

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Herz-  
und Thoraxchirurgie  
des Universitätsklinikums Halle (Saale)  
(Direktor: Professor Dr. med. R.-E. Silber)

**Der Einfluss von Glykierungsendprodukten aus Lebensmitteln auf  
intrazelluläre Signalkaskaden in humanen Lungenfibroblasten**

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

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

von Kristian Weißenberg  
geboren am 29.06.1979 in Minden (Westfalen)

Betreuer:  
Professor Dr. rer. nat. Dr. med. habil. A. Simm

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. A. Simm, Halle (Saale)
2. PD Dr. rer. nat. U. Rückschloß, Halle (Saale)
3. Prof. Dr. med. C. Zouboulis, Dessau-Roßlau

02.02.2010  
07.09.2010

## **Referat und bibliographische Beschreibung**

Zielsetzung: Advanced Glycation Endproducts (AGEs) spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung degenerativer und tumoröser Erkrankungen. Die vorliegende Arbeit soll die Wirkung exogener AGE-reicher Nahrungsmittel (Kaffee und Brotkruste) auf die Vermehrung bzw. den Zelltod von WI-38-Fibroblasten untersuchen. Dabei steht die Aktivierung von Signalkaskaden wie der Akt-Kinase (survival pathway), ERK1/2-Kinase (Zellproliferation) und p38 (stress pathway) im Mittelpunkt.

Methoden: WI-38-Fibroblasten wurden für 10 min mit 0,3-30 mg/ml Brotkruste- und Kaffeeextrakt (Konzentrationsreihe) sowie für 2,5-60 min mit 10 mg/ml Brot und 1 mg/ml Kaffee (Zeitreihe) stimuliert. Dies erfolgte bei niedriger (subkonfluent) bzw. hoher (konfluent) Zelldichte in Medium mit bzw. ohne Serumzusatz. Die Aktivierung der Akt, ERK1/2 und p38 wurde mit Hilfe von phosphospezifischen Antikörpern mittels der Western-Blot-Technik bestimmt. Parallel dazu erfolgte eine Zellzahlbestimmung am Zellzähler.

Ergebnisse: Brotkruste- und Kaffeeextrakt stimulieren konzentrations- und zeitabhängig die Akt-, p38 MAP- und ERK1/2 MAP-Kinasen. Hohe Konzentration und lange Einwirkdauer führen zu hohem Zellstress (p38-Aktivierung), während niedrigere Dosen bzw. kürzere Einwirkzeiten eher die Akt- bzw. ERK1/2-Aktivierung bewirken. Die gefundenen Effekte sind von den Zellkulturbedingungen abhängig. Im mittleren Konzentrationsbereich induziert v.a. der Brotextrakt eine Zellproliferation, während der Kaffeeinfluss ab einer Konzentration von 0,3 mg/ml zur Abnahme der Zellzahl führt.

Schlussfolgerung: Die analysierten AGEs bewirken in mittleren Dosen und bei mittleren Inkubationszeiten eine Zellproliferation von WI-38 in Kultur. Längere Inkubationszeiten bei höheren Dosen sind zytotoxisch, wobei Kaffee eine stärkere zytotoxische Potenz als Brotkruste hat. Ein niedriger Phospho-p38/Phospho-Akt-Quotient bzw. ein niedriger Phospho-p38/Phospho-ERK1/2-Quotient korrelieren mit Zellproliferation und könnten so evtl. als Proliferationsmarker z.B. von Bindegewebstumoren Auskunft geben. Unterschiedliche Zellzuchtbedingungen müssen bei der Interpretation von Versuchsergebnissen stärkere Berücksichtigung finden.

## Inhaltsverzeichnis

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung.....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1      | Advanced Glycation Endproducts.....  | 1         |
| 1.1.1    | Entstehung und Vorkommen von AGEs.....   | 1         |
| 1.1.2    | Medizinische Bedeutung der AGEs.....   | 3         |
| 1.2      | AGE-bindende Rezeptoren.....   | 4         |
| 1.2.1    | Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE).....                              | 4         |
| 1.2.2    | Scavenger-Rezeptor.....  | 5         |
| 1.3      | MAP-Kinasen-vermittelte Signaltransduktion.....                                      | 5         |
| 1.3.1    | Mehrstufiger Prozess der MAP-Kinasenaktivierung.....                                 | 5         |
| 1.3.2    | AGE-abhängige Aktivierung der MAP-Kinasen.....                                       | 6         |
| 1.3.3    | p38 MAPK.....  | 7         |
| 1.3.4    | Extrazelluläre, regulierende Kinasen (ERKs).....                                     | 8         |
| 1.4      | Akt oder Proteinkinase B (PKB).....  | 9         |
| 1.5      | Zellzyklus und Apoptose.....   | 10        |
| 1.5.1    | Zellzyklusregulation.....  | 10        |
| 1.5.2    | Regulationsmechanismen des Zellzyklus.....   | 10        |
| 1.5.3    | Apoptose - der programmierte Zelltod.....  | 11        |
| 1.5.4    | Das Verhalten von WI-38-Fibroblasten in Zellkultur.....                              | 11        |
| <b>2</b> | <b>Zielstellung .....</b>  | <b>13</b> |
| <b>3</b> | <b>Material und Methoden.....</b>  | <b>14</b> |
| 3.1      | Chemikalien.....   | 15        |
| 3.2      | Geräte.....  | 17        |
| 3.3      | Zellkultur.....  | 18        |
| 3.3.1    | Zelllinie.....   | 18        |
| 3.3.2    | Zellzucht.....   | 18        |
| 3.3.3    | Kultivierung der Fibroblasten auf 24-Well-Kulturschalen.....                         | 19        |
| 3.4      | Stimulationsversuche von WI-38 mit Brotkruste und Kaffee auf<br>24-Well-Platten..... | 19        |
| 3.4.1    | Konzentrationsversuche.....  | 20        |
| 3.4.2    | Zeitkinetiken.....   | 21        |
| 3.4.3    | Zellzählungen.....   | 21        |
| 3.5      | Herstellung der verwendeten Lösungen.....  | 21        |
| 3.5.1    | Pufferlösungen.....  | 21        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 3.5.2    | Benzonase.....  | 22        |
| 3.5.3    | Bromphenolblau-Färbelösung.....   | 22        |
| 3.5.4    | 10x PBS für Zellzucht.....  | 22        |
| 3.6      | Western-Blot.....   | 22        |
| 3.6.1    | Herstellung der Western-Blot-Lysate.....  | 23        |
| 3.6.2    | Herstellung der Western-Blot-Gele.....  | 23        |
| 3.6.3    | Proteinanalyse mittels Western-Blot.....  | 23        |
| 3.7      | Verwendete Antikörper.....  | 24        |
| 3.7.1    | Primärer Antikörper.....  | 24        |
| 3.7.2    | Sekundärer Antikörper.....  | 25        |
| 3.7.3    | Antikörperdetektion.....  | 25        |
| 3.8      | Datenauswertung und Statistik.....  | 25        |
| <b>4</b> | <b>Ergebnisse.....</b>  | <b>26</b> |
| 4.1      | Konzentrationsabhängige Kinaseninduktion durch Kaffee- und Brotextrakt<br>in WI-38.....   | 26        |
| 4.1.1    | Kinasenaktivierung durch Brotextrakt (subkonfluent, ohne FCS).....  | 26        |
| 4.1.2    | Kinasenaktivierung durch Kaffeeextrakt (subkonfluent, ohne FCS).....  | 27        |
| 4.1.3    | Kinasenaktivierung durch Brotextrakt (subkonfluent, mit FCS).....   | 29        |
| 4.1.4    | Kinasenaktivierung durch Kaffeeextrakt (subkonfluent, mit FCS).....   | 29        |
| 4.1.5    | Kinasenaktivierung durch Brotextrakt (konfluent, ohne FCS).....   | 31        |
| 4.1.6    | Kinasenaktivierung durch Kaffeeextrakt (konfluent, ohne FCS).....   | 32        |
| 4.1.7    | Kinasenaktivierung durch Brotextrakt (konfluent, mit FCS) .....   | 33        |
| 4.1.8    | Kinasenaktivierung durch Kaffeeextrakt (konfluent, mit FCS).....  | 34        |
| 4.2      | Die zeitliche Dauer als Einflussgröße auf die intrazelluläre Kinasen-<br>aktivierung durch natürliche AGEs.....                 | 36        |
| 4.2.1    | Kinasenaktivierung durch Brotextrakt (subkonfluent, ohne FCS).....  | 36        |
| 4.2.2    | Kinasenaktivierung durch Kaffeeextrakt (subkonfluent, ohne FCS).....  | 37        |
| 4.2.3    | Kinasenaktivierung durch Brotextrakt (subkonfluent, mit FCS).....   | 38        |
| 4.2.4    | Kinasenaktivierung durch Kaffeeextrakt (subkonfluent, mit FCS).....   | 39        |
| 4.2.5    | Kinasenaktivierung durch Brotextrakt (konfluent, ohne FCS).....   | 41        |
| 4.2.6    | Kinasenaktivierung durch Kaffeeextrakt (konfluent, ohne FCS).....   | 41        |
| 4.2.7    | Kinasenaktivierung durch Brotextrakt (konfluent, mit FCS).....  | 43        |
| 4.2.8    | Kinasenaktivierung durch Kaffeeextrakt (konfluent, mit FCS).....  | 44        |
| 4.3      | Vergleich der Zellkulturbedingungen und deren Einfluss auf die Kinasen-<br>aktivierungen mithilfe der Western-Blot-Analyse..... | 45        |
| 4.3.1    | Untersuchung der Phospho-Akt.....   | 45        |
| 4.3.2    | Untersuchung der Phospho-ERK1/2.....  | 47        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 4.3.3    | Untersuchung der Phospho-p38.....   | 49        |
| 4.4      | Zellzählversuche.....   | 51        |
| 4.4.1    | Zellzählungen in Abhängigkeit unterschiedlicher Kulturbedingungen bei Stimulation mit Brotkruste.....   | 51        |
| 4.4.2    | Zellzählungen in Abhängigkeit unterschiedlicher Kulturbedingungen bei Stimulation mit Kaffeepulver.....   | 52        |
| 4.5      | Explorative Analyse.....  | 54        |
| 4.5.1    | Das Verhältnis zwischen stress pathway (p38) und survival pathway (Akt) im Bezug zur Zellzahl.....  | 55        |
| 4.5.2    | Das Verhältnis zwischen stress pathway (p38) und Zellproliferation (ERK1/2) im Bezug zur Zellzahl .....   | 56        |
| <b>5</b> | <b>Diskussion.....</b>  | <b>57</b> |
| 5.1      | Die intrazelluläre Kinasenaktivierung durch Glykierungsendprodukte aus Nahrungsmitteln in humanen WI-38.....  | 57        |
| 5.1.1    | Konzentrations- und zeitabhängiger Einfluss von Brot- und Kaffeeextrakt auf die Phosphorylierung der Akt-Kinase in humanen Lungenfibroblasten....         | 57        |
| 5.1.2    | Konzentrations- und zeitabhängiger Einfluss von Brot- und Kaffeeextrakt auf die Phosphorylierung der ERK1/2-MAP-Kinase in humanen Lungenfibroblasten..... | 58        |
| 5.1.3    | Konzentrations- und zeitabhängiger Einfluss von Brot- und Kaffeeextrakt auf die Phosphorylierung der p38 in humanen Lungenfibroblasten.....               | 59        |
| 5.2      | Der Einfluss der Kulturbedingungen auf die Kinasenaktivierung in WI-38 Fibroblasten.....  | 60        |
| 5.3      | Der konzentrationsabhängige Einfluss von Brot- und Kaffeeextrakt auf die absolute Zellzahl humaner WI-38-Fibroblasten.....                                | 61        |
| 5.4      | Der Einfluss von Brot- und Kaffeeextrakt auf die absolute Zellzahl unter verschiedenen Kulturbedingungen in WI-38-Fibroblasten.....                       | 61        |
| 5.5      | Wechselwirkungen der Kinasen im Bezug zur Zellzahl .....  | 62        |
| 5.5.1    | Die Wechselwirkungen der Stresskinase p38 und des Überlebenssignals Akt im Bezug zur Zellzahl.....  | 62        |
| 5.5.2    | Die Wechselwirkung der Stresskinase p38 und des Proliferationssignals ERK1/2 im Bezug zur Zellzahl.....   | 63        |
| 5.6      | Relevanz der gewonnenen Ergebnisse für Klinik und Forschung.....  | 63        |
| 5.7      | Einschränkungen dieser Arbeit.....  | 64        |
| <b>6</b> | <b>Zusammenfassung.....</b>   | <b>66</b> |
| <b>7</b> | <b>Literatur.....</b>   | <b>67</b> |

|          |                        |           |
|----------|------------------------|-----------|
| <b>8</b> | <b>Thesen.....</b>     | <b>77</b> |
| <b>9</b> | <b>Lebenslauf.....</b> |           |

## Abkürzungsverzeichnis

|        |  |
|--------|--|
| Abb    | Abbildung  |
| AGE    | <i>advanced glycation endproduct</i>                           |
| AGE-R  | <i>advanced glycation endproduct receptor</i>                  |
| Akt    | Akt-Kinase = Proteinkinase B (PKB)                             |
| Apaf-1 | <i>apoptotic protease activating factor 1</i>                  |
| AP-1   | <i>activator protein 1</i>                                     |
| BSA    | Rinder-Serum Albumin   |
| CD     | <i>cluster of differentiation</i>                              |
| CDK    | <i>cyclin-dependent kinase</i>                                 |
| CML    | Carboxymethylisin  |
| CSAIDs | <i>cytokine-suppressive anti-inflammatory drugs</i>            |
| EGF    | <i>epidermal growth factor</i>                                 |
| ERK    | <i>extracellular regulating kinase</i>                         |
| FCS    | Fötales Kälberserum  |
| FGF    | <i>fibroblast growth factor</i>                                |
| GM-CSF | <i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>        |
| h      | Stunde   |
| HDL    | <i>high density lipoprotein</i>                                |
| HSP27  | <i>heatshock protein 27</i>                                    |
| IAP    | <i>inhibitors of apoptosis</i>                                 |
| IGF    | <i>insulin-like growth factor</i>                              |
| IL     | Interleukin  |
| i-NOS  | <i>inducible nitric oxide synthase</i>                         |
| JAK    | Januskinase  |
| Kap    | Kapitel  |
| LDL    | <i>low density lipoprotein</i>                                 |
| LOX-1  | <i>lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1</i> |
| MAPK   | <i>mitogen activated kinase</i>                                |
| MAPKK  | <i>mitogen activated kinase kinase</i>                         |

|        |   |
|--------|---|
| MAPKKK | <i>mitogen activated kinase kinase kinase</i>         |
| mg/ml  | Milligramm pro Milliliter                             |
| min    | Minuten   |
| MRP    | <i>maillard reaction product</i>                      |
| NF-κB  | <i>nuclear factor kappa B</i>                         |
| OMA    | Oxalsäuremonolysinylamid                              |
| p38    | p38-MAP-Kinase  |
| PDGF   | <i>platelet derived growth factor</i>                 |
| RAGE   | <i>receptor for AGEs</i>                              |
| Ras    | <i>rat sarcoma proto oncogene</i>                     |
| ROS    | <i>reactive oxygen species</i>                        |
| RSK    | <i>ribosomale S6-Kinase</i>                           |
| SR-A   | Scavenger Rezeptor A                                  |
| SR-BI  | Scavenger Rezeptor BI                                 |
| STAT   | Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription |
| Tab    | Tabelle   |
| TAGE   | <i>toxic advanced glycation endproduct</i>            |
| TGF    | <i>transforming growth factor</i>                     |
| TNF    | <i>tumor necrosis factor</i>                          |
| VEGF   | <i>vascular endothelium growth factor</i>             |

## 1 Einleitung

### 1.1 Advanced Glycation Endproducts

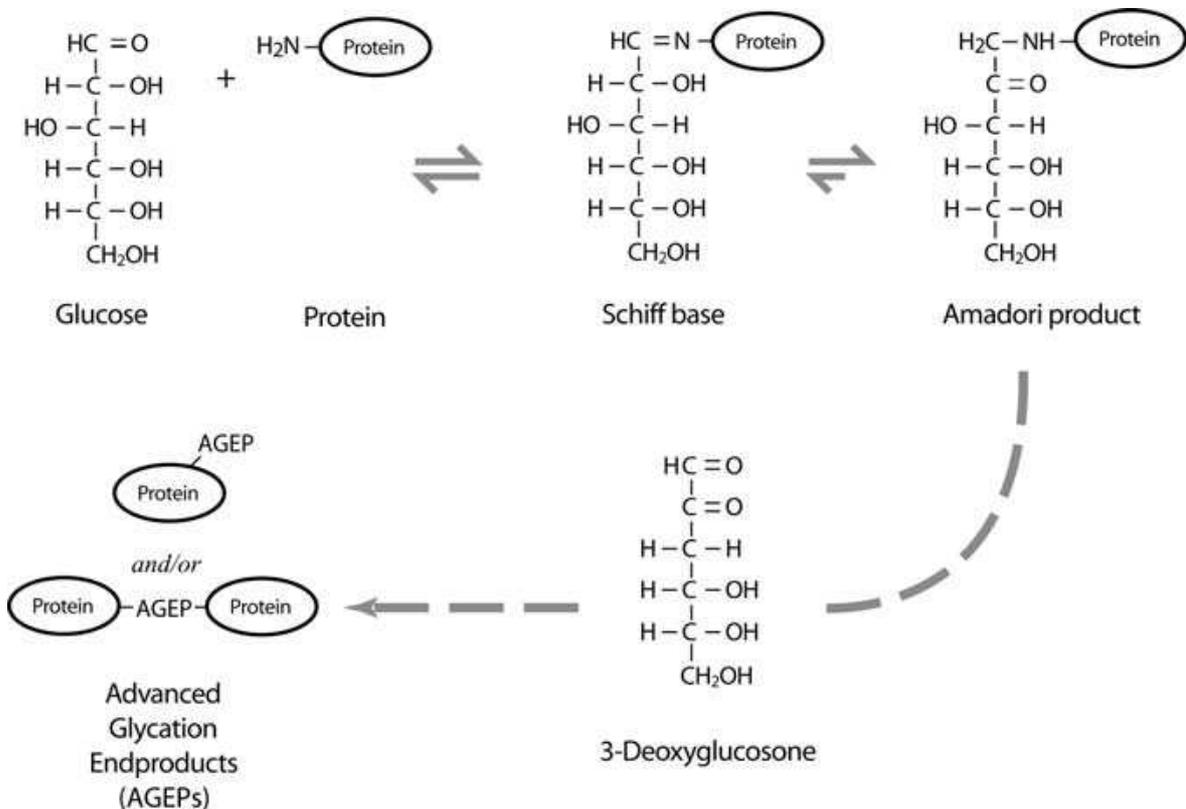
„Advanced Glycation Endproducts“ (AGEs) entstehen im Stoffwechsel durch eine nicht-enzymatische Reaktion von reduzierenden Zuckern mit Proteinen oder Aminosäuren. Diese Stoffwechselendprodukte lagern sich im Laufe des Alterns im Gewebe ab und beschleunigen degenerativ-entzündliche und proliferative Prozesse. Im medizinischen Bereich spielen AGEs eine zentrale Rolle bei der Entstehung von diabetischen Komplikationen wie Mikro- und Makroangiopathien, Nephropathien und Neuropathien. Sie kommen aber auch u.a. als Aroma- und Geschmacksstoffkomponenten in Lebensmitteln vor. In dieser Arbeit soll die Wirkung von exogenen AGEs auf intrazelluläre Signalkaskaden in humanen Lungenfibroblasten unter verschiedenen Zellzuchtbedingungen untersucht werden.

