammation*, Vol. 2016: ID 1936386.
37. Fiuza C., Bustin M., Talwar S., Tropea M., Gerstenberger E., Shelhamer JH., Suffredini AF. (2003). Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood*, 101(7): 2652–2660.
38. Floras JS. (2009). Sympathetic nervous system activation in human heart failure; clinical implications of an updated model. *Journal of the American College of Cardiology*, 54(5): 375–385.
39. Forbes JM., Thorpe SR., Thallas-Bonke V., Pete J., Thomas MC., Deemer ER., Bassal S., El-Osta A., Long DM., Panagiotopoulos S., Jerums G., Osicka TM., Cooper ME. (2005). Modulation of soluble receptor for advanced glycation end products by angiotensin-converting enzyme-1 inhibition in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 16(8): 2363–2372.
40. Fu MX., Knecht KJ., Thorpe SR., Baynes JW. (1992). Role of oxygen in cross-linking and chemical modification of collagen by glucose. *Diabetes*, 41(2): 42–48.
41. Fukami K., Taguchi K., Yamagishi S., Okuda S. (2015). Receptor for advanced glycation endproducts and progressive kidney disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 24(1): 54–60.
42. Fukuta H., Goto T., Wakami K., Ohte N. (2017). Effects of catheter-based renal denervation on heart failure with reduced ejection fraction: a systematic review and meta-analysis. *Heart Failure Reviews*, 22(6): 657-664
43. Gaens KHJ., Stehouwer CDA., Schalkwijk CG. (2013). Advanced glycation endproducts and its receptor for advanced glycation endproducts in obesity. *Current Opinion in Lipidology*, 24(1): 4–11.
44. Gardella S., Andrei C., Ferrera D., Lotti LV, Torrisi MR., Bianchi ME., Rubartelli A. (2002). The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Reports*, 3(10): 995–1001.
45. Grassi G., Quarti-Trevano F., Seravalle G., Arenare F., Volpe M., Furiani S., Dell’Oro R., Mancía G. (2011). Early sympathetic activation in the initial clinical stages of chronic renal failure. *Hypertension*, 57(4): 846–851.
46. Grassi G., Bertoli S., Seravalle G. (2012). Sympathetic nervous system: role in hypertension and in chronic kidney disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 21(1): 46–51.

47. Gupta A., Gupta V. (2010). Metabolic syndrome: what are the risks for humans? *Bioscience Trends*, 4(5): 204–212.
48. Ha CH., Kim S., Chung J., An SH., Park S., Choi D., Kwon K. (2013). Inhibitory effect of soluble RAGE in disturbed flow-induced atherogenesis. *International Journal of Molecular Medicine*, 32(2): 373–380.
49. Hartog JW., Voors AA., Bakker SJ., Smit AJ., van Veldhuisen DJ. (2007). Advanced glycation end-products (AGEs) and heart failure: Pathophysiology and clinical implications. *European Journal of Heart Failure*, 9(12): 1146–1155.
50. Hasking GJ., Esler MD., Jennings GL., Burton D., Johns JA., Korner PI. (1986). Norepinephrine spillover to plasma in patients with congestive heart failure: evidence of increased overall and cardiorenal sympathetic nervous activity. *Circulation*, 73(4): 615–621.
51. Hausberg M., Kosch M., Harmelink P., Barenbrock M., Hohage H., Kisters K., Dietl KH., Rahn KH. (2002). Sympathetic nerve activity in end-stage renal disease. *Circulation*, 106(15): 1974–1979.
52. Hering D., Marusic P., Duval J., Sata Y., Head GA., Denton KM., Burrows S., Walton AS., Esler MD., Schlaich MP. (2017). Effect of renal denervation on kidney function in patients with chronic kidney disease. *International Journal of Cardiology*, 232: 93–97.
53. Hu J., Ji M., Niu C., Aini A., Zhou Q., Zhang L., Jiang T., Yan Y., Hou Y. (2012). Effects of renal sympathetic denervation on post-myocardial infarction cardiac remodeling in rats. *PloS One*, 7(9): ID e45986.
54. Hu J., Yan Y., Zhou Q., Ji M., Niu C., Hou Y., Ge J. (2014). Effects of renal denervation on the development of post-myocardial infarction heart failure and cardiac autonomic nervous system in rats. *International Journal of Cardiology*, 172(3): E414-E416.
55. Huang W., Liu Y., Li L., Zhang R., Liu W., Wu J., Mao E., Tang Y. (2012). HMGB1 increases permeability of the endothelial cell monolayer via RAGE and Src family tyrosine kinase pathways. *Inflammation*, 35(1): 350–362.
56. Hudson BI., Dong C., Gardener H., Elkind MSV., Wright CB., Goldberg R., Sacco RL., Rundek, T. (2014). Serum levels of soluble receptor for advanced glycation end-products and metabolic syndrome: The Northern Manhattan Study. *Metabolism*, 63(9): 1125–1130.
57. Iles L., Pfluger H., Lefkovits L., Butler MJ., Kistler PM., Kaye DM., Taylor AJ. (2011). Myocardial fibrosis predicts appropriate device therapy in patients with implantable cardioverter-defibrillators for primary prevention of sudden cardiac death. *Journal of the American College of Cardiology*, 57(7): 821–828.
58. Kalousová M., Hodková M., Kazderová M., Fialová J., Tesař V., Dusilová-Sulková S., Zima T. (2006). Soluble receptor for advanced glycation end products in patients with decreased renal function. *American Journal of Kidney Diseases*, 47(3): 406–411.