#### 1.1.1 Entstehung und Vorkommen von AGEs

Louis Camille Maillard beschrieb im Jahr 1912 erstmals die Entstehung eines braunefärbten und aromatisch riechenden Gemisches, welches bei mehrstündiger Erhitzung einer Verbindung von Zuckern und Aminosäuren bei 100 °C entsteht. Diese chemische Reaktion, die ohne eine enzymatische Katalyse abläuft, wurde nach ihrem Entdecker als „Maillard-Reaktion“ bezeichnet. Im Englischen wird der Begriff „glycation“ verwendet, der nicht mit der enzymatischen Glykosilierung gleichgesetzt werden darf. Im Deutschen benutzt man außerdem die Begriffe „nichtenzymatische Glykosilierung“ oder „Glykierung“. Die durch Dehydrierungs- und Oxidationsreaktionen entstehenden Verbindungen werden bei „in vitro“-Entstehung vor allem als „Maillard-Verbindungen“ (MRPs) aber auch als „Advanced Glycation Endproducts“ bezeichnet [1]. Die letztere Bezeichnung hat sich für die „in vivo“ entstandenen Verbindungen durchgesetzt. Die Maillard-Reaktion ist für alle Zucker beschrieben worden, die eine freie Carbonylgruppe aufweisen. Glukose ist hierbei die am wenigsten reaktive Verbindung [2]. Fruktose, Fruktose-3-Phosphat, intrazelluläre Zucker und Zuckerfragmentierungsprodukte, wie z.B. Dihydroxyacetonphosphat, Glycerinaldehydphosphat, Deoxyglucoson, Glyoxal und Methylglyoxal, die bei oxidativem Stress im Körper gebildet werden, sind besonders reaktiv [3].

Im ersten Schritt der AGE-Bildung erfolgt die Addition eines Zuckermoleküls oder eines Zuckermetaboliten an eine Aminosäure oder ein Protein. Die Reaktion findet über eine reaktive Carbonylgruppe des Zuckers mit einer primären Aminogruppe statt, z.B. die  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins. Als Folge bildet sich eine Schiff'sche Base, die sich in einem weiteren Reaktionsschritt zum Amadoriprodukt umlagert. In der weiteren Reaktionskette entstehen über Kondensation, De-

hydrierung und Oxidation proteingebundene, z.T. auch farbige, heterozyklische Ringverbindungen mit einem charakteristischen Fluoreszenzspektrum (s. Abb. 1).



**Abbildung 1:** Entstehung von Advanced Glycation Endproducts (aus: Ahmad MS, Ahmad N: Antiglycation properties of aged garlic extract: possible role in prevention of diabetic complications. J Nutr. 136 (2006) 796S-799S)

In vielen protein- und kohlenhydratreichen Lebensmitteln, wie z.B. Brotkruste, Backwaren, gebratenem Fleisch und Fisch, frittierten oder gebratenen Kartoffeln, Cola, Bier und Kaffee entstehen abhängig vom Herstellungsverfahren eine Vielzahl AGE-haltiger Verbindungen durch die Maillard-Reaktion [2]. Es ist bekannt, dass über die Nahrung aufgenommene AGEs zu erheblichen Prozentsätzen resorbiert werden können. So sind experimentell für Fructosyllysin Aufnahmeraten zwischen 60 und 80 % nachgewiesen worden. Ähnliche Aufnahmeraten wurden mit  $^{14}\text{C}$ -markierten MRPs gezeigt, die zu unspezifischer AGE-Bildung führten [4]. In Studien mit radioaktiv markierten AGEs/MRPs konnte dargestellt werden, dass zwischen 5 und 30 % dieser Verbindungen über den Darm absorbiert werden und mit der Blutzirkulation in den ganzen Körper gelangen [5,6]. Die bekanntesten in Lebensmitteln nachgewiesenen Produkte sind Carboxymethyllysin (CML) [7], Oxalsäuremonolysinylamid (OMA) [8] und Pentosidin [9].

AGEs entstehen nicht nur bei der Verarbeitung von Lebensmitteln, sondern auch endogen durch nichtenzymatische Glykierung im menschlichen Körper. Äquivalente Verbindungen im menschl-

chen Organismus sind Substanzen wie CML [7], OMA [8], Imidazolium Cross Links [9] und Glucosepane [10]. Als Kohlenhydratkomponenten wirken hier v.a. Glucose, Fructose, Glyoxal und Methylglyoxal. Mit zunehmendem Alter lagern sich AGEs vermehrt im Organismus ab.

### 1.1.2 Medizinische Bedeutung der AGEs

Generell ist die AGE-Bildung im menschlichen Organismus ein normaler Vorgang. Insbesondere kommt es im Verlauf des Alterns zu einer vermehrten AGE-Ablagerung bei Proteinen mit langsamem Turnover. Dazu findet sich ein vermehrter Nachweis von AGEs in Geweben von Menschen mit alterstypischen Krankheitsbildern, wie z.B. Diabetes mellitus oder Morbus Alzheimer. In diesem Zusammenhang wurden diese Modifikationen auch als Biomarker des Alterns interpretiert [11]. Der vermehrten Anreicherung liegen zwei Pathomechanismen zu Grunde: erhöhter oxidativer Stress durch gesteigerte Glukosekonzentration [12] oder eine verminderte Ausscheidung von AGEs aufgrund einer Nierenfunktionsstörung [13]. Wie bereits erwähnt, kann die vermehrte Bildung von AGEs zu verschiedenen Komplikationen führen, wie z.B. Mikro- und Makroangiopathien, Nephropathien oder Retinopathien. Von diesen Glykierungsprozessen betroffen sind v.a. „langlebige“ Proteine, wie Amyloide, Kollagen in Bindegewebsstrukturen der extrazellulären Matrix (z.B. Knorpel, Knochen, Sehnen und Haut) und das Augenkristallin [14, 15, 16]. Im Gelenkknorpel führt eine Anreicherung von AGEs zu vermehrter Steifigkeit des Gewebes und macht es so für mechanische Schädigung empfänglicher [16, 17]. Bei Morbus Alzheimer lassen sich AGEs vermehrt in senilen Plaques nachweisen. Deren Glykierung führt zu einer Aggregation der Plaques *in vitro* und spielt wahrscheinlich bei der Progression der Erkrankung eine erhebliche Rolle [18, 19].

Des Weiteren werden die nichtenzymatisch entstandenen Glykierungsprodukte als Modulatoren für Apoptoseprozesse diskutiert. In diesem Zusammenhang scheinen sie auch bei der Entstehung maligner Tumore bedeutsam zu sein. Der Wirkungsmechanismus ist noch nicht im Detail geklärt, jedoch gilt als sicher, dass AGEs auch über bestimmte Rezeptoren (s. Kap. 1.2) wirken. Rezeptorvermittelte sowie proteinvernetzende Reaktionen spielen darüber hinaus bei der Entzündungsentstehung eine wichtige Rolle. Anhand diabetischer Mausmodelle konnte gezeigt werden, dass AGE-reiche Testnahrungen einen erhöhten Spiegel an AGEs im Serum und in Nieren der Tiere zur Folge hatten, was zu einer Hochregulation von pro-inflammatorischen Markern wie TGF- $\beta$  und Laminin-B1 führt und mit einer erhöhten Mortalität durch eine Beschleunigung einer diabetischen Nephropatie einhergeht [20]. Makrophagen und Mikrogliazellen exprimieren unter AGE-Einfluss pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  und radikalinduzierende Enzyme (iNOS) [2, 21, 22, 23]. Ein Vergleich diätisch mit AGEs behandelter Mäuse und einer Kontrollgruppe konnte in einer weiteren Studie zeigen, dass erhöhte AGE-Spiegel in der Nahrung zu einem erhöhten Plasmainsulinspiegel, einem erhöhten Körpergewicht bei gleicher Nahrungsaufnahme und zu schlechteren Ergebnissen im Glucose-Toleranztest führten [24]. Hofman *et al* (2002)

belegten in derselben Studie, dass die diätetisch behandelten Mäuse einen erniedrigten HDL-Cholesterinspiegel hatten. Am menschlichen Organismus konnte gezeigt werden, dass gut eingestellte Diabetespatienten, die eine AGE-reiche Kost erhalten hatten, im Vergleich zu AGE-arm ernährten Probanden nach sechs Wochen signifikant erhöhte Entzündungsparameter wie TNF- $\alpha$ , VCAM-1 und CRP (C-reaktives Protein) im Serum aufwiesen [6]. Versuche mit jungen männlichen Wistar-Ratten erbrachten nach zweiwöchiger AGE-reicher Ernährung mit Extrakten aus Brotkruste und Kaffeepulver erhöhte AGE-Level im Lungengewebe der Tiere [25].

### 1.2 AGE-bindende Rezeptoren

AGEs können nach Bindung an spezifische Rezeptoren eine Reihe bekannter Signaltransduktionswege aktivieren (JAK/STAT, Ras, ERK, p38). Über nachfolgende Transkriptionsfaktoren wie NF $\kappa$ B und AP-1 können zelltypabhängig bestimmte zelluläre Gene aktiviert werden. Einige dieser Gene sind den Wachstumsfaktoren zuzuordnen (z.B. VEGF, PDGF, TGF- $\beta$ ). Neben dem Superperoxid/NF $\kappa$ B-Weg werden über Phosphorylierungskaskaden (Serin-/Threoninkaskaden) noch weitere Signalwege aktiviert [2, 21, 22, 23]. Exemplarisch sollen im Folgenden zwei Rezeptoren detaillierter beschrieben werden, für die ein Zusammenhang mit der in dieser Arbeit untersuchten MAP-Kinasenaktivierung bekannt ist.

#### 1.2.1 Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE)

Der am besten charakterisierte Rezeptor ist RAGE. Er wurde zunächst in Rinderlungen nachgewiesen [26]. Seine Expression findet man auf verschiedenen Zelltypen wie u.a. Endothelzellen, glatter Muskulatur, Makrophagen, Mesangiumzellen, Blutplättchen und Lungenfibroblasten [27]. RAGE gehört zur Familie der Immunglobuline und besteht aus einer intrazellulären Domäne, einer transmembranösen Domäne und einer extrazellulären Domäne, welche als Ligandenbindungsstelle dient. Die extrazelluläre Domäne beinhaltet drei immunoglobulinähnliche Regionen: eine V-Typ-Domäne gefolgt von zwei C-Typ-Domänen (benannt C und C'). Als Hauptligandenbindungsstelle dient die V-Domäne. Die Funktion der C- und C'-Regionen besteht nach Kislinger *et al.* (1999) wahrscheinlich darin, die V-Domäne zu stabilisieren [28]. RAGE enthält außerdem eine einzelne transmembranöse Domäne und einen zytosolischen Schwanz, der aus 43 Aminosäuren besteht. Die intrazelluläre Domäne hat keine bekannten Erkennungssequenzen bzw. Signalmotive, ist aber wichtig für die RAGE-abhängige Zellaktivierung. Eine experimentell hergestellte Form des RAGE ohne den zytosolischen Schwanz bindet zwar die Liganden entsprechend der Wildtypform, hat aber keine intrazelluläre Signalaktivierung zur Folge [29].

RAGE ist ein Multiligandenrezeptor. Im Unterschied zu den nachfolgend beschriebenen Scavenger-Rezeptoren kommt es aber nach Bindung eines AGEs nicht zu einer Endozytose des Liganden, sondern zu einer Aktivierung bestimmter intrazellulärer Signalkaskaden. Als Liganden

wurde z.B. Carboxymethyllysin (CML) charakterisiert [28], das dem Rezeptor allerdings zusammen mit einem Protein oder Polypeptid präsentiert werden muss, um von ihm erkannt zu werden. Über Ligandenbildung kommt es normalerweise zur Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Weges, welcher wiederum proinflammatorische Gene aktiviert. NF- $\kappa$ B kann aber auch selbst RAGE aktivieren. Unter Bedingungen wo viele RAGE-Liganden vorhanden sind (z.B. Diabetes mellitus, Artherosklerose oder Amyloid- $\beta$ -Protein bei Morbus Alzheimer) etabliert sich, im Gegensatz zu anderen AGE-Rezeptoren, eine positive Rückkopplung mit der Folge einer chronischen Entzündungsreaktion [30, 31, 32].

### **1.2.2 Scavenger-Rezeptor**

Neben RAGE haben einige AGEs auch eine Affinität zum Scavenger-Rezeptor der Makrophagen [33]. Dieser Rezeptor spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Artherosklerose, was vermutlich mit der über ihn vermittelten Transformation von Makrophagen zu Schaumzellen zu tun hat. Neben wichtigen Liganden wie LDL und HDL können auch AGE-modifizierte Proteine an Mitglieder der Scavenger-Rezeptor-Familie binden. Zu nennen sind SR-A, CD36, SR-BI und LOX-1 [34]. Für AGEs konnte nachgewiesen werden, dass SR-A einer der Hauptrezeptoren bei der endozytotischen Aufnahme von AGE-Liganden in der Peripherie artherosklerotischer Läsionen ist [33]. Cholesterin führt, über den SR-A vermittelt, zu einer Aktivierung der in dieser Arbeit untersuchten und in Kap. 1.3.3 beschriebenen Stresskinase p38. In der Folge einer solchen Aktivierung lässt sich eine Apoptose der Makrophagen nachweisen [35].

### **1.3 MAP-Kinasen-vermittelte Signaltransduktion**

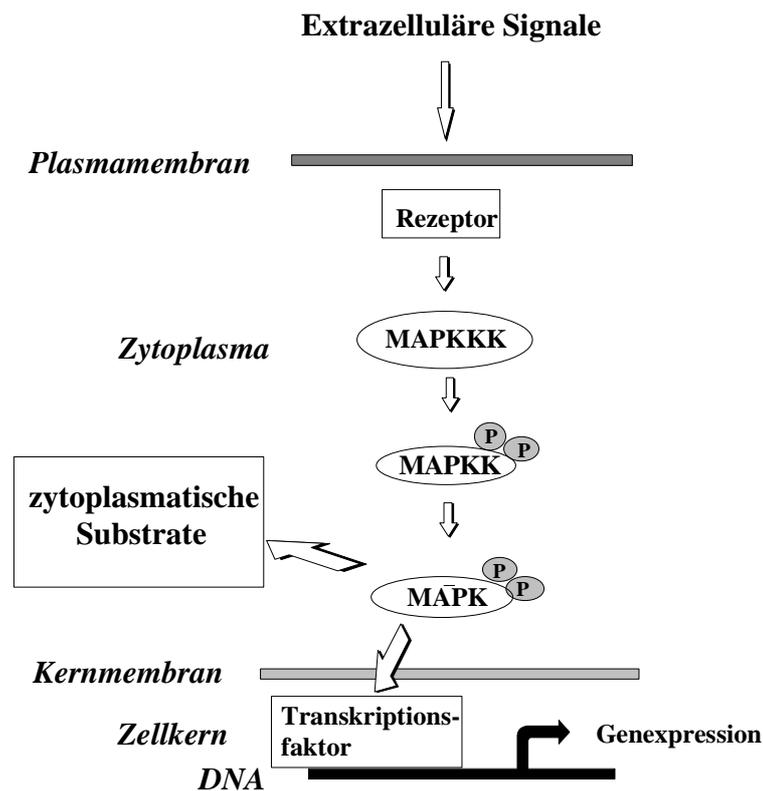
Es ist bekannt, dass AGEs dosis- und zeitabhängig zu einer Aktivierung von MAP-Kinasen führen können. „In vivo“ kommt es dabei zur Aktivierung und Triggerung von zellulären Signalkaskaden, die eng mit Entzündungsreaktionen, zellulärer Proliferation, Tumorstadium und Metastasierung verknüpft sind [36, 37, 38, 39].

#### **1.3.1 Mehrstufiger Prozess der MAP-Kinasenaktivierung**

Alle MAP-Kinasen-Wege werden über einen zentralen dreistufigen Prozess durch Phosphorylierung aktiviert, wobei typischerweise hierarchisch angeordnete Proteinkinasen wirken (Abb.2): MAPKKKs (auch bezeichnet als MEKKs oder MKKKs), MAPKKs (auch bezeichnet als MEKs oder MKKs) und MAPKs. In der Folge regulieren die aktivierten MAP-Kinasen über weitere Phosphorylierungsschritte die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren oder weiterer Kinasen. Dabei werden die MAP-Kinasen über eine Phosphorylierung von Tyrosin (Tyr)- und Threonin (Thr)-

Resten innerhalb eines Thr-X-Tyr-Motivs in der Aktivierungsschleife der Kinasen-Subdomäne VIII aktiviert. MAPKKs wiederum werden über eine Seronin/Threonin-Phosphorylierung aktiviert, ebenfalls innerhalb eines bestimmten Motivs der Kinasen-Domäne-Subdomäne VIII [40, 41, 42, 43].

Die MAP-Kinasen weisen untereinander homologe Strukturen und ähnliche biologische Eigenschaften auf.



**Abbildung 2:** Aktivierungskaskade der MAP- Kinasen

### 1.3.2 AGE-abhängige Aktivierung der MAP-Kinasen

An der menschlichen Adenocarcinomzelllinie Caco-2 wurde nachgewiesen, dass Casein-N<sup>c</sup>- (Carboxymethyl)lysin (Casein-CML) in Abhängigkeit von Zeit und Dosis zu einer Aktivierung der ERK1/2-MAP-Kinase führt [44]. An der gleichen Zelllinie konnte die dosis- und zeitabhängige Aktivierung der ERK1/2-MAP-Kinase durch geröstete Nahrungsmittel wie Brotkruste und Kaffeeextrakt belegt werden [45].

Die MAP-Kinasen gehören zu den am besten untersuchten Regulationsmechanismen eukaryotischer Zellen, wobei verschiedene MAP-Kinasen-Kaskaden an der Regulation der Embryogenese, der Zelldifferenzierung, des Zellwachstums und der Apoptose beteiligt sind. Die MAP-Kinasen der Säugetiere können durch eine große Bandbreite verschiedener Stimuli, aber auch über

verschiedene Rezeptorfamilien aktiviert werden. Hierzu gehören Hormone, die über Thyrosinkinase-Rezeptoren wirken, wie das Insulin oder auch Wachstumsfaktoren, wie der Epidermal Growth Factor (EGF), Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Fibroblast Growth Factor (FGF), aber auch die über RAGE vermittelte Aktivierung durch AGEs. Des Weiteren können MAP-Kinasen auch über G-Proteine aktiviert werden (z.B. nach Stimulation mit Endothelin oder Angiotensin II). Entzündungszytokine der Tumor-Nekrose-Faktor-Familie (TNF) oder Zellstress, wie osmotischer Schock und ionisierende Strahlung, führen ebenfalls zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen. Diese sind mitverantwortlich für die Aktivierung der Gentranskriptionen und Proteinsynthese und somit für nachfolgende physiologische Antworten wie Induktion des Zellzyklus, der Apoptose oder Zelldifferenzierung. In Säugern sind drei wichtige MAP-Kinasengruppen identifiziert worden: p38, „Extracellular Regulated Kinases“ (ERKs) und die c-Jun-N-terminalen-Kinasen (JNKs), von denen in dieser Arbeit die ersten beiden untersucht werden.

### 1.3.3 p38 MAPK

Die p38 MAPK ist eine stressaktivierte, in Säugetieren vorkommende MAP-Kinasenfamilie. Ursprünglich wurde p38 als ein 38 kDA großes Polypeptid charakterisiert, welches auf osmotischen Zellschock reagiert [46]. Die p38 wird „in vivo“ stark durch Umweltstress und inflammatorische Zytokine aktiviert. Bekannt sind vier Untergruppen (p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  und p38 $\delta$ ). Die Aktivierung dieser MAP-Kinase führt über eine Aktivierung der MAPKAP-Kinase-2 („MAPK-activated protein kinase-2“) und der MAPKAP-Kinase-3, zwei strukturell und funktionell ähnlichen Proteinkinasen, zur Phosphorylierung und Aktivierung eines 27 kDA großen Hitzeschockproteins (HSP27), wodurch unter Zellstress auch antiapoptotische Mechanismen greifen. Die p38 wird neben Umweltstress (UV-Strahlung, etc.) auch durch inflammatorische Reizung (z.B. Interleukin-1), Insulin und Wachstumsfaktoren, wie Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF), Fibroblast Growth Factor (FGF) und Erythropoetin aktiviert [47]. Eine Aktivierung der Kinase kann also als Marker für Zellstress gelten. Eine experimentelle Hemmung der p38 gelang mittels der sog. „zytokine-suppressive anti-inflammatory drugs“ (CSAIDs), wie das SB203580. Jedoch konnten bisher lediglich die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Isoformen gehemmt werden, was eine signifikante Reduktion der Anzahl der Entzündungsmediatoren in Zellkulturen zur Folge hatte [48]. Anhand von Experimenten mit FS-4-Fibroblasten und Granulazellen des Kleinhirns, bei denen eine induzierte Apoptose mittels des spezifischen p38-Blockers SB203580 gehemmt werden konnte, wird die Bedeutung der p38-Kinase für den programmierten Zelltod deutlich [47, 49].

Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass von der p38-Signalkaskade nicht nur apoptotische Signale ausgehen. Die kardioprotektive Wirkung endogener und exogener Cannabinoide über Cannabinoidrezeptoren (CB<sub>2</sub>-Rezeptor) scheint auch über den p38-Signalweg gesteuert zu werden [50]. Die p38-MAP-Kinase könnte in Zukunft ein neues pharmakologisches Ziel bieten, um chroni-

sche Entzündungsprozesse zu therapieren, wie dies bereits für die entzündliche Osteolyse propagiert worden ist [51].

### **1.3.4 Extrazelluläre, regulierende Kinasen (ERKs)**

Diese ERK-Familie besteht aus sechs verschiedenen Kinasensubtypen. Die in dieser Arbeit untersuchten ERK1 und ERK2 (44 und 42 kDA groß) stimmen zu 83 % in ihrer Aminosäuresequenz überein. Eine Phosphorylierung führt zu einer Aktivierung von verschiedenen zytoplasmatischen Substraten. Einige dieser zytoplasmatischen Substrate wie z.B. die ribosomale S6-Kinase (RSK) translozieren anschließend in den Zellkern und führen so zu einer Translation und Transkription von für das Zellwachstum wichtiger mRNA. Es gibt aber auch eine direkte Translokation der ERK1/2 selbst in den Zellkern. Dort kommt es zur Phosphorylierung und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die das Zellwachstum aktivieren und einer Apoptose entgegen wirken [52, 53]. Neben dem Zellwachstum sind die ERK1/2 auch an der Zelldifferenzierung beteiligt [54]. Eine kurz andauernde Aktivierung von ERK führt zu einer die Proliferation steigernden Reaktion, eine längere Aktivierung eher zu einer Zelldifferenzierung von HL-60-Zellen [55]. Die ERK1/2 werden nach Bindung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren an Membranrezeptoren aktiviert, jedoch können auch eine Depolarisierung der Zellmembran und/oder ein Calciumeinstrom ihre Aktivierung bewirken. Eine Aktivierung der ERK1/2 scheint in neuronalen und renalen Epithelien allerdings auch mit einer vermehrten Apoptoserate einherzugehen. Eine erhöhte ERK1/2-Phosphorylierung konnte hier durch oxidativen Stress, Giftstoffe und einer Hemmung von Wachstumsfaktoren provoziert werden, während eine gezielte Hemmung der ERK-Kinasenkaskade eine Blockade der Apoptose zur Folge hatte [56]. Auch mechanische Gewebereize können zu einer MAP-Kinasenaktivierung führen. Eine zyklische mechanische Belastung von Herzfibroblasten führt z.B. zu einer Aktivierung der ERK1/2 und der p38. Es konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der ERK1/2 die durch mechanische Reize induzierte Expression von Prokollagen- $\alpha$ 1 hemmt, während eine experimentelle Hemmung der p38-Aktivierung zur Steigerung der Expression führt [57].

Bei der malignen Zellproliferation spielt die gesamte zur Aktivierung von ERK führende Kaskade (Ras/Raf/MEK/ERK) eine Rolle. Bei 30 % aller Tumorleiden ist dieser verschiedene Proto-Onkogene enthaltende Stoffwechselweg gestört [52]. In der Krebstherapie werden bereits Substanzen getestet, welche die ERK-Aktivierung hemmen und dadurch eine unkontrollierte Zellproliferation einschränken können.

An Nierentubulizellen wurde gezeigt, dass AGEs die p42 MAP-Kinase ERK2 aktivieren und nachfolgend der Transkriptionsfaktor AP-1 exprimiert wird [58], welcher zur Aktivitätsveränderung bestimmter Gene führt.

### 1.4 Akt oder Proteinkinase B (PKB)

Eine weitere in dieser Arbeit untersuchte Kinase ist die Akt- oder auch als Proteinkinase B bekannte PKB, welcher eine zentrale Bedeutung für die Signaltransduktion des Zellüberlebens zugeschrieben wird [59, 60]. Bisher wurden drei Isoformen isoliert (Akt1, Akt2 und Akt3) [61]. Jede Isoform besteht aus einem Aminoende mit einer sog. „pleckstrin-homology“ (PH)-Domäne, einer Kinasedomäne und einer regulatorischen Domäne am Carboxyende. Das Protein hat eine Größe von 57 kDA.

Eine schnelle Aktivierung der Akt kann durch Reize wie Insulin und verschiedene Wachstumsfaktoren erzielt werden. Die Aktivierung läuft über einen Phosphatidylinositol-3-Kinase-(PI3K)-abhängigen Weg. Ein Stimulus führt PI3K-abhängig zur Bildung von 3-Phosphoinositiden (PtdIns(3,4) $P_2$  und PtdIns(3,4,5) $P_3$ ), welche an die PH-Domäne der Akt-Kinase binden. Man vermutet in der Folge eine Konformationsänderung in der Kinasenstruktur. In einem zweiten Schritt findet eine Translokation vom Zytosol zur Plasmamembran statt, wo eine Kinasenaktivierung durch Phosphorylierung erfolgt [62]. Es ist unklar, wie die Akt-Kinase zur Zellmembran gelangt, allerdings scheint hierfür ein intaktes Aktin-Zytoskelett notwendig zu sein [63]. Eine Phosphorylierung der Akt kann an zwei regulierenden Strukturen erfolgen, die in der Kinase-Domäne (Thr<sup>308</sup> für die Akt1 nachgewiesen) bzw. in der C-terminalen Regulationsdomäne (Ser<sup>473</sup>, ebenfalls für die Akt1 nachgewiesen) liegen. Für die Phosphorylierung der ersteren konnte man die Phosphatidylinositol-3-abhängige Kinase (PDK1) identifizieren. Die Phosphorylierung am C-terminalen Bereich konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Nach Aktivierung der Akt-Kinase gelangt diese wieder in das Zytosol und phosphoryliert/aktiviert eine Reihe von Zielproteinen [64].

Es ist erwiesen, dass die Akt bei einer Reihe von Zelltypen antiapoptotisch wirkt. In der Skelettmuskulatur und bei Adipozyten scheint der Akt-Kinase eine entscheidende Mediatorrolle bei der durch Insulin regulierten Glucoseverwertung zuzukommen [63]. Der Akt-Signalweg spielt außerdem eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Herzwachstums und der Angiogenese der Koronarien [65].

In experimentellen Studien hat man die phosphorylierte Form der Akt-Kinase als Marker zur Vorhersage für das Outcome bestimmter Krebsarten untersucht. Bei Prostatakarzinompatienten kann eine Zunahme der aktivierten Form der Kinase als Marker für ein schlechtes Outcome interpretiert werden [66]. Eine Korrelation zwischen der Akt-Aktivierung und Akt-Lokalisation mit dem invasiven Wachstum und der Onkogenexpression wurde in einer anderen Studie für das Schilddrüsenkarzinom belegt [67]. Darüber hinaus scheint die Aktivierung der Akt-Kinase eine wichtige Rolle im Fortschreiten des papillären und auch des follikulären Schilddrüsenkarzinoms zu spielen [68].

### 1.5 Zellzyklus und Apoptose

Für das weitere Verständnis dieser Arbeit ist der Einfluss verschiedener Zellzuchtbedingungen auf Zellkulturen von Bedeutung. Allgemein induziert ein serumhaltiges Kulturmedium ein Fortschreiten des Zellzyklus und damit eine Vermehrung von Zellen, während unter Serumentzug (Hungerbedingung) die Proliferation der Zellen eingestellt wird und in manchen Fällen auch der programmierte Zelltod bzw. Nekrose eintritt.

#### 1.5.1 Zellzyklusregulation

Die Zellproliferation verläuft nach einer genauen Abfolge von Prozessen, die als Zellzyklus bezeichnet werden [69]. Man unterteilt die Phasen der DNA-Replikation (S-Phase) und der Mitose (M-Phase), die durch Zwischenphasen (Gap-Phasen = G-Phasen) voneinander getrennt werden. Eine sich proliferierende Zelle durchläuft somit den Zyklus in der Reihenfolge  $G_1$ -S- $G_2$ -M. Am Übergang der G-Phasen liegen wichtige Kontrollpunkte, wobei der Zellzyklus nur fortgesetzt wird, wenn vorherige zelluläre Prozesse ordnungsgemäß beendet wurden. Eine ruhende, sich nicht teilende Zelle befindet sich in der  $G_0$ -Phase, einem Status der minimalen mRNA und Proteinsynthese [70]. Durch extrazelluläre Aktivatoren (wie z.B. im FCS vorhandene Wachstumsfaktoren) kommt es nach Bindung an einen spezifischen Rezeptor innerhalb von sechs Stunden zur Expressierung von sog. „Immediate Early Response Genes“ [71]. Zu dieser Gruppe der Proto-Onkogen-Proteine zählen c-fos, c-myc und c-jun, denen allen eine wichtige Funktion im Fortschreiten der  $G_1$ -Phase zugeschrieben wird. C-fos und c-jun bilden Heterodimere (=AP1), welche an der AP-1-Seite von DNA-Sequenzen binden und hier als Transkriptionsfaktoren wirken [72, 73]. Für ein weiteres Fortschreiten des Zellzyklus benötigen die Zellen eine zweite Gruppe von Wachstumsfaktoren, die sog. Progressionsfaktoren, von denen IGF-1, EGF, FGF und TGF- $\beta$  von Bedeutung sind [74]. In der  $G_1$ -Phase bereiten sich die Zellen auf die S-Phase vor. Zwischen S- und M-Phase liegt die  $G_2$ -Phase, in der für die Zellteilung notwendige m-RNAs und Proteine synthetisiert werden.

#### 1.5.2 Regulationsmechanismen des Zellzyklus

Der Zellzyklus kann an zwei sog. Checkpoints reguliert werden, die an den Übergängen  $G_1$ -S bzw. S- $G_2$  intra- und extrazelluläre Bedingungen prüfen. Hier wird er auf unvollständige Replikation, fehlerhafte DNA oder mangelhafte Zellumgebung hin unterbrochen [75]. Die Regulation im Zellzyklus erfolgt durch eine Phosphorylierungskaskade cyclinabhängiger Kinasen (CDKs) an regulierenden Proteinen, die DNA-Replikation, Mitose und Zytokinese initiieren. Die Cycline wiederum sind regulatorische Proteine, die die Kinasen an ihren Wirkungsort geleiten. Eine negative Regulation des Zellzyklus wird unter anderem durch inhibitorische Proteine (CKI) verursacht, die in der  $G_1$ -Phase an Cyclin/CDK-Komplexe binden und diese inhibieren [76]. Neben den genannten Fak-

toren wirken eine Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren und regulatorischer Proteine auf den Zellzyklus ein, deren Aufzählung in diesem Kontext zu weit führen würde.

### **1.5.3 Apoptose - der programmierte Zelltod**

Apoptose wird intrazellulär durch sog. Caspasen (Proteasen) gesteuert, deren Aufgabe darin besteht, Zellstrukturen durch Proteolyse zu zerstören (z.B. die Lamina des Nukleus) oder andere regulatorische Proteine durch Proteinspaltung zu aktivieren.

Der extrinsische Weg wird nach Bindung so genannter Todesliganden (z.B. TNF- $\alpha$ , FasL) durch rezeptorvermittelte Aktivierung eines „death-inducing signalling complex“ (DISC) eingeleitet. Nach mehreren Zwischenschritten unter Einbeziehung von Caspase 8 vermitteln proapoptische Proteine der Bcl-2-Familie (z.B. Bak und Bax) die Freisetzung von Proteinen wie Cytochrom c aus dem Kompartiment zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran und triggern so die Apoptose.

Intrinsisch stört die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  die Funktion des Endoplasmatischen Reticulums, aktiviert Bak und Bax, Caspase 9 und 12 und setzt weiteres  $\text{Ca}^{2+}$  frei. Caspase 9 ist über weitere Caspasen (3 und 7) an Proteinabbau, DNA-Fragmentierung und Translokation von Phosphatidylserin zur Kennzeichnung der apoptotischen Zellen für Makrophagen beteiligt.

Mitochondrial lösen Sauerstoffradikale, NO,  $\text{Ca}^{2+}$  und Fettsäuren unter Vermittlung von Bak und Bax die Freisetzung von Cytochrom C aus dem äußeren Mitochondrienkompartiment aus. Über Zwischenschritte werden wieder Caspase 3 und 7 aktiviert.

Histologisch kommt es zur Zellschrumpfung: Zellmembran und Organellen bleiben weitestgehend intakt, die DNA kondensiert und bricht auseinander. Es entstehen letztendlich apoptotische Körper, die phagozytiert werden können.

Über die Hemmung von Caspasen und Procaspasen greifen Proteine der IAP-Familie („inhibitors of apoptosis“) regulierend in den programmierten Zelltod ein [64, 77].

### **1.5.4 Das Verhalten von WI-38-Fibroblasten in Zellkultur**

Da für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche humane embryonale Lungenfibroblasten der Zelllinie WI-38 verwendet wurden, erfolgt nun die Darstellung bekannter Eigenschaften dieser Zellen in Kultur.

WI-38-Fibroblasten wurden ursprünglich von Leonard Hayflick aus dem drei Monate alten Lungengewebe eines weiblichen Embryos isoliert. Kennzeichnend für diese Zellen ist eine endliche Lebenszeit in vitro ( $50 \pm 10$  Populationen). Sie sind nicht transformiert und haben einen diploiden Karyotyp. Etwa ab der 50. Populationsverdopplung kommt es zur Unfähigkeit, die S-Phase des Zellzyklus zu durchlaufen, was als Altern (replikative Seneszenz) bezeichnet wird. Charakteristisch

ist hierfür ein Anstieg der Zellgröße. WI-38-Zellen wachsen adhärent und nicht in Suspension [78, 79].