59. Kandzari DE., Böhm M., Mahfoud F., Townsend RR., Weber MA., Pocock S., Tsioufis K., Tousoulis D., Choi JW., East C., Brar S., Cohen SA., Fahy M., Pilcher G., Kario K., Aoki J., Batson B., Böhm M., Choi JW., Chasen C. (2018). Effect of renal denervation on blood pressure in the presence of antihypertensive drugs: 6-month efficacy and safety results from the SPYRAL HTN-ON MED proof-of-concept randomised trial. *Lancet*, 391(10137): 2346–2355.
60. Kanková K., Kalousová M., Hertlová M., Krusová D., Olsovský J., Zima T. (2008). Soluble RAGE, diabetic nephropathy and genetic variability in the AGER gene. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 114(2): 111–119.
61. Kara K., Bruck H., Kahlert P., Plicht B., Mahabadi AA., Konorza T., Erbel R. (2012). Renal denervation: current state and future perspectives. *Herz*, 37(7): 746–753.
62. Kiuchi MG., Chen S. (2016). Effectiveness of renal sympathetic denervation in renal function and blood pressure in CKD and non-CKD patients with controlled vs. uncontrolled hypertension. *International Journal of Cardiology - Heart & Vasculature*, 13: 3–5.
63. Kiuchi MG., Graciano ML., Carreira MAM. de Q., Kiuchi T., Chen S., Lugon JR. (2016). Long-term effects of renal sympathetic denervation on hypertensive patients with mild to moderate chronic kidney disease. *Journal of Clinical Hypertension*, 18(3): 190-196.
64. Koch M., Chitayat S., Dattilo BM., Schiefner A., Diez J., Chazin WJ., Fritz G. (2010). Structural basis for ligand recognition and activation of RAGE. *Structure*, 18(10): 1342–1352.
65. Koomans HA., Blankestijn PJ., Joles JA. (2004). Sympathetic hyperactivity in chronic renal failure: a wake-up call. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15(3): 524–537.
66. Kulenthiran S., Ewen S., Böhm M., Mahfoud F. (2017). Hypertension up to date: SPRINT to SPYRAL. *Clinical Research in Cardiology*, 106(7): 475–484.
67. Lee BW., Chae HY., Kwon SJ., Park SY., Ihm J., Ihm SH. (2010). RAGE ligands induce apoptotic cell death of pancreatic  $\beta$ -cells via oxidative stress. *International Journal of Molecular Medicine*, 26(6): 813–818.
68. Lee EJ., Park JH. (2013). Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE), its ligands, and soluble RAGE: Potential biomarkers for diagnosis and therapeutic targets for human renal diseases. *Genomics & Informatics*, 11(4): 224-229.
69. Li G., Tang J., Du Y., Lee CA., Kern TS. (2011). Beneficial effects of a novel RAGE inhibitor on early diabetic retinopathy and tactile allodynia. *Molecular Vision*, 17: 3156–3165.
70. Li JD., Cheng AY., Huo YL., Fan J., Zhang YP., Fang ZQ., Sun HS., Peng W., Zhang JS., Wang HP., Xue BJ. (2016). Bilateral renal denervation ameliorates isoproterenol-induced heart failure through downregulation of the brain renin-angiotensin system and inflammation in rat. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Vol. 2016: ID3562634.

71. Linz D., Hohl M., Schutze J., Mahfoud F., Speer T., Linz B., Hübschle T., Juretschke HP., Dechend R., Geisel J., Rutten H., Böhm M. (2015). Progression of kidney injury and cardiac remodeling in obese spontaneously hypertensive rats: The role of renal sympathetic innervation. *American Journal of Hypertension*, 28(2): 256–265.
72. Linz D., & Böhm M. (2015). Renal denervation for treatment of hypertension and beyond. *Clinical Research in Cardiology*, 104(1): 87–88.
73. Linz D., Hohl M., Mahfoud F., Reil JC., Linz W., Hübschle T., Juretschke HP., Neumann-Häflin C., Rütten H., Böhm, M. (2012). Cardiac remodeling and myocardial dysfunction in obese spontaneously hypertensive rats. *Journal of Translational Medicine*, 10: ID 187.
74. Linz D., van Hunnik A., Ukena C., Ewen S., Mahfoud F., Schirmer SH., Lenski M., Neuberger HR., Schotten U., Böhm M. (2014). Renal denervation: effects on atrial electrophysiology and arrhythmias. *Clinical Research in Cardiology*, 103(10): 765–774.
75. Liu Q., Zhang Q., Wang K., Wang S., Lu D., Li Z., Geng J., Fang P., Wang Y., Shan Q. (2015). Renal denervation findings on cardiac and renal fibrosis in rats with isoproterenol induced cardiomyopathy. *Scientific Reports*, 5: ID 18582.
76. Löffler, G.; Petrides P. (2014). *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Verlag, 9. Auflage, Kap. 70: 893-927.
77. Lotze MT., Tracey KJ. (2005). High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nature Reviews Immunology*, 5(4): 331–342.
78. Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr AL., Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1): 265–275.
79. Lubahn CL., Lorton D., Schaller JA., Sweeney SJ., Bellinger DL. (2014). Targeting  $\alpha$ - and  $\beta$ -Adrenergic Receptors Differentially Shifts Th1, Th2, and Inflammatory Cytokine Profiles in Immune Organs to Attenuate Adjuvant Arthritis. *Frontiers in Immunology*, 5: 346.
80. Mahfoud F., Linz D., Böhm M. (2013). Heart and kidneys. Renal denervation as therapy for hypertension. *Herz*, 38(1): 67–75.
81. Mahfoud F., Böhm M., Schmieder R., Narkiewicz K., Ewen S., Ruilope L., Schlaich M., Williams B., Fahy M., Mancina G. (2019). Effects of renal denervation on kidney function and long-term outcomes: 3-year follow-up from the Global SYMPPLICITY Registry. *European Heart Journal*, 40(42): 3474-3482.
82. Mahfoud F., Ewen S., Ukena C., Linz D., Sobotka PA., Cremers B., Böhm M. (2013). Expanding the indication spectrum: renal denervation in diabetes. *EuroIntervention*, 9(R): R117–R121.
83. Mahfoud F., Schlaich M., Kindermann I., Ukena C., Cremers B., Brandt MC., Hoppe UC., Vonend O., Rump LC., Sobotka PA., Krum H., Esler M., Böhm M. (2011). Effect of renal sympathetic denervation on glucose metabolism in patients with resistant hypertension: A pilot study. *Circulation*, 123(18): 1940–1946.

84. Mahfoud F., Urban D., Teller D., Linz D., Stawowy P., Hassel JH., Fries P., Dreysse S., Wellnhofer E., Schneider G., Buecker A., Schneeweis C., Doltra A., Schlaich MP., Esler MD., Fleck E., Böhm M., Kelle S. (2014). Effect of renal denervation on left ventricular mass and function in patients with resistant hypertension: data from a multi-centre cardiovascular magnetic resonance imaging trial. *European Heart Journal*, 35(33): 2224-2231b.
85. Mancia G., Bousquet P., Elghozi JL., Esler M., Grassi G., Julius S., Reid J., Van Zwieten PA. (2007). The sympathetic nervous system and the metabolic syndrome. *Journal of Hypertension*, 25(5): 909–920.
86. Mccance DR., Dryer DG., Dunn JA., Bailie KE., Thorpe SR. (1993). Maillard reaction products and their relation to complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Clinical Investigation*, 91(6): 2470–2478.
87. Medzhitov R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203): 428-435.
88. Momma H., Niu K., Kobayashi Y., Huang C., Chujo M., Otomo A., Tadaura H., Miyata T., Nagatomi R. (2014). Lower serum endogenous secretory receptor for advanced glycation end product level as a risk factor of metabolic syndrome among japanese adult men: a 2-year longitudinal study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 99(2): 587–593.
89. Murphy K., Weaver C. (2011). *Janeways Immunobiology*. G. Science (ed.), 8th EDN, chap. 1-2: 2-140.
90. Nakamura K., Yamagishi SI., Nakamura Y., Takenaka K., Matsui T., Jinnouchi Y., Imaizumi T. (2005). Telmisartan inhibits expression of a receptor for advanced glycation end products (RAGE) in angiotensin-II-exposed endothelial cells and decreases serum levels of soluble RAGE in patients with essential hypertension. *Microvascular Research*, 70(3): 137–141.
91. Nedić O., Rattan SIS., Grune T., Trougakos IP. (2013). Molecular effects of advanced glycation end products on cell signalling pathways, ageing and pathophysiology. *Free Radical Research*, 47(1): 28–38.
92. Neeper M., Schmidt AM., Brett J., Yan SD., Wang F., Pan YC., Elliston K., Stern D., Shaw A. (1992). Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 267(21): 14998–15004.
93. Neumann J., Ligtenberg G., Klein II., Koomans HA., Blankestijn PJ. (2004). Sympathetic hyperactivity in chronic kidney disease: Pathogenesis, clinical relevance, and treatment. *Kidney International*, 65(5): 1568–1576.
94. Nguyen HT., van der Fels-Klerx HJ., van Boekel MAJS. (2016). Kinetics of N(ε)-(carboxymethyl)lysine formation in aqueous model systems of sugars and casein. *Food Chemistry*, 192: 125–133.
95. Oldfield MD., Bach LA., Forbes JM., Nikolic-Paterson D., McRobert A., Thallas V., Atkins RC., Osicka T., Jerums G., Cooper ME. (2001). Advanced glycation end products cause epithelial-myofibroblast transdifferentiation via the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *Journal of Clinical Investigation*, 108(12):1853–1863.

96. Ott C., Mahfoud F., Schmid A., Ditting T., Veelken R., Ewen S., Ukena C., Uder M., Böhm M., Schmieder RE. (2014). Improvement of albuminuria after renal denervation. *International Journal of Cardiology*, 173(2): 311–315.
97. Ott C., Mahfoud F., Schmid A., Toennes SW., Ewen S., Ditting T., Veelken R., Ukena C., Uder M., Böhm M., Schmieder RE. (2015). Renal denervation preserves renal function in patients with chronic kidney disease and resistant hypertension. *Journal of Hypertension*, 33(6): 1261–1266.
98. Parati G., Esler M. (2012). The human sympathetic nervous system: its relevance in hypertension and heart failure. *European Heart Journal*, 33(9): 1058–1066.
99. Park JS., Arcaroli J., Yum HK., Yang H., Wang H., Yang KY., Choe KH., Strassheim D., Pitts TM., Tracey KJ., Abraham E. (2003). Activation of gene expression in human neutrophils by high mobility group box 1 protein. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 284(4): C870-C879.
100. Pavenstädt H. (2000). Roles of the podocyte in glomerular function. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 278(2): F173-F179.
101. Peleli M., Flacker P., Zhuge Z., Gomez C., Wheelock CE., Persson AEG., Carlstrom M. (2017). Renal denervation attenuates hypertension and renal dysfunction in a model of cardiovascular and renal disease, which is associated with reduced NADPH and xanthine oxidase activity. *Redox Biology*, 13: 522–527.
102. Petersson M., Friberg P., Eisenhofer G., Lambert G., Rundqvist B. (2005). Long-term outcome in relation to renal sympathetic activity in patients with chronic heart failure. *European Heart Journal*, 26(9): 906–913.
103. Prasad K, Kalra J., Chan WP., Chaudhary AK. (1989). Effect of oxygen free radicals on cardiovascular function at organ and cellular levels. *American Heart Journal*, 117(6): 1196–1202.
104. Prasad K, Kalra J., Chaudhary AK., Debnath D. (1990). Effect of polymorphonuclear leukocyte-derived oxygen free radicals and hypochlorous acid on cardiac function and some biochemical parameters. *American Heart Journal*, 119(3 Pt 1): 538–550.
105. Prasad K., & Mishra M. (2017). Do advanced glycation end products and its receptor play a role in pathophysiology of hypertension? *International Journal of Angiology*, 26(1): 1–11.
106. Radia AM., Yaser AM., Ma X., Zhang J., Yang C., Dong Q., Rong P., Ye B., Liu S., Wang W. (2013). Specific siRNA targeting receptor for advanced glycation end products (RAGE) decreases proliferation in human breast cancer cell lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4): 7959–7978.
107. Ramasamy R., Yan SF., Schmidt AM. (2009). RAGE: therapeutic target and biomarker of the inflammatory response - the evidence mounts. *Journal of Leukocyte Biology*, 86(3): 505-512.