Faßhauer (1998) zeigt in seiner Dissertationsschrift, dass WI-38-Fibroblasten unter Serummangel in  $G_0$  arretieren und nach anschließender Serumzugabe wieder in den Zellzyklus eintreten [80]. Um eine ruhende Zelle wieder zur Proliferation anzuregen, sind, wie oben beschrieben, Signaltransduktionswege notwendig, welche eine Verbindung extrazellulärer Signale mit dem Zellzyklus vermitteln [81]. WI-38-Fibroblasten wachsen „anchorage dependent“ [78, 79], d.h. dass diese Zellen für ein proliferatives Wachstum in Kultur die Anheftung an ein geeignetes Substrat benötigen (z.B. Zellkulturschale). Dieser Vorgang ist reversibel wenn die Anheftung an eine Kulturschale und damit die Proliferation unterbrochen wurde. Wird den vitalen Fibroblasten die Anheftung an ein geeignetes Substrat ermöglicht, kommt es zum Wiedereintritt in den Zellzyklus [82].

### 2 Zielstellung

Bisher ist wenig bekannt, welchen Anteil exogene AGEs aus der Nahrung auf Altersveränderungen des Menschen haben. Da die Fibrose eine wichtige Altersveränderung ist, war es das Ziel der Dissertation, die Aktivierung von Modellfibroblasten (WI-38) durch Glykierungsendprodukten aus Lebensmitteln genauer zu analysieren. Im ersten Teil dieser Arbeit sollte daher zunächst der Einfluss solcher AGEs auf die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden von WI-38-Fibroblasten untersucht werden, die eine Bedeutung für das Zellüberleben (Akt), die Zellproliferation (ERK1/2) oder für die Induktion des Zellstress (p38) haben. Diese intrazellulären Signalwege sollten dann durch Analysen der Zellzahl (Zellvermehrung versus Zelltod) ergänzt werden.

Häufig kann man in der Literatur bei vergleichbarer Stimulation von Zellen mit ähnlichen Faktoren kontroverse Ergebnisse finden. Dabei stellt man fest, dass in bisherigen Veröffentlichungen Zellkulturbedingungen wie der Nährstoffgehalt des Mediums, Konfluenz oder Subkonfluenz unzureichend Beachtung finden. Vor dem Hintergrund der komplexen biochemischen Prozesse innerhalb der Zelle sollte in einem zweiten Teil der Arbeit der Einfluss von Zellkulturbedingungen auf die Ergebnisse der Zellversuche vergleichend untersucht werden.

Im Einzelnen sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- Haben AGE-reiche Nahrungsmittel einen zeit- und/oder konzentrationsabhängigen Effekt auf die Aktivierung der Akt-, ERK1/2- und p38-Kinasen in WI-38-Fibroblasten?
- Unterscheidet sich die Kinasenaktivierbarkeit unter verschiedenen Zellkulturbedingungen (serumfreies vs. serumhaltiges Zellmedium, konfluentes vs. subkonfluentes Wachstum)?
- Haben AGE-reiche Nahrungsmittel einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die absolute Zellzahl?
- Gibt es Unterschiede in der Zellreaktion bezüglich der absoluten Zellzahl unter verschiedenen Zellkulturbedingungen (serumfreies vs. serumhaltiges Zellmedium, konfluentes vs. subkonfluentes Wachstum) bei Stimulation mit AGE-reichen Nahrungsmitteln?

### 3 Material und Methoden

Den Fragestellungen dieser Arbeit entsprechend wurden humane WI-38-Fibroblasten mit AGE-reichen Nahrungsmitteln (Kaffee- und Brotextrakt) inkubiert und deren intrazelluläre Kinasenaktivierung anhand von Westernblots ausgewertet. Dabei sollten zum einen Konzentrations- und Zeitreihen durchgeführt werden und zum anderen unterschiedliche Zellkulturbedingungen Berücksichtigung finden. Tabelle 1 zeigt die gewählten Bedingungen und die schematische Versuchsanordnung.

**Tabelle 1:** Schematischer Aufbau der Konzentrations- und Zeitreihen

|                                   | <b>Phospho-Akt</b> |      | <b>Phospho-ERK1/2</b> |      | <b>Phospho-p38</b> |      |
|-----------------------------------|--------------------|------|-----------------------|------|--------------------|------|
|                                   | - Zellüberleben? - |      | -Proliferation? -     |      | - Apoptose? -      |      |
| <b>nicht konfluent ohne Serum</b> | Kaffee             | Brot | Kaffee                | Brot | Kaffee             | Brot |
| <b>nicht konfluent mit Serum</b>  | Kaffee             | Brot | Kaffee                | Brot | Kaffee             | Brot |
| <b>konfluent ohne Serum</b>       | Kaffee             | Brot | Kaffee                | Brot | Kaffee             | Brot |
| <b>konfluent mit Serum</b>        | Kaffee             | Brot | Kaffee                | Brot | Kaffee             | Brot |

Zusätzlich sollten die Ergebnisse dieser Versuche mit der absoluten Zellzahl verglichen werden, um eine Aussage über den Einfluss der untersuchten Kinasen hinsichtlich eines proliferativen oder apoptotischen Verhaltens von WI-38-Zellen unter AGE-Einfluss zu erlangen.

### 3.1 Chemikalien

**Tabelle 2:** Verwendete Chemikalien (wenn nicht anders vermerkt, wurden stets Chemikalien mit dem höchsten Reinheitsgrad verwendet)

|  |  |   |
|--|--|---|
| 3-Mercaptopropionsäure   | $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$  | Bruno Bock, Hamburg, Deutschland          |
| Acrylamid-Bis Lsg 37,5:1,40 %  | $\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$  | Serva GmbH, Hamburg, Deutschland          |
| Albumin bovine Fraction V<br>(Protease, Peroxidase, Alkaline, Phosphatase-free, lyophilisiert) |  | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland    |
| Amido Black  | 4-Amino-5-hydroxy-3-[(4-nitrophenyl)azo]-6-(phenylazo)-2,7-Naphthalene disulfonysäure, disodium salt | Bio Rad, Hercules, Ca., USA               |
| APS  | Ammoniumsulfatase p.A. $[\text{NH}_4]_2\text{S}_2\text{O}_8$   | Biomol GmbH GmbH, Hamburg, Deutschland    |
| Benzonase-Reinheitsgrad II   |  | Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland       |
| beta-Mercaptoethanol   | $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$  | Fluka, Buchs, Schweiz                     |
| Bromphenolblau   | 3,3',5,5'-Tetrabromphenolsulfonphthalein   | Bio Rad, Hercules, Ca., USA               |
| CAPS p.A.  | 3-(Cyclohexylamino)-propylsulfonicacid<br>$[\text{C}_9\text{H}_{19}\text{NO}_3\text{S}]$             | Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland         |
| DMEM Zellmedium  | + 4500 mg/l Glucose<br>+ L-Glutamin<br>+ Pyruvat   | Gibco®, Auckland, Neuseeland              |
| DMSO   | Dimethyl Sulfoxid $[\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}]$  | Sigma®, St. Louis, Mo., USA               |
| Fetal Calf Serum (FCS) 10%   |  | Hyclone, Prebioscience, Bonn, Deutschland |
| Glycerin   | $\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_3$  | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland         |
| Luminol  | 5-Amino-2,3-Dihydro-1,4-Phthalazinedion  | Sigma®, St. Louis, Mo., USA               |

## Material und Methoden

|                                      |   |   |
|--------------------------------------|---|---|
| Magic Marker™                        |   | Invitrogen, Carlsbad, CA, USA             |
| Methanol                             | CH <sub>3</sub> OH  | Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland       |
| Natriumazid                          | NaN <sub>3</sub>  | Sigma®, St. Louis, Mo., USA               |
| Natriumchlorid                       | NaCl  | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland    |
| Natriumhydroxid                      | NaOH  | Sigma®, St. Louis, Mo., USA               |
| Nonidet P40                          |   | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland    |
| Page Ruler Prestained Protein Ladder |   | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland |
| p-Coumarsäure                        | [4-Hydroxycinnamic acid]  | Sigma®, St. Louis, Mo., USA               |
| Penicillin/Streptomycin              |   | Gibco®, Auckland, Neuseeland              |
| Salzsäure                            | HCl   | Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland       |
| SDS                                  | Dodecylsulfat Na-Salz<br>[C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> S.Na] | Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland       |
| TEMED                                | [N,N,N',N' - Tetramethylethylenediamine]                        | Sigma®, St. Louis, Mo., USA               |
| Vanadat                              | Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>                                 | Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland       |
| Wasserstoffperoxid                   | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                   | Sigma®, St. Louis, Mo., USA               |

### 3.2 Geräte

**Tabelle 3:** Verwendete Geräte

|                         |  |   |
|-------------------------|--|---|
| Bildanalyseprogramm     | AIDA Image Analyzer Vers. 3.51         | Raytest, Straubenhardt, Deutschland                       |
| Blotkammer              | Miniprotean                            | Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland           |
| Brutschrank             | Heracell 150                           | Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf, Deutschland         |
| Durchlichtmikroskop     | eclipse TS 100                         | Nikon, Tokio, Japan                                       |
| Elektropipette          | Pipet-Aid XP                           | Drummond, Broomall, Pa., USA                              |
| Geldokumentationsgerät  | LAS-3000 Fujifilm Intelligent Dark Box | Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland             |
| Feinwaage               | BL 1500 S                              | Sartorius AG, Göttingen, Deutschland                      |
| Feinwaage               | BP 301 S                               | Sartorius AG, Göttingen, Deutschland                      |
| Gelgiesskammer          |  | Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland           |
| Magnetrührer            | REO                                    | Ikamag®, Staufen, Deutschland                             |
| Nitrozellulosemembran   |  | Schleicher und Schüll, Deutschland                        |
| pH-Meter                | PH 537                                 | WTW GmbH, Weilheim, Deutschland                           |
| Pipette                 | pipet lite                             | Rainin, Oakland, Ca., USA                                 |
| Pipette                 | Eppendorf research                     | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland                        |
| Schüttler               | Ika KS 250 basic                       | Ikamag®, Staufen, Deutschland                             |
| Schüttler               | Polymax 1040                           | HeidolphKInstruments GmbH und Co.KG, Kelheim, Deutschland |
| Thermomixer             | Eppendorf comfort                      | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland                        |
| Ultraschallzerkleinerer | Bandelin Sonopuls                      | Bandelin, Berlin, Deutschland                             |

|                     |                   |                                     |
|---------------------|-------------------|-------------------------------------|
| Vortexer            | Genie-2           | Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland   |
| Zellkulturschale    |                   | TPP®, Trasadingen, Schweiz          |
| Zellkulturschrank   | Heraeus, Thermo   | Heraeus, Langenselbold, Deutschland |
| Zellzähler          | CASY cell Counter | Innovatis, Reutlingen Deutschland   |
| Zentrifuge          | Biofuge fresco    | Heraeus, Hanau                      |
| Zentrifugenröhrchen |                   | TPP®, Trasadingen, Schweiz          |

Es wurden außerdem Geräte der Standardlaborausrüstung verwendet.

### 3.3 Zellkultur

#### 3.3.1 Zelllinie

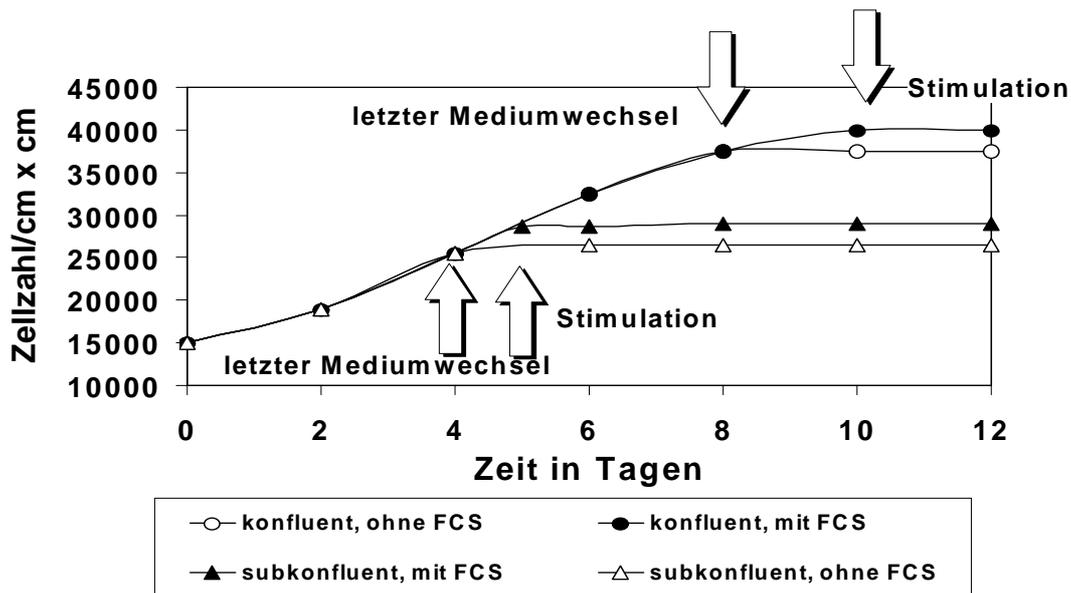
Für die vorliegenden Versuche wurden WI-38-Fibroblasten der 23.-30. Generation benutzt, so dass Zellalterung die Versuche nicht beeinflussen sollte.

#### 3.3.2 Zellzucht

Die WI-38-Fibroblasten wurden in Alliquots von 1 ml Volumen und einer darin vorliegenden Zellzahl von 1 Million Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Das hierzu benutzte Zellmedium bestand je zur Hälfte aus 20 % DMSO in Zellkulturmedium und FCS. Das Auftauen erfolgte schnell durch sofortiges Lagern der Zelltubes in einem 37 °C warmen Wasserbad. Unter kreisenden Handbewegungen wurde abgewartet, bis nur noch wenig Resteis zu sehen war. Danach wurden die Tubes mit Ethanol desinfiziert, die kalte Zellsuspension 1:10 mit Medium verdünnt und mit einer Pipette resuspendiert. Anschließend erfolgte bei 400 g ein Abzentrifugieren für 5 min. Das nun vorliegende Zellpellet wurde in 20 ml Zellmedium resuspendiert und auf 10 cm Durchmesser großen Kulturschalen ausgesät. Eine Kultivierung fand im Begasungsbrutschrank in einer 5 %-CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37 °C statt. In der ersten Woche wurde der Mediumwechsel täglich durchgeführt. Insgesamt konnten eine „viability“ von 80-90 % nachgewiesen werden. Nach erstmaligem Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen noch zweimal umgesetzt, bevor sie erstmalig für Versuche verwendet wurden. Zellzahlen und Viabilität der Zellen wurden mit Hilfe des CASY-Analysegerätes ermittelt.

### 3.3.3 Kultivierung der Fibroblasten auf 24-Well-Kulturschalen

Die eigentliche Kultivierung der WI-38 Zellen fand im Begasungsbrutschrank (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C) auf 24-Well-Kulturschalen statt. Die Aussaat erfolgte mit einer Dichte von 10 – 15.000 Zellen pro cm<sup>2</sup>. Alle 2 Tage wurde das Medium (DMEM mit Streptomycin (100 µg/ml) und Penicillin (100 U/ml)) gewechselt. Je nach Versuchsaufbau wurden die Zellen 48 h mit 10 % FCS oder ohne FCS beim letzten Mediumwechsel der Stimulation kultiviert (s. Abb. 3). Die Versuche wurden bei einer mikroskopisch festgestellten Zelldichte von 60-70 % (subkonfluent) bzw. 95-100 % (konfluent) durchgeführt.



**Abbildung 3:** Zellkultivierung bis zur Stimulation. Der letzte Mediumwechsel erfolgte 48 h bei den konfluenten Zellen und 24 h bei den subkonfluenten Zellen vor der Stimulation (*Zellzahl und Kultivierungsdauer sind rein hypothetisch*).

### 3.4 Stimulationsversuche von WI-38 mit Brotkruste und Kaffee auf 24-Well-Platten

Stammlösungen von Extrakten aus Brotkruste (Roggen/Weizen-Mischbrot) bzw. geröstetem Kaffee (*Coffea arabica*, Kolumbien, decaffeinert) wurden in Zellkulturmedium hergestellt. Die Herstellung des Brotkrustenextraktes orientierte sich dabei an einem Protokoll von Lindenmeier, *et al.* [83]. 1 ml Medium zum Lösen der Extrakte wurde vom Überstand der Versuchsplatten entnommen (s. Tab. 3.4). Nach einer 30-minütigen Erhitzung der Tubes auf 60 °C im Thermoblock unter dauerhafter Schüttlung wurden die Extrakte mittels Sonotrode des Ultraschallzerkleinerers bei einer Amplitude von 60 % für jeweils 3 min behandelt. Danach wurden die Extrakte bei 16.000 g für 5

min abzentrifugiert. Der Überstand wurde erneut für weitere 2 min bei 16.000 g abzentrifugiert. Der nun gewonnene Überstand wurde als Stammlösung A für die Stimmulationsversuche verwendet und entsprechend weiter verdünnt (s. Kap. 3.4.1).