108. Raposeiras-Roubín S., Rodiño-Janeiro BK., Grigorian-Shamagian L., Moure-González M., Seoane-Blanco A., Varela-Román A., Alvarez E., González-Juanatey JR. (2010). Soluble receptor of advanced glycation end products levels are related to ischaemic aetiology and extent of coronary disease in chronic heart failure patients, independent of advanced glycation end products levels: New Roles for Soluble RAGE. *European Journal of Heart Failure*, 12(10): 1092–1100.
109. Raucci A., Cugusi S., Antonelli A., Barabino SM., Monti L., Bierhaus A., Reiss K., Saftig P., Bianchi ME. (2008). 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 (ADAM10). *FASEB Journal*, 22(10): 3716–3727.
110. Rector TS., Olivari MT., Levine TB., Francis GS., Cohn JN. (1987). Predicting survival for an individual with congestive heart failure using the plasma norepinephrine concentration. *American Heart Journal*, 114(1 Pt 1): 148–152.
111. Reddy S., Bichler J., Wells-Knecht KJ., Thorpe SR., Baynes JW. (1995). N epsilon-(carboxymethyl)lysine is a dominant advanced glycation end product (AGE) antigen in tissue proteins. *Biochemistry*, 34(34): 10872–10878.
112. Remo BF., Preminger M., Bradfield J., Mittal S., Boyle N., Gupta A., Shivkumar K., Steinberg JS., Dickfeld T. (2014). Safety and efficacy of renal denervation as a novel treatment of ventricular tachycardia storm in patients with cardiomyopathy. *Heart Rhythm*, 11(4): 541–546.
113. Renard C., Chappey O., Wautier MP., Nagashima M., Lundh E., Morser J., Zhao L., Schmidt AM., Scherrmann JM., Wautier JL. (1997). Recombinant advanced glycation end product receptor pharmacokinetics in normal and diabetic rats. *Molecular Pharmacology*, 52(1): 54–62.
114. Rockenfeller P., Ring J., Muschett V., Beranek A., Buettner S., Carmona-Gutierrez D., Eisenberg T., Houry C., Rechberger G., Kohlwein SD., Kroemer G., Madeo F. (2010). Fatty acids trigger mitochondrion-dependent necrosis. *Cell Cycle*, 9(14): 2836–2842.
115. Rockey DC., Bell PD., Hill JA. (2015). Fibrosis - a common pathway to organ injury and failure. *New England Journal of Medicine*, 373(1): 95–96.
116. Russo I., Frangogiannis NG. (2016). Diabetes-associated cardiac fibrosis: Cellular effectors, molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 90: 84–93.
117. Sadik NAH., Mohamed WA., Ahmed MI. (2012). The association of receptor of advanced glycated end products and inflammatory mediators contributes to endothelial dysfunction in a prospective study of acute kidney injury patients with sepsis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 359(1–2): 73–81.
118. Saklayen MG. (2018). The global epidemic of the metabolic syndrome. *Current Hypertension Reports*, 20(2): 12.
119. Sárkány Z., Ikonen TP., Ferreira-da-Silva F., Saraiva MJ., Svergun D., Damas AM. (2011). Solution structure of the soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE). *Journal of Biological Chemistry*, 286(43): 37525–37534.



120. Scaffidi P., Misteli T., Bianchi ME. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*, 418(6894): 191–195.
121. Schirmer SH., Sayed MMYA., Reil JC., Lavall D., Ukena C., Linz D., Mahfoud F., Böhm M. (2015). Atrial remodeling following catheter-based renal denervation occurs in a blood pressure- and heart rate-independent manner. *Journal of the American College of Cardiology: Cardiovascular Interventions*, 8(7): 972–980.
122. Schirmer SH., Sayed MMYA., Reil JC., Ukena C., Linz D., Kindermann M., Laufs U., Mahfoud F., Böhm M. (2014). Improvements in left ventricular hypertrophy and diastolic function following renal denervation: effects beyond blood pressure and heart rate reduction. *Journal of the American College of Cardiology*, 63(18): 1916–1923.
123. Schlaich MP., Krum H., Sobotka PA., Esler MD. (2011). Renal denervation and hypertension. *American Journal of Hypertension*, 24(6): 635–642.
124. Schlaich MP., Socratous F., Hennebry S., Eikelis N., Lambert EA., Straznicky N., Esler MD., Lambert GW. (2009). Sympathetic activation in chronic renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(5): 933–939.
125. Schlaich MP., Straznicky N., Grima M., Ika-Sari C., Dawood T., Mahfoud F., Lambert E., Chopra R., Socratous F., Hennebry S., Eikelis N., Böhm M., Krum H., Lambert G., Esler MD., Sobotka PA. (2011). Renal denervation: a potential new treatment modality for polycystic ovary syndrome? *Journal of Hypertension*, 29(5): 991–996.
126. Schleicher ED., Wagner E., Nerlich AG. (1997). Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *Journal of Clinical Investigation*, 99(3): 457–468.
127. Schmidt AM., Yan SD., Yan SF., Stern DM. (2001). The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *Journal of Clinical Investigation*, 108(7): 949–955.
128. Schünke M., Schulte E., Schumacher U., Voll M., Wesker K. (2009). *Prometheus Lernetlas der Anatomie - Innere Organe*. Thieme-Verlag, 2. Auflage, Kap. 9: 64-66.
129. Šebeková K., Gazdíková K., Syrová D., Blažíček P., Schinzel R., Heidland A., Spustová V., Dzúrik R. (2003). Effects of ramipril in nondiabetic nephropathy: improved parameters of oxidative stress and potential modulation of advanced glycation end products. *Journal of Human Hypertension*, 17(4): 265–270.
130. Selejan SR., Hewera L., Hohl M., Kazakov A., Ewen S., Kindermann I., Böhm M., Link A. (2017). Suppressed MMP-9 activity in myocardial infarction-related cardiogenic shock implies diminished RAGE degradation. *Shock*, 48(1): 18–28.
131. Selejan SR., Linz D., Tatu AM., Hohl M., Speer T., Ewen S., Mahfoud F., Kindermann I., Zamyatkin O., Kazakov A., Laufs U., Böhm M. (2018). Sympathoadrenergic suppression improves heart function by upregulating the ratio of sRAGE/RAGE in hypertension with metabolic syndrome. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 122: 34–46.

132. Selejan SR., Pöss J., Hewera L., Kazakov A., Böhm M., Link A. (2012). Role of receptor for advanced glycation end products in cardiogenic shock. *Critical Care Medicine*, 40(5): 1513–1522.
133. Sell DR., Lapolla A., Odetti P., Fogarty J., Monnier VM. (1992). Pentosidine formation in skin correlates with severity of complications in individuals with long-standing IDDM. *Diabetes*, 41(10): 1286–1292.
134. Shimizu T., Yamakuchi M., Biswas KK., Aryal B., Yamada S., Hashiguchi T., Maruyama I. (2016). HMGB1 is secreted by 3T3-L1 adipocytes through JNK signaling and the secretion is partially inhibited by adiponectin. *Obesity*, 24(9): 1913–1921.
135. Skrzypecki J., Gawlak M., Huc T., Szulczyk P., Ufnal M. (2017). Renal denervation decreases blood pressure and renal tyrosine hydroxylase but does not augment the effect of hypotensive drugs. *Clinical and Experimental Hypertension*, 39(3): 290–294.
136. Sobotka PA., Mahfoud F., Schlaich MP., Hoppe UC., Böhm M., Krum H. (2011). Sympatho-renal axis in chronic disease. *Clinical Research in Cardiology*, 100(12): 1049–1057.
137. Sparvero LJ., Asafu-Adjei D., Kang R., Tang D., Amin N., Im J., Rutledge R., Lin B., Amoscato AA., Zeh HJ., Lotze MT. (2009). RAGE (receptor for advanced glycation endproducts), RAGE Ligands, and their role in cancer and inflammation. *Journal of Translational Medicine*, 7: 17.
138. Spirito P., Bellone P., Harris KM., Bernabo P., Bruzzi P., Maron BJ. (2000). Magnitude of left ventricular hypertrophy and risk of sudden death in hypertrophic cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine*, 342(24): 1778–1785.
139. Stros M., Ozaki T., Bacikova A., Kageyama H., Nakagawara A. (2002). HMGB1 and HMGB2 cell-specifically down-regulate the p53- and p73-dependent sequence-specific transactivation from the human Bax gene promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 277(9): 7157–7164.
140. Suzuki D., Toyoda M., Yamamoto N., Miyauchi M., Katoh M., Kimura M., Maruyama M., Honma M., Umezono T., Yagame M. (2006). Relationship between the expression of advanced glycation end-products (AGE) and the receptor for AGE (RAGE) mRNA in diabetic nephropathy. *Internal Medicine*, 45(7): 435–441.
141. Swedberg K., Viquerat C., Rouleau JL., Roizen M., Atherton B., Parmley WW., Chatterjee K. (1984). Comparison of myocardial catecholamine balance in chronic congestive heart failure and in angina pectoris without failure. *American Journal of Cardiology*, 54(7): 783–786.
142. Tang J., Li Z., Lu L., Cho CH. (2013).  $\beta$ -Adrenergic system, a backstage manipulator regulating tumour progression and drug target in cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology*, 23(6 Pt B): 533–542.
143. Tanji N., Markowitz GS., Fu C., Kislinger T., Taguchi A., Pischetsrieder M., Stern D., Schmidt AM., D'Agati VD. (2000). Expression of advanced glycation endproducts and their cellular receptor RAGE in diabetic nephropathy and nondiabetic renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 11(9): 1656–1666.