### 3.4.1 Konzentrationsversuche

- **Stammlösung A:** 300 mg Extrakt/1 ml Medium
- **Stammlösung B:** 10 µl der Stammlösung A verdünnt mit 90 µl des von den 24-Well-Platten abgenommenen Mediums
- **Stammlösung C:** 10 µl der Stammlösung B verdünnt mit 90 µl des von den 24-Well-Platten abgenommenen Mediums

Vor den Stimmulationen wurden die Stammlösungen zur pH-Einstellung für 2 h im Brutschrank inkubiert. Auf den Wells befand sich jeweils 1 ml Zellmedium vor Versuchsbeginn. Für die Einstellung der Konzentrationen wurden von den Wells entsprechende Mengen Medium abpipettiert. Dieser Überschuss fand in der Herstellung der Stammlösungen und der Dilutionen (s. Tab. 4) Verwendung. Die Stimmulationen wurden mit folgenden Konzentrationen für 10 min durchgeführt:

**Tabelle 4:** Konzentrationseinstellungen Brot- und Kaffeeextrakt

|                       | <b>Abnahme vor Stimulation</b> | <b>Vorhandenes Medium vor Stimulation</b> | <b>Zugabe Menge der Stammlösung/FCS</b> | <b>Menge nach Stimulation</b> |
|-----------------------|--------------------------------|---|---|-------------------------------|
| <b>0 mg/ml</b>        | 0 ml                           | 1 ml                                      | 0 ml                                    | 1 ml                          |
| <b>30 mg/ml</b>       | 550,0 µl                       | 450,0 µl                                  | 50,0 µl A                               | 500 µl                        |
| <b>10 mg/ml</b>       | 516,6 µl                       | 483,4 µl                                  | 16,6 µl A                               | 500 µl                        |
| <b>3 mg/ml</b>        | 550,0 µl                       | 450,0 µl                                  | 50,0 µl B                               | 500 µl                        |
| <b>1 mg/ml</b>        | 516,6 µl                       | 483,4 µl                                  | 16,6 µl B                               | 500 µl                        |
| <b>0,3 mg/ml</b>      | 550,0 µl                       | 450,0 µl                                  | 50,0 µl C                               | 500 µl                        |
| <b>Serumkontrolle</b> | 550,0 µl                       | 450,0 µl                                  | 50,0 µl FCS                             | 500 µl                        |

Als Positivkontrolle diente eine Stimmulation mit 10 % Serum. Phosphatasen wurden durch Zugabe von 0,03 mM Vanadat direkt vor der Stimmulation im Versuchsansatz in der Aktivität reduziert, was aber selbst zu keiner Aktivierung von Kinasen im Versuch führte. Die gewertete Versuchsanzahl betrug n = 3.

### 3.4.2 Zeitkinetiken

In Analogie zu den Konzentrationsversuchen wurden die WI-38-Fibroblasten mit festen Konzentrationen für unterschiedliche Zeiten stimuliert, um eine Zeitkinetik der Kinasenaktivierung zu erstellen. Für die Stimulationen mit Kaffeeextrakt wurde eine Konzentration von 1 mg/ml und für die Versuche mit Brotkrustenextrakt wurden 10 mg/ml verwendet (s. Tab. 4). Stimuliert wurden die Zellen jeweils für 2,5, 5, 10, 30 und 60 min. Die Nullprobe wurde wie bei den Konzentrationsreihen ohne Manipulation belassen, während für die Positivkontrolle mit 10 % Serum stimuliert wurde.

Die Anzahl der gewerteten Versuche betrug ebenfalls  $n = 3$ .

### 3.4.3 Zellzählungen

Die Versuche erfolgten - wie in Kapitel 3.3 beschrieben – in 24-Well-Platten, wobei das Medium unter subkonfluenten Bedingungen hier letztmalig 24 h vor der Stimulation gewechselt wurde. Eine Stimulation wurde mit Kaffee- und Brotkrustenextrakt in Analogie zu den Konzentrationsversuchen (s. Kap. 3.4.1) für 12 h im Brutschrank durchgeführt. Anschließend wurde das Medium von den Zellen abpipettiert und die Wells zweimalig mit PBS gespült. Das Ablösen der Zellen wurde mithilfe einer Trypsin (5 ml 5 % Trypsin auf 45 ml 1x PBS)-EDTA-Lösung durchgeführt. Mithilfe des CASY Zellzählers fand anschließend die Bestimmung der absoluten Zellzahl statt. Hierzu wurde eine Versuchsanzahl von  $n = 6$  durchgeführt.

## 3.5 Herstellung der verwendeten Lösungen

### 3.5.1 Pufferlösungen

**Tabelle 5:** Verwendete Pufferlösungen

| <b>Lower Buffer (500 ml)</b>                     | <b>Upper Buffer (500 ml)</b>                 |
|--|--|
| 91,0 g Tris                                      | 30,5 g Tris                                  |
| 20,0 ml 10 % SDS                                 | 20,0 ml 10 % SDS                             |
| pH-Wert Einstellung auf 8,8                      | pH-Wert Einstellung auf 6,7                  |
| <b>Lysepuffer für Western-Blot-Lysate (2 ml)</b> | <b>Laufpuffer 10x für Western-Blot (1 l)</b> |
| 1860,0 µl Tris/ HCl (50 mM) mit SDS (2 %)        | 30,0 g Tris                                  |
| 40,0 µl Mercaptoethanol (2 %)                    | 144,0 g Glycin                               |
| 20,0 µl Na <sub>3</sub> VO (1 mM)                | 15,0 g SDS                                   |
| 80,0 µl Proteaseinhibitormix                     | pH-Wert-Einstellung auf 8,6                  |
| 20,0 µl Okadainsäure (50 µM)                     |  |
| pH-Wert-Einstellung auf 6,7                      |  |

| <b>Blotpuffer (1 l)</b>        | <b>Trispuffer (1 l, 500 mM)</b> |
|--------------------------------|---------------------------------|
| 11,1 g CAPS                    | 6,06 g Tris                     |
| 87,0 µl 3-Mercaptopropionsäure | 29,23 g NaCl                    |
| pH-Wert-Einstellung auf 10,0   | 2,00 ml NP40 (Triton-X100)      |
|                                | pH-Wert-Einstellung auf 7,5     |

Wenn nicht anders angegeben, wurde mit destilliertem Wasser auf die angegebenen Volumina aufgefüllt.

### 3.5.2 Benzonase (Merck KG aA: # 1.01653.0001)

Mit Aqua dest wurde eine 6 %-Lösung hergestellt. Im Folgenden sind einige Beispiele für die Erzeugung verschiedener Mengen aufgeführt:

- 150 µl: 09 µl + 141 µl H<sub>2</sub>O
- 250 µl: 15 µl + 235 µl H<sub>2</sub>O
- 500 µl: 30 µl + 470 µl H<sub>2</sub>O

### 3.5.3 Bromphenolblau-Färbelösung

Es wurden einige Körner Bromphenolblau in 50 %-Glycerinlösung gegeben (Glycerin und Aqua Dest im Verhältnis 1:1).

### 3.5.4 10x PBS für Zellzucht

Für 1 l wurden verwendet:

- 80 g NaCl
- 2 g KCl
- 11,49 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (wasserfrei)
- 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Die pH-Wert-Einstellung wurde auf 7,4 durchgeführt. Anschließend wurden für die Zellzucht der 10x PBS auf 1x PBS mit Aqua dest verdünnt und autoklaviert.

## 3.6 Western-Blot

Die in dieser Arbeit analysierten Kinasen wurden mittels Western-Blot-Technik untersucht.

### 3.6.1 Herstellung der Western-Blot-Lysate (für 24-Well-Platten)

Zunächst wurde das Medium der Fibroblasten abgesaugt. Pro Well wurden 50 µl Lysepuffer (s. Tab. 5) auf die Zellen gegeben und unter gleichmäßigem Schütteln 10 min lang lysiert. Zum Nucleinsäure-Verdau wurden 10 µl Benzonaselösung (6 %) pro Well zugegeben und erneut für 10 min auf dem Schüttler inkubiert. Die Anfärbung der Lysate erfolgte anschließend mit 7 µl Bromphenolblaulösung pro Well.

Zur thermischen Denaturierung der Proteinstrukturen erfolgte eine Erhitzung der Zellysate bei 60 °C für weitere 10 min auf dem Schüttler. Die nun fertigen Lysate wurden auf Eis abgekühlt. Eine Lagerung der Proben fand bei minus 80 °C statt.

### 3.6.2 Herstellung der Western-Blot-Gele

Für die in dieser Arbeit analysierten Kinasen wurden - wie in Tabelle 6 dargestellt - 10 % Trenngele (SDS-Gele) und zur Konzentration 3 % SDS-Gele verwendet.

Es wurden Gele der Stärke 1,5 mm mit 15 Slots hergestellt und nach der Polymerisation zum Beladen mit Proteinproben in die mit 1-fachem Laufpuffer gefüllten Laufkammern eingesetzt.

**Tabelle 6:** Western-Blot-Gele

| <b>Konzentrationsgel 3 % (Angaben für 2 Gele)</b> |             | <b>Trenngel 10 % (Angaben für 2 Gele)</b> |              |
|---|-------------|---|--------------|
| H <sub>2</sub> O                                  | 3,385 ml    | H <sub>2</sub> O                          | 4,950 ml     |
| 40 % Acrylamid plus                               | 0,375 ml    | 40 % Acrylamid plus                       | 3,750 ml     |
| 0,8 % Bis   |             | 0,8 % Bis                                 |              |
| Upper Buffer                                      | 1,250 ml    | Lower Buffer                              | 3,800 ml     |
| TEMED   | 6,000 µl    | Glycerin (90 %)                           | 2,500 ml     |
| APS 40 %  | 12,000 µl   | TEMED                                     | 12,000 µl    |
|   |             | APS 40 %                                  | 18,000 µl    |
| <b>Total</b>                                      | <b>5 ml</b> | <b>Total</b>                              | <b>15 ml</b> |

### 3.6.3 Proteinanalyse mittels Western-Blot

Pro Slot wurde 12 µl Lysatmenge benutzt. Als Beladungskontrolle und zur Erkennung der Proteinbandengrößen dienten Page Ruler® und Magic Marker™® (3- 4 µl/Slot).

Die Elektrophorese erfolgte bei einer angelegten Spannung von 200 V zum Konzentrieren und 150 V zum Trennen der Proteine in 1x Laufpuffer. Für den Semidryblot wurden pro Nitrozellulosemembran 4 in Blotpuffer (180 ml 50 mM CAPS Puffer plus 20 ml Methanol, pH 10)

eingeweichte Blotpapiere benutzt, zwischen denen die glattgestrichene Nitrozellulosemembran (z.B. mit dem Griff einer Glaspipette vorsichtig glattgestrichen) gelegt wurde. Das Blotten erfolgte anschließend für 45 min bei einer angelegten Stromstärke und -spannung von 0,08 A und 25 V/cm<sup>2</sup> Blotfläche.

Die Membranen wurden anschließend ca. 3 min in Amido-Black-Lösung gefärbt und danach mit Aqua-Dest abgespült, bis Proteinbanden sichtbar waren, um ein gleichmäßiges Blotten zu bestätigen. Pro Membran fand danach eine Blockierung mit 5 ml 2 %-Blockierlösung (20 ml 500 mM Trispuffer plus 0,4 g BSA, pH 7,5) für 1 h bei Raumtemperatur oder 12 h bei 4 °C statt.

Nach dem Abgießen der Blockierlösung erfolgte eine primäre Antikörperinkubation (in 10 ml 50 mM Trispuffer plus 0,2 g BSA plus 100 µl NaN<sub>3</sub>, pH 7,5) über Nacht bei 4 °C. Eine Waschlösung (1,2 g bovines Albumin [BSA] in 240 ml 500 mM Trispuffer plus NP-40, pH 7,5) wurde danach in sechs Waschschrritten von je 6 min angewendet.

Der Sekundärantikörper band für 1 h an den Proteinen, anschließend wurden wieder sechs Waschschrritte mit der Waschlösung durchgeführt.

### 3.7 Verwendete Antikörper

#### 3.7.1 Primärer Antikörper

Für die Herstellung von 10 ml primären Antikörper (Tab. 7) wurden benötigt: 0,2 g BSA gelöst in 50 mM Tris-Puffer/150 mM NaCl (pH 7,5; 0,2 % Nonidet P40; 0,03 % NaN<sub>3</sub>). Die so hergestellte Primärantikörperlösung ist bei Lagerung im Kühlschrank (4 °C) mehrfach verwendbar. Die primären Antikörper wurden mit Ausnahme von GAPDH von Cell Signaling®, Danvers, MA, USA bezogen. Anti-GAPDH benutzten wir von der Firma Abcam®, Cambridge, UK.

**Tabelle 7:** Primärantikörper

| Antikörper          | Größe      | Spezies | Verdünnung |
|---------------------|------------|---------|------------|
| Anti-Phospho-Akt    | ca. 60 kDA | Rabbit  | 1: 1000    |
| Anti-Phospho-ERK1/2 | 42/44 kDA  | Rabbit  | 1: 1000    |
| Anti-Phospho-p38    | 38 kDA     | Rabbit  | 1: 300     |
| Anti-GAPDH          | 30-40 kDA  | Rabbit  | 1: 2000    |

### 3.7.2 Sekundärer Antikörper

Als sekundärer Antikörper wurde Anti-Rabbit von DIANOVA® eingesetzt (Peroxidase konjugiert, 1:1000 verdünnt in 10 ml 2 %-BSA-Tris-Lösung).

### 3.7.3 Antikörperdetektion

Die Membranen wurden 2 min lang mit 10 ml Detektionslösung, einer 1:1 Mischung bestehend aus Luminollösung (500 µl Luminol plus 220 µl Cumarsäure, auf 50 ml mit 0,1 mM Trispuffer, pH 8,5 aufgefüllt) und Wasserstoffperoxyd (0,05 % = 5 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf 10 ml 0,1 mM Trispuffer, pH 8,5 ), inkubiert. Anschließend wurde die Lichtreaktion mit Hilfe einer Digitalkamera (LAS-3000 Fujifilm ® Intelligent Dark Box) aufgenommen.

### 3.8 Datenauswertung und Statistik

Die aus den Western-Blots gewonnenen digitalisierten Daten wurden mit der Bildanalysensoftware AIDA hinsichtlich der gemessenen Absorptionen (Schwärzungen) der Bandenmuster ausgewertet. Diese wiederum sind als Maß der Kinasenaktivierung zu interpretieren. Computergestützt erfolgte eine Subtraktion des Bildhintergrundes. Die Rohdaten zur Aktivierung (Phosphorylierung) von Akt, ERK1, ERK2 und p38 wurden durch Quotientenbildung mit GAPDH als Beladungskontrolle abgeglichen. Die Aktivierung der GAPDH variierte unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht wesentlich, so dass das Enzym als Beladungskontrolle verwendet werden konnte. Die gemessenen Nullwerte (unstimulierte Negativkontrollen) wurden zur Berechnung gleich 100 % gesetzt, so dass die erhobenen Daten der Kinasenaktivierung eine prozentuale Steigerung oder Hemmung in Bezug auf den Nullwert darstellen.

Die statistische Analyse der erhobenen Werte wurde mittels Excel (Microsoft®, Redmond, WA, USA) durchgeführt. Dabei werden die Daten mithilfe von Mittelwert und dem Standardfehler des Mittelwerts beschrieben. Die statistische Auswertung der interessierenden Konzentrationsunterschiede erfolgte mittels Student's T-Tests für unverbundene Stichproben. Entsprechend der Fragestellungen wurden so die Kinasenaktivierungen der einzelnen Experimentalbedingungen mit der Kinasenaktivierung der unstimulierten Kontrolle verglichen. Hierbei gilt nach gängiger Konvention die Unterschreitung eines Signifikanzniveaus von 5 % ( $p < 0,05$  (\*)) als signifikanter Unterschied, die eines Signifikanzniveaus von 1 % ( $p < 0,01$  (\*\*)) als hochsignifikanter Unterschied.

### 4 Ergebnisse

Um den Einfluss verschiedener AGE-reicher Nahrungsmittelextrakte hinsichtlich der Kinasenaktivierung und deren Einfluss auf das Zellüberleben unter verschiedenen Zellkulturbedingungen zu untersuchen, wurden WI-38-Fibroblasten mit Kaffee- und Brotkrustenextrakt inkubiert. Eine Konzentrationsreihe und eine Zeitkinetik wurden durchgeführt. Es fanden Messungen im subkonfluenten (70 % Konfluenz) und konfluenten Zustand mit und ohne Serumzugabe (FCS) statt.

#### 4.1 Konzentrationsabhängige Kinaseninduktion durch Kaffee- und Brotextrakt in WI-38

Im Folgenden werden zunächst die Versuchsergebnisse der Konzentrationsreihen dargestellt. Hierzu wurden die WI-38-Fibroblasten für 10 min mit 0,3-30 mg/ml Brotkruste- und Kaffeeextrakt stimuliert. 48 h (konfluent) bzw. 24 h (subkonfluent) vor Beginn der Experimente wurde der letzte Mediumwechsel mit oder ohne 10 % FCS durchgeführt.

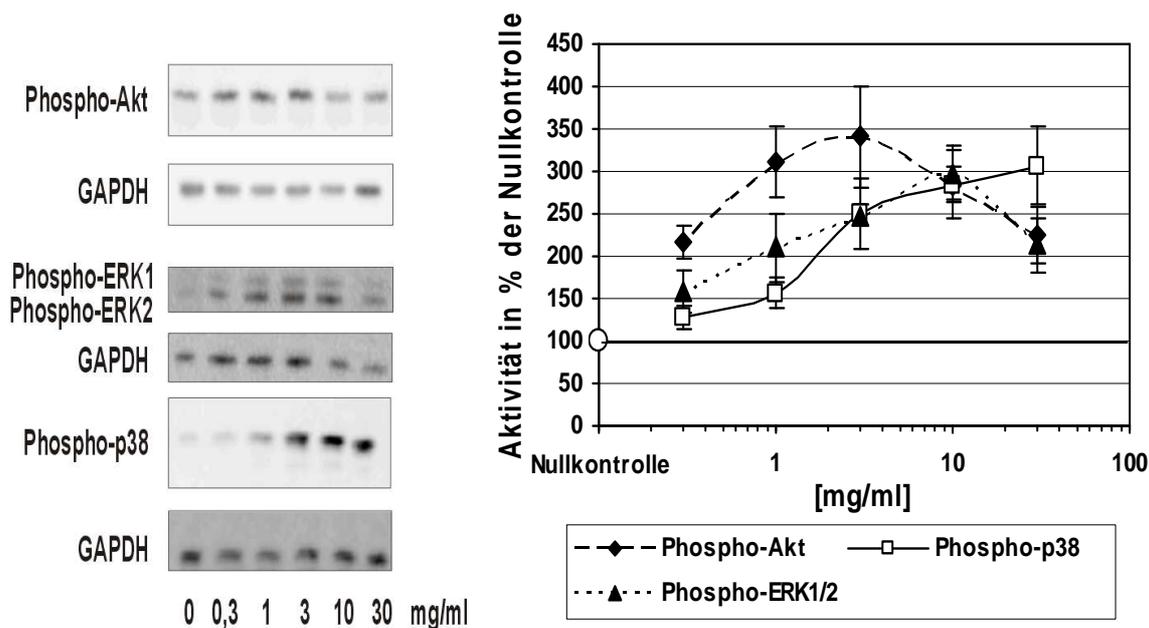
Die Aktivierung von Kinasen wurde über phosphorilierungs-/ aktivierungsspezifische Antikörper mittels Western-Blot analysiert. Teilabbildung a gibt jeweils einen repräsentativen Western-Blot und Teilabbildung b die gemessenen Aktivierungskurven wieder.