144. Tikellis C., Thomas MC., Harcourt BE., Coughlan MT., Pete J., Bialkowski K., Tan A., Bierhaus A., Cooper ME., Forbes JM. (2008). Cardiac inflammation associated with a western diet is mediated via activation of RAGE by AGEs. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 295(2): E323-330.
145. Tinucci T., Abrahão S., Santello J., Mion Jr D. (2001). Mild chronic renalinsufficiency induces sympathetic overactivity. *Journal of Human Hypertension*, 15(6): 401–406.
146. Townsend RR., Mahfoud F., Kandzari DE., Kario K., Pocock S., Weber MA, Ewen S., Tsioufis K., Tousoulis D., Sharp ASP., Watkinson AF., Schmieder RE., Schmid A., Choi JW., East C., Walton A., Hopper I., Cohen DL., Wilensky R., Lee DP., Ma A., Devireddy CM., Lea JP., Lurz PC., Fengler K., Davies J., Chapman N., Cohen SA., DeBruin V., Fahy M., Jones DE., Rothman M., Böhm M. (2017). Catheter-based renal denervation in patients with uncontrolled hypertension in the absence of antihypertensive medications (SPYRAL HTN-OFF MED): a randomised, sham-controlled, proof-of-concept trial. *Lancet*, 390(10108): 2160–2170
147. Treutiger CJ., Mullins GE., Johansson ASM., Rouhiainen A., Rauvala HME., Erlandsson-Harris H., Andersson U., Yang H., Tracey KJ., Andersson J., Palmblad JEW. (2003). High mobility group 1 B-box mediates activation of human endothelium. *Journal of Internal Medicine*, 254(4): 375–385.
148. Tsung A., Klune JR., Zhang X., Jeyabalan G., Cao Z., Peng X., Stolz DB., Geller DA., Rosengart MR., Billiar TR. (2007). HMGB1 release induced by liver ischemia involves Toll-like receptor 4–dependent reactive oxygen species production and calcium-mediated signaling. *Journal of Experimental Medicine*, 204(12): 2913–2923.
149. Ukena C., Bauer A., Mahfoud F., Schrieck J., Neuberger HR., Eick C., Sobotka PA., Gawaz M., Böhm M. (2012). Renal sympathetic denervation for treatment of electrical storm: first-in-man experience. *Clinical Research in Cardiology*, 101(1): 63–67.
150. Van den Hoek AM., van Heijningen C., Schröder-van der Elst JP., Ouwens DM., Havekes LM., Romijn JA., Kalsbeek A., Pijl H. (2008). Intracerebroventricular administration of neuropeptide Y induces hepatic insulin resistance via sympathetic innervation. *Diabetes*, 57(9): 2304–2310.
151. Vazzana N., Santilli F., Cuccurullo C., Davì G. (2009). Soluble forms of RAGE in internal medicine. *Internal and Emergency Medicine*, 4(5): 389–401.
152. Veelken R., Schmieder RE. (2014). Renal denervation - implications for chronic kidney disease. *Nature Reviews Nephrology*, 10(6): 305–313.
153. Volz HC., Laohachewin D., Seidel C., Lasitschka F., Keilbach K., Wienbrandt AR., Andrassy J., Bierhaus A., Kaya Z., Katus HA., Andrassy M. (2012). S100A8/A9 aggravates post-ischemic heart failure through activation of RAGE-dependent NF-κB signaling. *Basic Research in Cardiology*, 107(2): 250.
154. Wagner M. (2014). A dangerous duo in adipose tissue: high-mobility group box 1 protein and macrophages. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 87(2): 127–133.
155. Wang H., Bloom O., Zhang M., Vishnubhakat JM., Ombrellino M., Che J., Frazier A., Yang H., Ivanova S., Borovikova L., Manogue KR., Faist E., Abraham E., Andersson J., Andersson U., Molina PE., Abumrad NN., Sama A., Tracey KJ. (1999). HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*, 285(5425): 248–251.

156. Wang K., Lu D., Zhang B., Wang S., Liu Q., Zhang Q., Geng J., Shan Q. (2016). Renal denervation attenuates multi-organ fibrosis and improves vascular remodeling in rats with transverse aortic constriction induced cardiomyopathy. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 40(3–4): 465–476.
157. Wang Y., Zhong J., Zhang X., Liu Z., Yang Y., Gong Q., Ren B. (2016). The role of HMGB1 in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Journal of Diabetes Research*, Vol. 2016: ID 2543268.
158. Weber KT., Brilla CG. (1992). Factors associated with reactive and reparative fibrosis of the myocardium. *Basic Research in Cardiology*, 87 Suppl 1: 291–301.
159. Wei S., Li D., Zhang Y., Su L., Zhang Y., Wang Q., Yang D., Li D., Yang Y., Ma S. (2017). Perivascular radiofrequency renal denervation lowers blood pressure and ameliorates cardiorenal fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *PloS One*, 12(4): e0176888.
160. West KL., Castellini MA., Duncan MK., Bustin M. (2004). Chromosomal proteins HMGN3a and HMGN3b regulate the expression of glycine transporter 1. *Molecular and Cellular Biology*, 24(9): 3747–3756.
161. Wilkes DS. (2009). Primary graft dysfunction: it's all the RAGE. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 180(10): 915–916.
162. Willemsen S., Hartog JWL., van Veldhuisen DJ., van der Meer P., Roze JF., Jaarsma T., Schalkwijk C., van der Horst ICC., Hillege HL., Voors AA. (2012). The role of advanced glycation end-products and their receptor on outcome in heart failure patients with preserved and reduced ejection fraction. *American Heart Journal*, 164(5): 742-749.e3.
163. Williams B., Mancia G., Spiering W., Rosei EA., Azizi M., Burnier M., Clement DL., Coca A., De Simone G., Dominiczak A., Kahan T., Mahfoud F., Redon J., Ruilope L., Zanchetti A., Kerins M., Kjeldsen SE., Kreutz R., Laurent S., Lip GYH., McManus R., Narkiewicz K., Ruschitzka F., Schmieder RE., Shlyakhto E., Tsioufis C., Aboyans V., Desormais I. (2018). 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *European Heart Journal*, 39(33): 3021–3104.
164. Witkowski A., Prejbisz A., Florczak E., Kadziela J., Sliwinski P., Bielen P., Michalowska I., Kabat M., Warchol E., Januszewicz M., Narkiewicz K., Somers VK., Sobotka PA., Januszewicz A. (2011). Effects of renal sympathetic denervation on blood pressure, sleep apnea course, and glycemic control in patients with resistant hypertension and sleep apnea. *Hypertension*, 58(4): 559–565.
165. Wolf G., Helmchen U., Stahl RA. (1996). Isoproterenol stimulates tubular DNA replication in mice. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 11(11): 2288–2292.
166. Xiao L., Kirabo A., Wu J., Saleh MA., Zhu L., Wang F., Takahashi T., Loperena R., Foss JD., Mernaugh RL., Chen W., Roberts J., Osborn JW., Itani HA., Harrison DG. (2015). Renal denervation prevents immune cell activation and renal inflammation in Angiotensin II-induced hypertension. *Circulation Research*, 117(6): 547–557.
167. Yan SF., Ramasamy R., Naka Y., Schmidt AM. (2003). Glycation, inflammation, and RAGE: a scaffold for the macrovascular complications of diabetes and beyond. *Circulation Research*, 93(12): 1159–1169.