##### 4.1.1 Kinasenaktivierung durch Brotextrakt (subkonfluent, ohne FCS)

Brotextrakt (s. Abb. 4a und 4b) führt ab einer Konzentration von 0,3 mg/ml zum signifikanten Anstieg der Phospho-Akt um den Faktor  $2,17 \pm 0,19$  ( $p < 0,05$ ). Bei 3 mg/ml zeigt sich eine auf das 3,41-fache ( $\pm 0,6$ ) der Kontrolle gesteigerte Aktivierung, die aber bei höheren Konzentrationen wieder abfällt.

Bei der MAP-Kinase ERK ist ein vergleichbarer Kurvenverlauf zu erkennen. So kommt es zu einer signifikanten Steigerung von Phospho-ERK bis zu einem Maximum bei 10 mg/ml um den Faktor  $2,98 \pm 0,31$  ( $p < 0,05$ ), um bei höheren Konzentrationen wieder abzufallen.

Der Nachweis der Phospho-p38 zeigt dagegen einen stetig steigenden Kurvenverlauf, so dass auch in höheren Konzentrationen eine Aktivierungszunahme der p38 zu verzeichnen ist. Signifikante Aktivierungsraten ( $p < 0,05$ ) sind bei Konzentrationen von 10 mg/ml um den Faktor  $2,85 \pm 0,40$  und bei 30 mg/ml um den Faktor  $3,07 \pm 0,46$  zu verzeichnen.



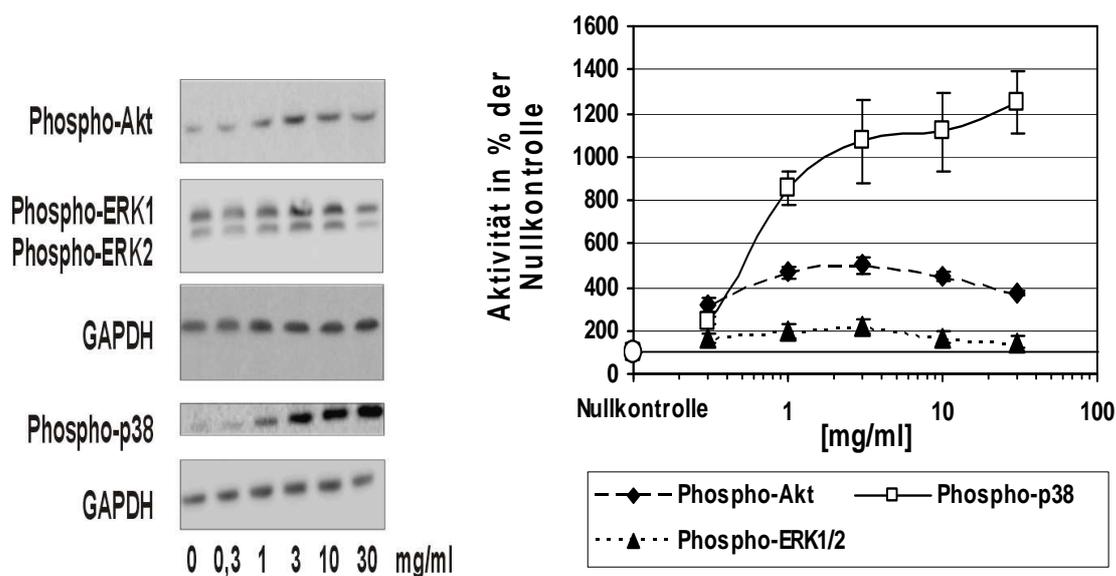
**Abbildungen 4a und 4b:** Konzentrationsabhängige Kinasenaktivierung nicht konfluenter Fibroblasten bei Stimulation mit Brotextrakt in Medium ohne Serum (Mittelwerte +/- mittlerer Fehler des Mittelwertes, Versuchszahl n = 3)

#### 4.1.2 Kinasenaktivierung durch Kaffeeextrakt (subkonfluent, ohne FCS)

Auch bei den äquivalenten Versuchen mit geröstetem Kaffee zeigt sich, wie in den Abbildungen 5a und 5b dargestellt, eine Abhängigkeit der Aktivierung/Phosphorylierung der untersuchten Kinasen von der Konzentration des Extraktes.

Die Kinasenaktivierung steigt bei Akt und ERK1/2 mit zunehmenden Konzentrationen an und hat bei beiden ihr Maximum bei 3 mg/ml (Phospho-Akt: Faktor  $5,02 \pm 0,37$  ( $p < 0,01$ ) und Phospho-ERK1/2: Faktor  $2,2 \pm 0,38$ ). Die aktivierte Akt-Kinase weist bereits bei niedriger Konzentration von 0,3 mg/ml eine 3,15-fache ( $\pm 0,32$ ) Steigerung ihrer Aktivierung auf, die signifikant ist ( $p < 0,05$ ).

Eine signifikante, um das 2,46-Fache ( $\pm 0,19$ ) gesteigerte Phosphorylierung der p38-Stresskinase ( $p < 0,05$ ) kann ebenfalls bereits bei Konzentrationen ab 0,3 mg/ml nachgewiesen werden. Ein maximales Kurvenniveau mit einer 12,52-fachen ( $\pm 1,41$ ) Steigerung wird schließlich bei 30 mg/ml erreicht (s. Übersicht Tab. 8). Gerade bei dieser Kinase sieht man einen großen Unterschied der maximalen Phosphorylierung um ca. den Faktor 4 zwischen beiden verwendeten Extrakten.



**Abbildungen 5a und 5b:** Konzentrationsabhängige Kinasenaktivierung nicht konfluenter Fibroblasten bei Stimulation mit Kaffeeextrakt in Medium ohne Serum (Mittelwerte +/- mittlerer Fehler des Mittelwertes, Versuchszahl n = 3)

**Tabelle 8:** Phosphorylierung von Kinasen nach Stimulation nicht konfluenter Fibroblasten mit Nahrungsextrakten (Angaben in Prozent der Nullkontrolle, Mittelwerte +/- mittlerer Fehler des Mittelwertes, letzter Mediumwechsel 24 h vor Versuchsbeginn, Medium ohne Serum)

|                       |               | 0 mg/ml | 0,3 mg/ml | 1 mg/ml  | 3 mg/ml  | 10 mg/ml | 30 mg/ml |
|-----------------------|---------------|---------|-----------|----------|----------|----------|----------|
| <b>Phospho-Akt</b>    | <b>Brot</b>   | 100     | 217,62*   | 312,26*  | 340,87*  | 283,78*  | 225,20   |
|                       |               |         | ±19,05    | ±41,77   | ±60,03   | ±20,60   | ±33,80   |
| <b>Phospho-Akt</b>    | <b>Kaffee</b> | 100     | 315,25*   | 468,50** | 502,15** | 451,62** | 375,42*  |
|                       |               |         | ±31,90    | ±27,04   | ±37,00   | ±21,13   | ±10,96   |
| <b>Phospho-ERK1/2</b> | <b>Brot</b>   | 100     | 159,40    | 209,85   | 248,24** | 297,71*  | 212,90   |
|                       |               |         | ±24,77    | ±40,03   | ±13,03   | ±31,51   | ±31,11   |
| <b>Phospho-ERK1/2</b> | <b>Kaffee</b> | 100     | 161,94    | 199,19   | 219,18   | 168,12   | 147,67   |
|                       |               |         | ±24,26    | ±31,83   | ±37,99   | ±24,40   | ±29,31   |
| <b>Phospho-p38</b>    | <b>Brot</b>   | 100     | 128,07    | 156,12   | 250,01   | 284,52*  | 306,92*  |
|                       |               |         | ±14,69    | ±18,39   | ±42,80   | ±39,52   | ±46,36   |
| <b>Phospho-p38</b>    | <b>Kaffee</b> | 100     | 245,54*   | 855,96*  | 1070,26* | 1112,72* | 1252,17* |
|                       |               |         | ±19,00    | ±80,67   | ±190,92  | ±179,43  | ±141,29  |

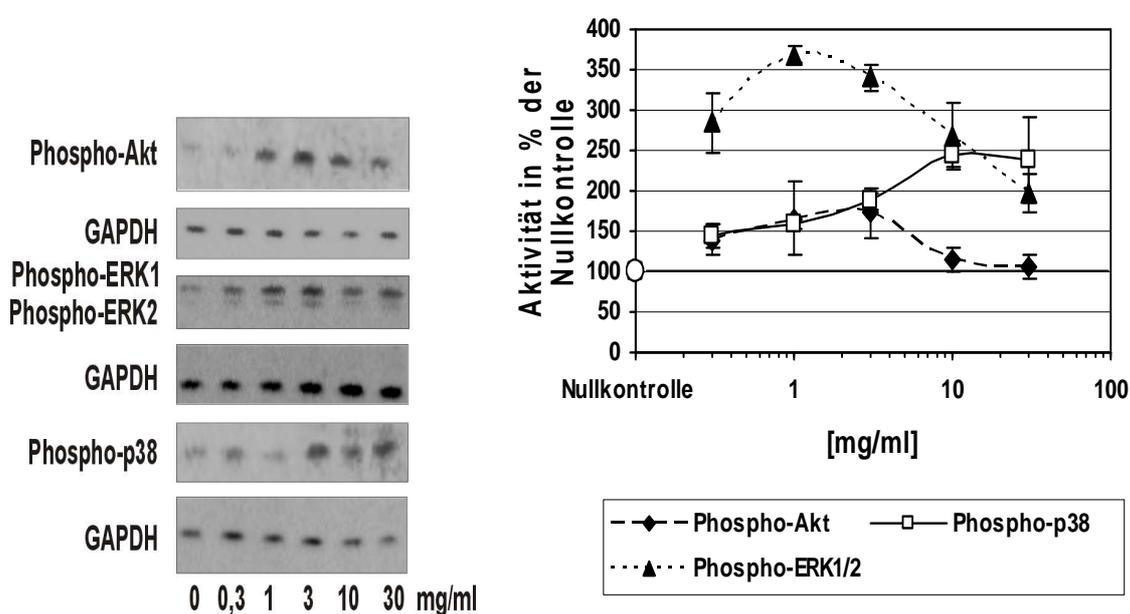
Signifikanzkennzeichnung: \* = p < 0,05 versus Kontrolle, \*\* = p < 0,01 versus Kontrolle.

Versuchszahl: n = 3

#### 4.1.3 Kinasenaktivierung durch Brotextrakt (subkonfluent, mit FCS)

Die Untersuchungen zur Phosphorylierung der Akt-Kinase und der ERK1/2 zeigen Optimumsverhalten. Bis zu einer bestimmten Konzentration erhöhte sich die Phosphorylierung der Kinasen (auf das 1,7-fache bei 3 mg/ml bei der Akt-Kinase bzw. auf das 3,69-fache bei 1 mg/ml bei der ERK1/2), um danach wieder deutlich zu fallen.

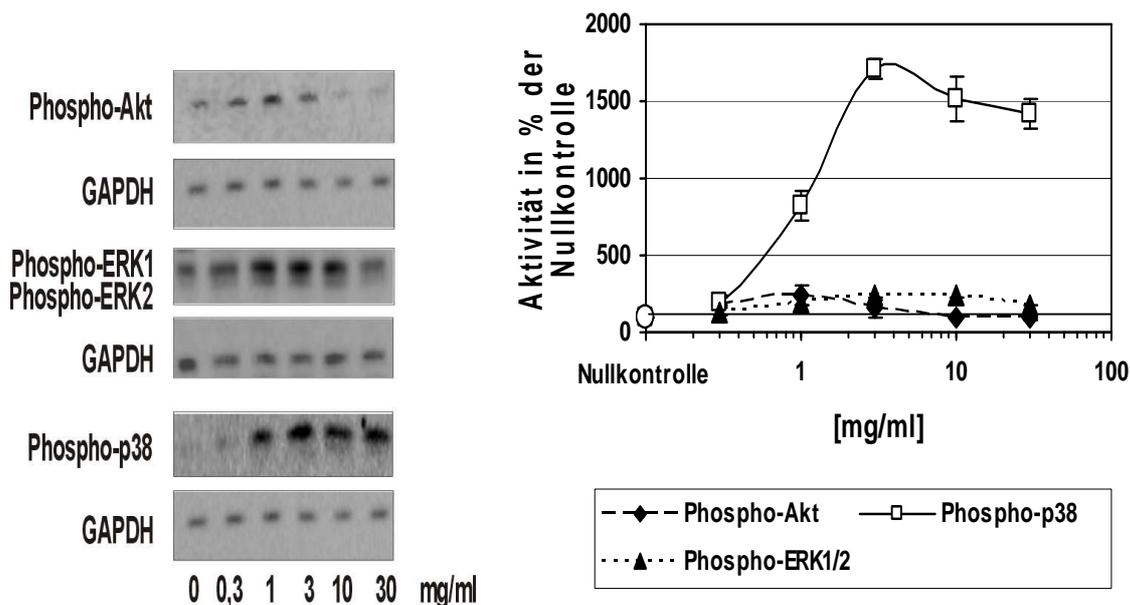
Dagegen verhält sich der Kurvenverlauf bei der p38-Kinase anders. Hier wird ein Maximum der Phosphorylierung bei 10 mg/ml (245,35 %  $\pm$  17,74) erreicht, das sich nicht weiter ändert (s. Abb. 6a und 6b).



**Abbildungen 6a und 6b:** Konzentrationsabhängige Kinasenaktivierung nicht konfluenten Fibroblasten bei Stimulation mit Brotextrakt in Medium mit Serum (Mittelwerte  $\pm$  mittlerer Fehler des Mittelwertes, Versuchszahl  $n = 3$ )

#### 4.1.4 Kinasenaktivierung durch Kaffeeextrakt (subkonfluent, mit FCS)

Auch beim Kaffeeextrakt findet man ein ähnliches Verhalten wie beim Brotextrakt. Die Phosphorylierung der Akt bzw. ERK-Kinasen haben ein Optimumsverhalten, während das bei der p38 so nicht zu sehen ist. Man erreicht bei der Akt ein Maximum bei 1 mg/ml (2,42-fach  $\pm$  0,59) und bei der ERK1/2 bei 3 mg/ml (240,99 %  $\pm$  19,9). In beiden Fällen sind die Phosphorylierungen signifikant ( $p < 0,05$ ).



**Abbildungen 7a und 7b:** Konzentrationsabhängige Kinasenaktivierung nicht konfluenter Fibroblasten bei Stimulation mit Kaffeeextrakt in Medium mit Serum (Mittelwerte +/- mittlerer Fehler des Mittelwertes, Versuchszahl n = 3)

**Tabelle 9:** Phosphorylierung von Kinasen nach Stimulation nicht konfluenter Fibroblasten mit Nahrungsextrakten (Angegeben in Prozent der Nullkontrolle, Mittelwerte +/- mittlerer Fehler des Mittelwertes, letzter Mediumwechsel 24 h vor Versuchsbeginn, Medium mit Serum)

|                       |               | 0 mg/ml | 0,3 mg/ml         | 1 mg/ml            | 3 mg/ml              | 10 mg/ml            | 30 mg/ml             |
|-----------------------|---------------|---------|-------------------|--------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| <b>Phospho-Akt</b>    | <b>Brot</b>   | 100     | 139,51<br>±10,38  | 165,79<br>±26,41   | 172,27<br>±18,42     | 115,07<br>± 7,88    | 106,47<br>± 8,06     |
|                       | <b>Kaffee</b> | 100     | 177,45<br>±56,58  | 242,10<br>±59,42   | 160,77<br>±56,40     | 104,21<br>±10,45    | 98,05<br>±22,87      |
| <b>Phospho-ERK1/2</b> | <b>Brot</b>   | 100     | 283,91*<br>±21,75 | 368,52**<br>± 5,90 | 340,24**<br>± 9,82   | 268,63*<br>±23,10   | 196,12*<br>±13,48    |
|                       | <b>Kaffee</b> | 100     | 135,29<br>±15,42  | 194,10*<br>±13,92  | 240,99*<br>±19,91    | 240,84*<br>±18,49   | 180,28<br>± 3,93     |
| <b>Phospho-p38</b>    | <b>Brot</b>   | 100     | 145,07<br>±14,93  | 160,10*<br>± 7,56  | 187,27*<br>±10,23    | 245,35*<br>±17,74   | 239,47<br>±52,83     |
|                       | <b>Kaffee</b> | 100     | 190,30<br>±30,21  | 825,68*<br>±99,34  | 1709,77**<br>± 56,54 | 1518,52*<br>±148,46 | 1425,34**<br>± 97,75 |

Signifikanzkennzeichnung: \* = p < 0,05 versus Kontrolle, \*\* = p < 0,01 versus Kontrolle.

Versuchszahl: n = 3

Die Phosphorylierung der p38 wird bereits bei 1 mg/ml (Faktor  $8,26 \pm 0,99$ ) signifikant ( $p < 0,05$ ). Das Maximum ( $p < 0,01$ ) wird mit 3 mg/ml erreicht und bleibt in etwa auf diesem Niveau (s. Abb. 7a und 7b sowie Darstellung der Versuchswerte in Tab. 9).