168. Yoshida T., Yamagishi S., Matsui T., Nakamura K., Ueno T., Takeuchi M., Sata M. (2008). Telmisartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, inhibits advanced glycation end-product (AGE)-elicited hepatic insulin resistance via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation. *Journal of International Medical Research*, 36(2): 237–243.
169. Yu HC., Burrell LM., Black MJ., Wu LL., Dilley RJ., Cooper ME., Johnston CI. (1998). Salt induces myocardial and renal fibrosis in normotensive and hypertensive rats. *Circulation*, 98(23): 2621–2628.
170. Zhang J., Zhang L., Zhang S., Yu Q., Xiong F., Huang K., Wang CY., Yang P. (2017). HMGB1, an innate alarmin, plays a critical role in chronic inflammation of adipose tissue in obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 454: 103-111.
171. Zhang L., Bukulin M., Kojro E., Roth A., Metz VV., Fahrenholz F., Nawroth PP., Bierhaus A., Postina R. (2008). Receptor for advanced glycation endproducts is subjected to protein ectodomain shedding by metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry*, 283(51): 35507–35516.
172. Zhao J., Randive R., Stewart JA. (2014). Molecular mechanisms of AGE/RAGE-mediated fibrosis in the diabetic heart. *World Journal of Diabetes*, 5(6): 860-867.
173. Zhao LM., Zhang W., Wang LP., Li GR., Deng XL. (2012). Advanced glycation endproducts promote proliferation of cardiac fibroblasts by upregulation of KCa3.1 channels. *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology*, 464(6): 613–621.
174. Zheng H., Liu X., Sharma NM., Patel KP. (2016). Renal denervation improves cardiac function in rats with chronic heart failure: Effects on expression of  $\beta$ -adrenoceptors. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 311(2): H337-346.
175. Zoccali C., Mallamaci F., Parlongo S., Cutrupi S., Benedetto FA., Tripepi G., Bonanno G., Rapisarda F., Fatuzzo P., Seminara G., Cataliotti A., Stancanelli B., Malatino LS., Cataliotti A. (2002). Plasma norepinephrine predicts survival and incident cardiovascular events in patients with end-stage renal disease. *Circulation*, 105(11): 1354–1359.
176. Zoccali C., Mallamaci F., Tripepi G., Parlongo S., Cutrupi S., Benedetto FA., Cataliotti A., Malatino LS. (2002). Norepinephrine and concentric hypertrophy in patients with end-stage renal disease. *Hypertension*, 40(1): 41–46.

## 8.0 Anhang

### 8.1 Publikationen und Kongressbeiträge

#### 8.1.1 Originalarbeit

- S. Selejan, D. Linz, **AM. Tatu**, M. Hohl, T. Speer, S. Ewen, F. Mahfoud, I. Kindermann, O. Zamyatkin, A. Kazakov, U. Laufs, M. Böhm; Sympathoadrenergic suppression improves heart function by upregulating the ratio of sRAGE/RAGE in hypertension with metabolic syndrome; Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2018 Sep, 122:34-46.
- S. Selejan, D. Linz, M. Hohl, **AM. Tatu**, P. Markwirth, T. Speer, J. Jankowski, A. Kazakov, C. Werner, F. Mahfoud, M. Böhm; Renal denervation improves renal remodelling and function in a model for hypertension and metabolic syndrome---role of RAGE/sRAGE balance (Submitted)

#### 8.1.2 Poster- und Kongressbeiträge

##### Posterpräsentationen:

Posterpreis 2014 der Deutschen Hochdruckliga, Deutsche Gesellschaft für Hypertonie und Prävention anlässlich des 38. Wissenschaftlichen Kongresses „Hypertonie und Prävention Berlin 2014“ vom 11. Bis 13. Dezember 2014 für die Arbeit

- „Effects of renal sympathetic denervation on expression of receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in obese spontaneously hypertensive rats“. **AM. Tatu**, S. Selejan, D. Linz, M. Hohl, T. Speer\*, F. Mahfoud, U. Laufs, I. Kindermann, M. Böhm

Posterpreis 2016 der Saarländisch-Pfälzischen Internistengesellschaft e.V. für das beste Poster in der Kategorie Kardiologie mit dem Titel