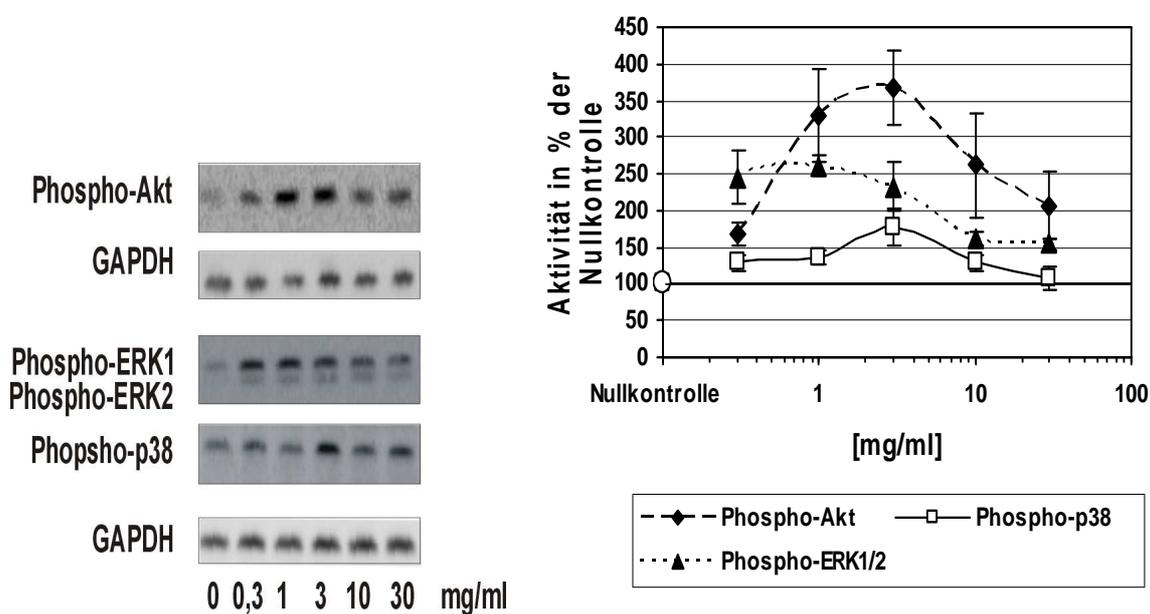
#### 4.1.5 Kinasenaktivierung durch Brotextrakt (konfluent, ohne FCS)

Für diese Zellkulturbedingung sind die WI-38 Zellen mit 10 % Serum bis zur Konfluenz gewachsen. Danach wurde das Serum für 48 h entzogen und die Zellen anschließend für 10 min stimuliert. Wie in den Abbildungen 8a und 8b dargestellt, sind die Verläufe der Aktivierungskurven der untersuchten Kinasen nach Stimulation mit Brotkrustenextrakt sehr ähnlich und zeigen bei Phospho-Akt und Phospho-p38 ein deutliches Optimumsverhalten.

Phospho-Akt und Phospho-p38 haben jeweils ein Maximum bei 3 mg/ml und Phospho-ERK1/2 bei 1 mg/ml.

Die Phospho-Akt steigt maximal auf das 3,68-Fache ( $\pm 0,52$ ) des Nullwertes an ( $p < 0,05$ ).

Phospho-ERK1/2 erreicht bei 1 mg/ml Signifikanzniveau ( $p < 0,05$ ) und erlangt hier mit einer 2,61-fachen ( $\pm 0,16$ ) Signalsteigerung ihr Maximum.



**Abbildungen 8a und 8b:** Konzentrationsabhängige Kinasenaktivierung konfluenten Fibroblasten bei Stimulation mit Brotextrakt in Medium ohne Serum (Mittelwerte  $\pm$  mittlerer Fehler des Mittelwertes, Versuchszahl  $n = 3$ )

Ähnlich den anderen Kinasenverläufen, jedoch nicht signifikant, hat die Phospho-p38 einen Höhepunkt bei 3 mg/ml mit dem 1,77-Fachen ( $\pm 0,25$ ) des Vergleichswertes von 0 mg/ml. Mit einer

mittleren Restaktivierung von 107,35 % ( $\pm 15,9$ ) bei einer Stimulation mit 30 mg/ml Brotkruste erreicht die Phospho-p38 fast wieder Ausgangsniveau.

#### 4.1.6 Kinasenaktivierung durch Kaffeeextrakt (konfluent, ohne FCS)

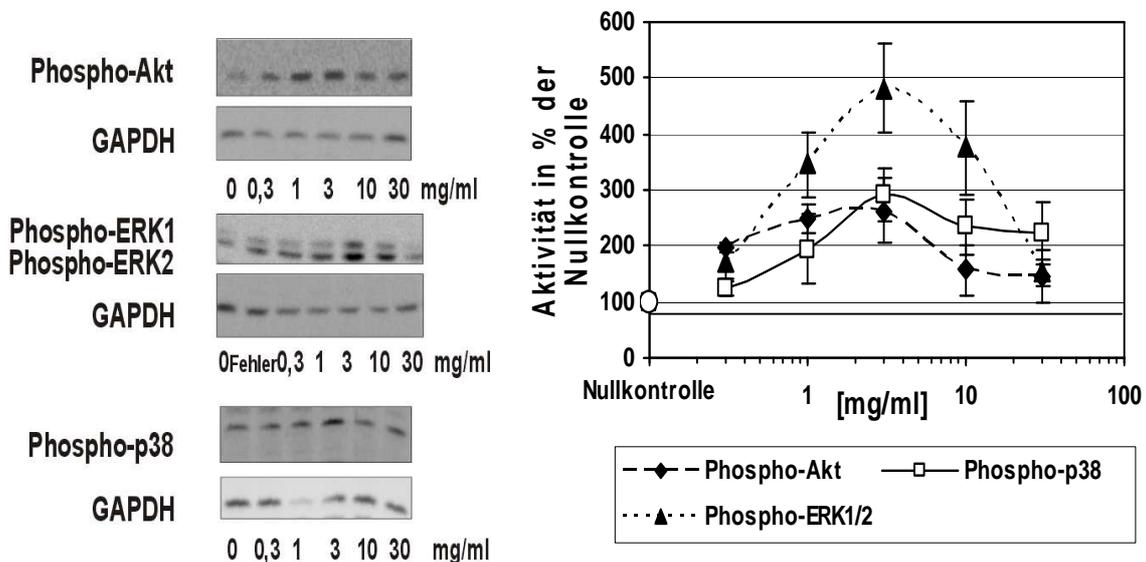
Analog zu 4.1.5 wurden mit Kaffeeextrakt Zellstimulationen durchgeführt (s. Abb. 9a und 9b).

Die Aktivierung der Phospho-Akt, Phospho-Erk1/2 und der Phospho-p38 weisen ein Optimumsverhalten mit einem Maximum bei 3 mg/ml auf.

Das Maximum der Akt-Kinasenaktivierung weist eine Phosphorylierungszunahme auf das 2,62-Fache ( $\pm 0,57$ ) des Nullwertes auf.

Die Phospho-ERK1/2 hingegen weist einen signifikanten Anstieg ( $p < 0,05$ ) auf das 4,81-Fache ( $\pm 0,79$ ) des Ausgangswertes auf. In beiden Fällen sinkt die Kinasenaktivierung mit zunehmender Kaffeekonzentration wieder ab.

Phospho-p38 hat eine maximal 2,9-fache ( $\pm 0,47$ ) Phosphorylierungszunahme im Vergleich zum Nullwert. Nach Erreichen des Maximums fällt der Kurvenverlauf verglichen mit den anderen Kinasen langsamer ab (s. Tab. 10).



**Abbildungen 9a und 9b:** Konzentrationsabhängige Kinasenaktivierung konfluenten Fibroblasten bei Stimulation mit Kaffeeextrakt in Medium ohne Serum (Mittelwerte  $\pm$  mittlerer Fehler des Mittelwertes, Versuchszahl  $n = 3$ )

**Tabelle 10:** Phosphorylierung von Kinasen nach Stimulation konfluenten Fibroblasten mit Nahrungsextrakten (Angegeben in Prozent der Nullkontrolle, Mittelwerte +/- mittlerer Fehler des Mittelwertes, letzter Mediumwechsel 48 h vor Versuchsbeginn, Medium ohne Serum)

|                       |               | 0 mg/ml | 0,3 mg/ml          | 1 mg/ml           | 3 mg/ml           | 10 mg/ml         | 30 mg/ml         |
|-----------------------|---------------|---------|--------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|
| <b>Phospho-Akt</b>    | <b>Brot</b>   | 100     | 166,56<br>±15,92   | 329,86<br>±63,24  | 367,92*<br>±51,88 | 262,29<br>±71,70 | 207,51<br>±46,42 |
|                       | <b>Kaffee</b> | 100     | 198,47**<br>± 7,87 | 249,30*<br>±25,37 | 262,39<br>±57,36  | 156,44<br>±44,28 | 145,48<br>±45,71 |
| <b>Phospho-ERK1/2</b> | <b>Brot</b>   | 100     | 244,39<br>±36,51   | 261,37*<br>±15,75 | 232,40<br>±33,90  | 162,35*<br>±9,56 | 154,16*<br>±7,21 |
|                       | <b>Kaffee</b> | 100     | 170,25<br>±27,75   | 346,31<br>±58,66  | 481,02*<br>±79,20 | 376,72<br>±83,94 | 153,30<br>±24,16 |
| <b>Phospho-p38</b>    | <b>Brot</b>   | 100     | 128,85<br>±10,34   | 135,90<br>± 9,92  | 176,60<br>±24,67  | 128,43<br>± 9,85 | 107,35<br>±15,91 |
|                       | <b>Kaffee</b> | 100     | 122,89<br>±12,93   | 194,98<br>±62,03  | 290,32<br>±47,69  | 233,64<br>±50,17 | 221,36<br>±55,45 |

Signifikanzkennzeichnung: \* =  $p < 0,05$  versus Kontrolle, \*\* =  $p < 0,01$  versus Kontrolle.

Versuchsanzahl:  $n = 3$ .

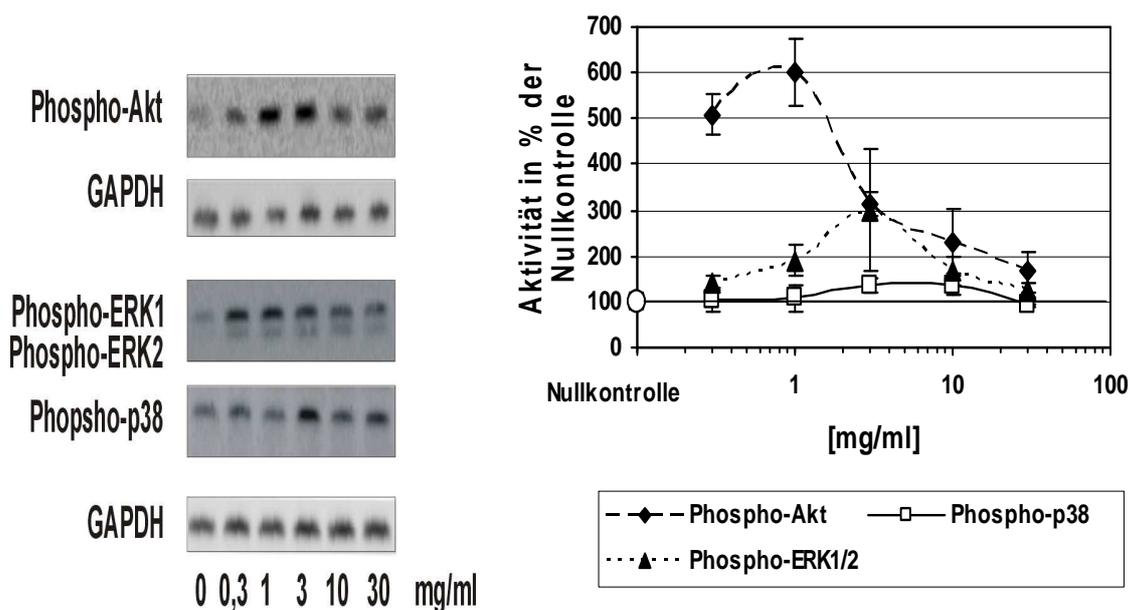
#### 4.1.7 Kinasenaktivierung durch Brotextrakt (konfluent, mit FCS)

Die WI-38 wurden bis zur Konfluenz wachsend, letztmalig 48 h vor den Versuchen einem Mediumwechsel mit FCS-haltigem Medium unterzogen und mit Brotextrakt stimuliert.

Wie aus den Abbildungen 10a und 10b hervorgeht, führen bereits niedrige Konzentrationen zu einer starken Akt-Aktivierung. Zwischen 0,3 mg/ml (509 % ± 43,25) und einem Maximum bei 1 mg/ml (601,19 % ± 73,69) ist die Phosphorylierungssteigerung signifikant ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur Nullkontrolle.

ERK1/2 erreicht eine maximale Kinasenaktivierung bei 3 mg/ml mit einer 3-fachen (± 1,32) Zunahme. Die Kurve fällt in höheren Dosen wieder ab.

Phospho-p38 zeigt Optimumsverhalten mit einer leichten Aktivierungssteigerung bis auf einen Höchstwert bei 10 mg/ml und einer Steigerung um den Faktor 1,37 (± 0,22). Bei der maximalen Brotkonzentration von 30 mg/ml hat die Kinase einen minimalen Wert, der mit  $92,7 \pm 2,38$  % unterhalb der Nullprobe liegt.



**Abbildungen 10a und 10b:** Konzentrationsabhängige Kinasenaktivierung konfluenter Fibroblasten bei Stimulation mit Brotextrakt in Medium mit Serum (Mittelwerte  $\pm$  mittlerer Fehler des Mittelwertes, Versuchszahl  $n=3$ )

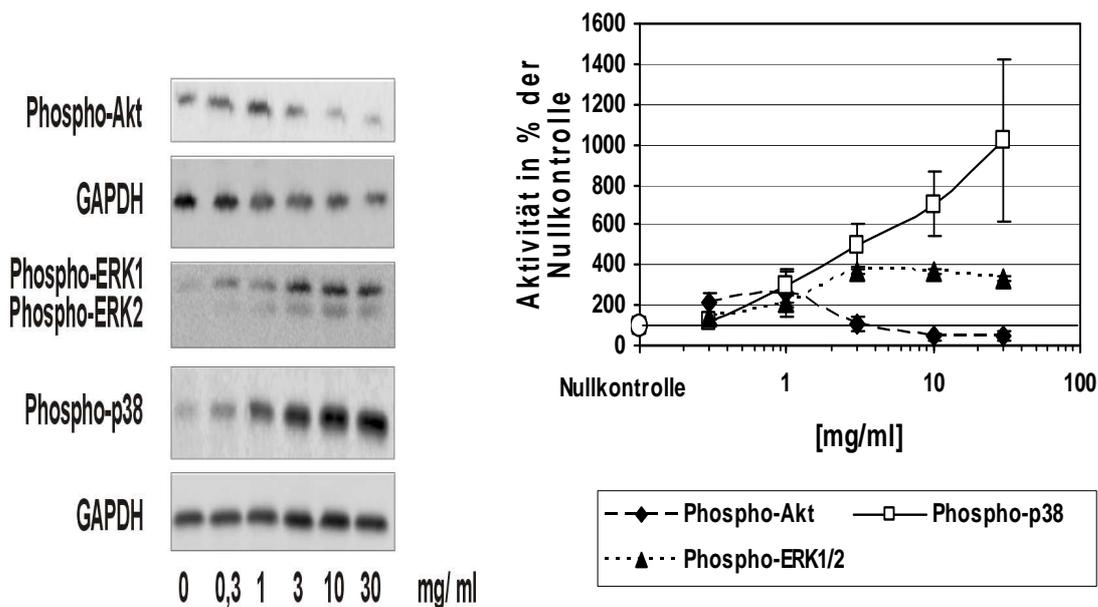
#### 4.1.8 Kinasenaktivierung durch Kaffeeextrakt (konfluent, mit FCS)

Für die Stimulationen mit Kaffeeextrakt wurde die WI-38-Anzucht in Analogie zu 4.1.7 durchgeführt.

Phospho-Akt zeigt einen Kurvenverlauf mit einer maximal 2,56-fach ( $\pm 1,1$ ) gesteigerten Aktivierung bei 1 mg/ml und fällt danach rasch unter Ausgangsniveau ab. Der T-Test ergibt hier keine signifikanten Unterschiede.

Die Phosphorylierung der ERK1/2 erlangt einen Höhepunkt (Faktor  $3,68 \pm 0,17$ ) bei einer Konzentration von 3 mg/ml. Die Kinasenaktivierung ist bei 3 mg/ml und höhere Konzentrationen signifikant ( $p < 0,01$ ).

Phospho-p38 zeigt mit zunehmender Konzentration eine kontinuierliche Aktivierungssteigerung, die bei 30 mg/ml eine 10,2-fache ( $\pm 4,04$ ) Erhöhung des Kontrollwertes aufweist (s. Abb. 11a und 11b sowie Tab. 11).



**Abbildungen 11a und 11b:** Konzentrationsabhängige Kinasenaktivierung konfluenter Fibroblasten bei Stimulation mit Kaffeeextrakt in Medium mit Serum (Mittelwerte +/- mittlerer Fehler des Mittelwertes, Versuchszahl n = 3)

**Tabelle 11:** Phosphorylierung von Kinasen nach Stimulation konfluenter Fibroblasten mit Nahrungsextrakten (Angegeben in Prozent der Nullkontrolle, Mittelwerte +/- mittlerer Fehler des Mittelwertes, letzter Mediumwechsel 48 h vor Versuchsbeginn, Medium mit Serum)

|                       |               | 0 mg/ml | 0,3 mg/ml | 1 mg/ml | 3 mg/ml  | 10 mg/ml | 30 mg/ml |
|-----------------------|---------------|---------|-----------|---------|----------|----------|----------|
| <b>Phospho-Akt</b>    | <b>Brot</b>   | 100     | 509,11*   | 601,19* | 312,52   | 230,44   | 166,50   |
|                       |               |         | ±43,25    | ±73,69  | ±26,82   | ±73,52   | ±44,98   |
| <b>Phospho-ERK1/2</b> | <b>Kaffee</b> | 100     | 211,82    | 255,90  | 105,86   | 42,98    | 46,23    |
|                       |               |         | ±53,74    | ±110,35 | ±36,90   | ±17,34   | ±18,96   |
| <b>Phospho-p38</b>    | <b>Brot</b>   | 100     | 141,81    | 189,57  | 299,99   | 166,35   | 124,32   |
|                       |               |         | ±14,71    | ±33,13  | ±131,62  | ±32,62   | ±16,71   |
| <b>Phospho-ERK1/2</b> | <b>Kaffee</b> | 100     | 142,26    | 218,82  | 367,84** | 365,60** | 329,43** |
|                       |               |         | ±11,13    | ±30,85  | ±16,62   | ±11,03   | ±10,54   |
| <b>Phospho-p38</b>    | <b>Brot</b>   | 100     | 105,02    | 107,76  | 135,37   | 137,20   | 92,73    |
|                       |               |         | ±26,42    | ±28,15  | ±17,00   | ±22,22   | ±2,83    |
| <b>Phospho-p38</b>    | <b>Kaffee</b> | 100     | 117,92    | 300,44  | 502,91   | 701,74   | 1020,79  |
|                       |               |         | ±15,95    | ±84,64  | ±106,50  | ±161,42  | ±404,39  |

Signifikanzkennzeichnung: \* = p < 0,05 versus Kontrolle, \*\* = p < 0,01 versus Kontrolle.