- „Effects of sympathoadrenergic modulation on expression of receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in vivo and in vitro“. **AM. Tatu**, S. Selejan, D. Linz, M. Hohl, T. Speer\*, I. Kindermann, M. Böhm

Weitere Posterbeiträge:

- “Effects of sympathoadrenergic modulation on expression of Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) and its ligands in obese spontaneously hypertensive rats.” SR. Selejan, D. Linz, **AM. Tatu**, M. Hohl, A. Kazakov, T. Speer, I. Kindermann, M. Böhm. European Society of Cardiology Congress 2016
- “Differential regulation of Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) in ischemic and post-inflammatory dilated cardiomyopathy.” SR. Selejan, F. Dahlem, M. Hohl, D. Linz, **AM. Tatu**, S. Ewen, M. Böhm, I. Kindermann. Heart Failure Congress 2016.
- „Regulation der RAGE- und sRAGE-Expression durch das sympathoadrenerge System in vivo und in vitro.“ SR. Selejan, **AM. Tatu**, D. Linz, M. Hohl, S. Ewen, A. Kazakov, U. Laufs, M. Böhm, I. Kindermann. 82. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, April 2016.
- „Sympathoadrenergic activation induces sRAGE-downregulation.“ SR. Selejan, **AM Tatu**, D. Linz, M. Hohl, S. Ewen, A. Kazakov, F. Mahfoud, M. Böhm, I. Kindermann. European Heart Journal (2015) 36 (Abstract Supplement), 152; European Society of Cardiology Congress 2015
- „Plasma HMGB1 is increased in inflammatory cardiomyopathy but not in ischemic cardiomyopathy.“ SR. Selejan, S. Khoskish, A. Kazakov, S. Ewen, **AM.Tatu**, K. Klingel, R. Kandolf, A. Link, M. Böhm, I. Kindermann. European Journal of Heart Failure Abstracts Supplement (2015) 17 (Supplement 1), 313; Heart Failure Congress 2015
- „Regulation of soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) in myocarditis and dilated cardiomyopathy.“ SR. Selejan, A. Kazakov, **AM. Tatu**, S. Ewen, C. Ukena, K. Klingel, R. Kandolf, M. Böhm, I. Kindermann. Clin Res Cardiol 104, Suppl 1, April 2015; Deutsche Gesellschaft für Kardiologie Kongress 2015
- „Dysbalance zwischen zirkulierendem proinflammatorischem HMGB1 und antiinflammatorischen TLR-Peptiden bei Patienten mit Myokarditis.“ S. Selejan, S. Khoskish, **AM. Tatu**, M. Hohl, A. Kazakov, S. Ewen, R. Kandolf, M. Böhm, I. Kindermann. 80. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung, Mannheim 2014
- „Regulation zirkulierender löslicher TLR2- und TLR4-Peptide bei Patienten mit Myokarditis und dilatativer Kardiomyopathie“ S. Selejan, S. Khoskish, **AM. Tatu**, M. Hohl, A. Kazakov, S. Ewen, R. Kandolf\*, M. Böhm, I. Kindermann. DGIM 2014 Wiesbaden

## 8.2 Danksagung

Zum Gelingen meiner Dissertation haben viele Personen beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle sehr herzlich bedanken möchte:

An erster Stelle gebührt mein Dank meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Michael Böhm, der mir als Direktor der Klinik für Innere Medizin III, die Beschäftigung mit dem Thema der vorliegenden Dissertation und die Arbeit in seinem Forschungslabor erst ermöglicht hat. An dieser Stelle möchte ich mich auch besonders für seine große Unterstützung meiner Arbeit und für seine stets motivierende und begeisternde Betreuung bedanken.

Frau Dr. Simina Selejan, meiner lieben Betreuerin, die ich sowohl fachlich, als auch menschlich sehr schätze, möchte ich herzlich für ihre stetige Begleitung und Ausdauer, sowie Unterstützung bei allen Fragen und Problemen, die sich im Rahmen der Doktorarbeit im Verlauf ergeben haben, danken. Besonders danke ihr, dass sie mich mit ihrer humorvollen Art, selbst bei Rückschlägen, stets motiviert hat.

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Dr. Dominik Linz und seiner Arbeitsgruppe, sowie den Mitarbeitern von Sanofi Aventis für die Vorversuche bedanken und dass uns freundlicherweise die Proben der Versuchstiere für unsere Experimente zur Verfügung gestellt wurden.

Außerdem bedanke ich mich herzlich bei Frau Anne Scherer, Frau Nina Rebmann, Dr. Mathias Hohl für die Einarbeitung im Labor, die Einweisung in alle Arbeitstechniken und, dass sie mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Vielen lieben Dank an das gesamte, einzigartige und stets hilfsbereite Laborteam, für die ausgesprochen nette, humorvolle und familiäre Atmosphäre, dank der ich sehr gerne in diesem Labor gearbeitet habe.

Nicht zuletzt möchte ich mich bedanken bei meinem tollen Freundeskreis, der mich nach langen Laborabenden mit geselligen Runden aufgeheitert hat und natürlich bei meinen Eltern, die mir dieses Studium erst ermöglicht haben sowie meinem Bruder und meinen Großeltern die mich alle, nicht nur im Studium und während der Dissertation, großzügig und bedingungslos unterstützt haben. Aber vor allem möchte ich mich an dieser Stelle bei meinem lieben Ehemann, Joachim Zundler bedanken, der mich die letzten Jahre bedingungslos begleitet hat, mir stets geduldig zur Seite steht und mir immer wieder die Kraft gibt, nie aufzugeben.



### **8.3 Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Tag der Promotion: 09.06.2022

Dekan: Prof. Dr. M.D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Böhm

Prof. Dr. Ulrich Böhm