Versuchszahl: n = 3.

## 4.2 Die zeitliche Dauer als Einflussgröße auf die intrazelluläre Kinasen-aktivierung durch natürliche AGEs

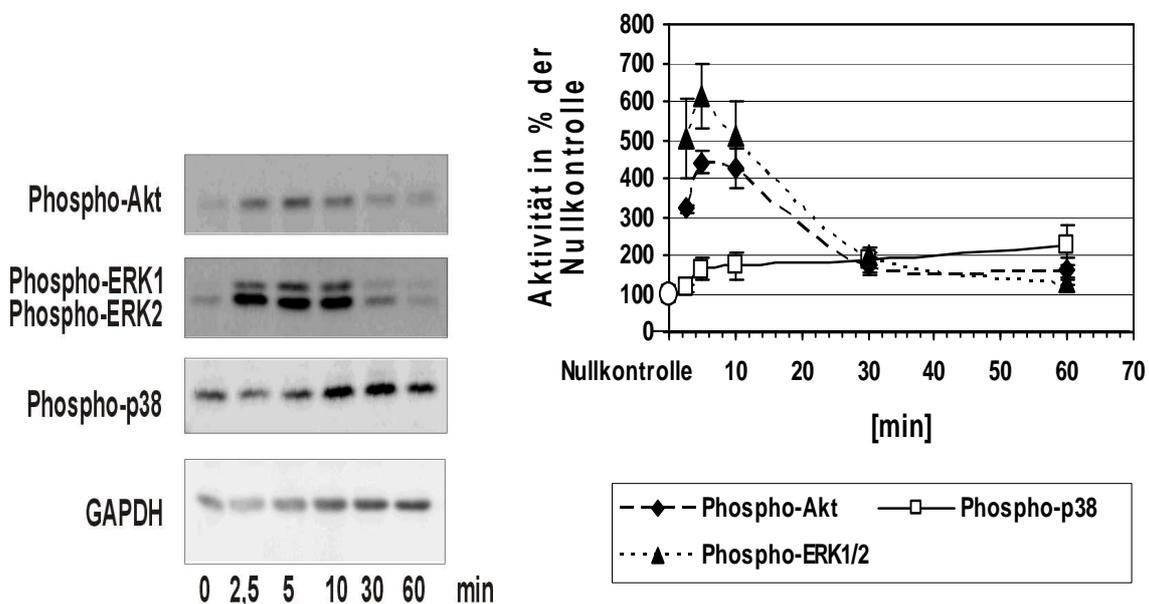
In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse aus den Zeitreihen dargestellt. Dabei wurden WI-38-Fibroblasten mit 10 mg/ml Brotextrakt oder 1mg/ml Kaffeeextrakt für 2,5, 5, 10, 30 und 60 min stimuliert. Analog zu Kapitel 4.1 wurde 24 h (subkonfluent) bzw. 48 h (konfluent) vor Beginn der Experimente der letzte Mediumwechsel mit oder ohne 10 % FCS durchgeführt.

### 4.2.1 Kinasenaktivierung durch Brotextrakt (subkonfluent, ohne FCS)

Phospho-Akt und Phospho-ERK1/2 haben sehr ähnliche Kurvenverläufe mit einem Aktivierungsmaximum bei fünfminütiger Stimulation (Phospho-Akt:  $440,55 \% \pm 27,62$  ( $p < 0,01$ ); Phospho-ERK1/2:  $612,37 \% \pm 84,01$  ( $p < 0,05$ )). Unter längerer Einwirkdauer des Brotextraktes fallen die Phosphorylierungsraten rasch wieder ab.

Die Aktivierung der p38 nimmt mit Zeitdauer des AGE-Einflusses kontinuierlich zu und erreicht ein Maximum mit 2,25-facher ( $\pm 0,52$ ) Intensitätszunahme.

Die Ergebnisdarstellung erfolgt in Tabelle 12 und den Abbildungen 12a und 12b.



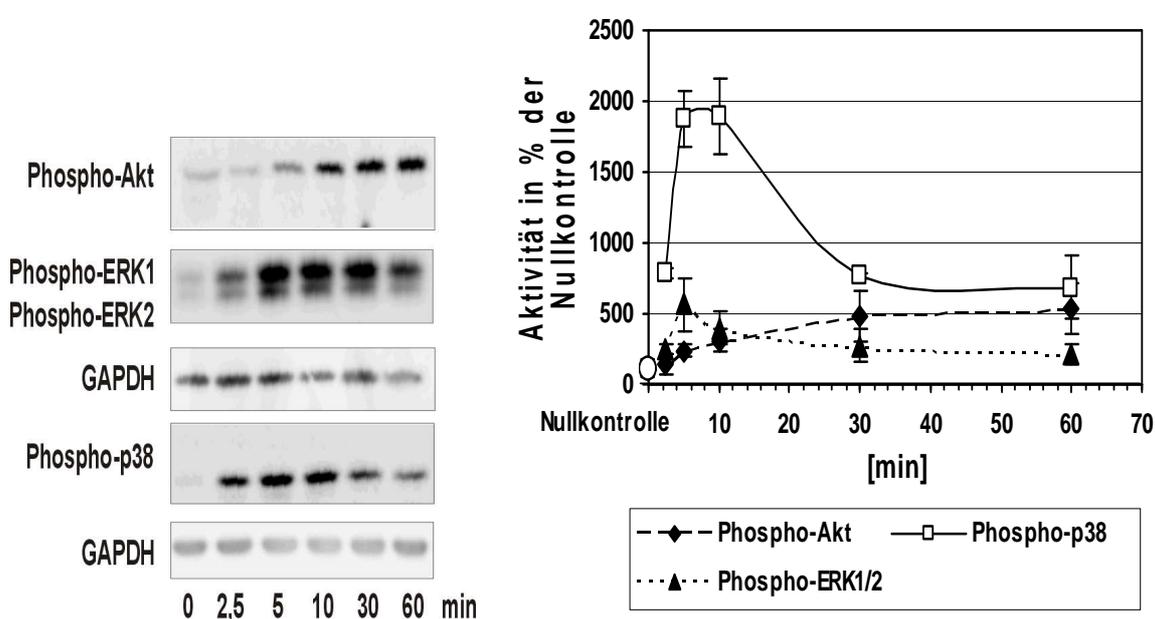
**Abbildungen 12a und 12b:** Zeitabhängige Kinasenaktivierung nicht konfluenter Fibroblasten bei Stimulation mit Brotextrakt in Medium ohne Serum (Mittelwerte  $\pm$  mittlerer Fehler des Mittelwertes, Versuchszahl  $n = 3$ )

#### 4.2.2 Kinasenaktivierung durch Kaffeeextrakt (subkonfluent, ohne FCS)

Bei den Serum-freien, nicht konfluenten Zellen wird eine maximale Erhöhung der Phospho-Akt um den Faktor 5,35 ( $\pm 1,71$ ) bei 60-minütiger Stimulation erreicht (s. Abb. 13a und 13b).

Phospho-ERK1/2 hat ihren Höhepunkt (563,57 %  $\pm 190,09$ ) bei 5 min dauernder Stimulation, während bei kürzerer oder längerer Stimulation geringere Phosphorylierungsraten gemessen werden.

Die p38 weist bei 10 min ein Maximum der Aktivierung um den Faktor 18,93  $\pm 2,65$  auf. Unter längerer AGE-Wirkung kommt es zu einem Kurvenabfall. Aufgrund eines fehlerhaften Antikörpers in einer der Versuchsreihen wurden nur 2 Versuche ausgewertet. Eine Signifikanztestung wurde daher hier nicht durchgeführt.



**Abbildungen 13a und 13b:** Zeitabhängige Kinasenaktivierung nicht konfluenten Fibroblasten bei Stimulation mit Kaffeeextrakt in Medium ohne Serum (Mittelwerte  $\pm$  mittlerer Fehler des Mittelwertes, Versuchszahl  $n = 2-3$  (s.u.))

**Tabelle 12:** Phosphorylierung von Kinasen nach Stimulation nicht konfluenten Fibroblasten mit Nahrungsextrakten (Angegeben in Prozent der Nullkontrolle, Mittelwerte +/- mittlerer Fehler des Mittelwertes, letzter Mediumwechsel 24 h vor Versuchsbeginn, Medium ohne Serum)

|                       |               | 0 min | 2,5 min             | 5 min                | 10 min               | 30 min              | 60 min              |
|-----------------------|---------------|-------|---------------------|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| <b>Phospho-Akt</b>    | <b>Brot</b>   | 100   | 319,35**            | 440,55**             | 425,02*              | 171,15              | 163,46              |
|                       |               |       | ± 9,43              | ±27,62               | ±53,04               | ±20,40              | ±28,37              |
|                       | <b>Kaffee</b> | 100   | 147,35              | 240,06               | 312,03               | 481,07              | 534,67              |
|                       |               |       | ±73,96              | ±42,01               | ±73,57               | ±176,88             | ±170,85             |
| <b>Phospho-ERK1/2</b> | <b>Brot</b>   | 100   | 501,66              | 612,37*              | 510,88*              | 198,71*             | 130,85              |
|                       |               |       | ±102,29             | ±84,01               | ±89,08               | ± 5,76              | ± 8,85              |
|                       | <b>Kaffee</b> | 100   | 253,72              | 563,57               | 395,97               | 273,92              | 216,43              |
|                       |               |       | ±34,39              | ±190,09              | ±116,15              | ±118,43             | ±73,73              |
| <b>Phospho-p38</b>    | <b>Brot</b>   | 100   | 114,26              | 163,91               | 171,09               | 187,34              | 225,43              |
|                       |               |       | ± 8,62              | ±27,74               | ±32,95               | ±29,56              | ±52,14              |
|                       | <b>Kaffee</b> | 100   | 784,40 <sup>1</sup> | 1870,49 <sup>1</sup> | 1892,98 <sup>1</sup> | 761,74 <sup>1</sup> | 683,42 <sup>1</sup> |
|                       |               |       | ±36,51              | ±192,78              | ±265,11              | ±19,89              | ±221,60             |

Signifikanzkennzeichnung: \* =  $p < 0,05$  versus Kontrolle, \*\* =  $p < 0,01$  versus Kontrolle.

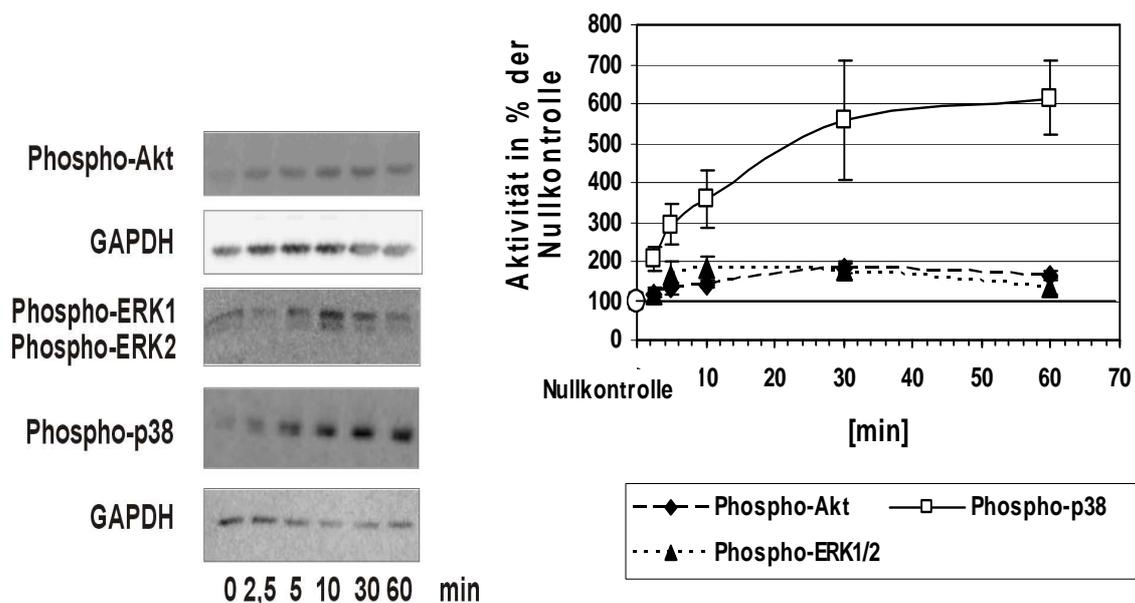
Versuchsanzahl:  $n = 3$ . <sup>1</sup> Versuchsanzahl  $n = 2$ .

#### 4.2.3 Kinasenaktivierung durch Brotextrakt (subkonfluent, mit FCS)

Brotextrakt führt ab 10 min zu einer signifikanten ( $p < 0,05$ ) Steigerung von Phospho-Akt um den Faktor 1,42 ( $\pm 0,10$ ). Ein Phosphorylierungsmaximum auf den 1,85-fachen ( $\pm 0,18$ ) Ausgangswert wird nach 30 min erreicht. Zwischen 10 und 60 min zeigt der T-Test signifikantes Niveau ( $p < 0,05$ ).

Die Phosphorylierungskurve der ERK1/2 hat Optimumscharakter mit einem Maximum bei 10 min. Hier kann eine 1,79-fache ( $\pm 0,34$ ) Steigerung der Kinasenaktivierung nachgewiesen werden.

Phospho-p38 weist eine im Vergleich zur Nullkontrolle signifikante ( $p < 0,05$ ) und kontinuierliche Zunahme der Enzyminduktion auf das 6,14-fache ( $\pm 0,95$ ) nach 60 min auf (s. Abb. 14a und 14b).

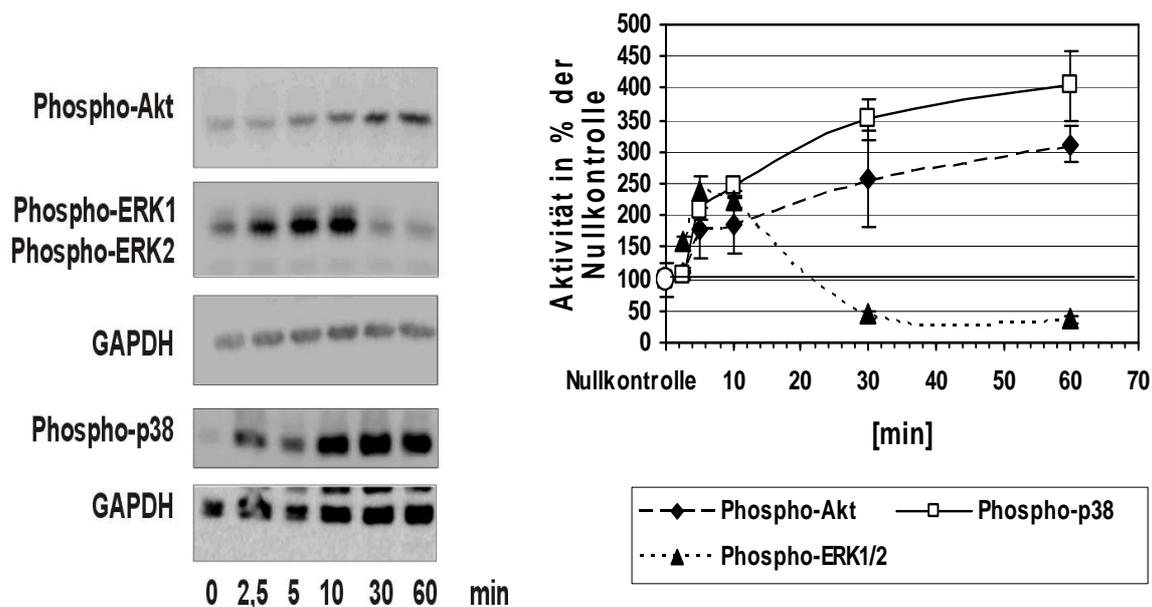


**Abbildungen 14a und 14b:** Zeitabhängige Kinasenaktivierung nicht konfluenter Fibroblasten bei Stimulation mit Brotextrakt in Medium mit Serum (Mittelwerte +/- mittlerer Fehler des Mittelwertes, Versuchszahl n = 3)

#### 4.2.4 Kinasenaktivierung durch Kaffeeextrakt (subkonfluent, mit FCS)

Kaffeeextrakt führt mit zeitlichem Einfluss zu einer kontinuierlichen Aktivierungszunahme von Akt und p38 (s. Abb. 15a und 15b), die nach 60 min zu einer 3,12-fach ( $\pm 0,30$ ) (Phospho-Akt) bzw. 4,03-fach ( $\pm 0,55$ ) (Phospho-p38) gesteigerten Grundaktivierung führen. Während sich signifikante Unterschiede der Akt-Kinasenaktivierung ( $p < 0,05$ ) erst im Maximum nachweisen lassen, zeigt sich eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Zunahme der Phospho-p38 schon nach fünfminütiger Stimulation.

Phospho-ERK1/2 erreicht im Gegensatz dazu ihren Maximalwert bereits nach 5 min und ist hier signifikant ( $p < 0,05$ ) um das 2,37-Fache ( $\pm 0,25$ ) erhöht. Nach 30 min kommt es zur Unterschreitung der Aktivierung des Nullwertes. Eine Darstellung der Versuchswerte erfolgt in Tabelle 13.



**Abbildungen 15a und 15b:** Zeitabhängige Kinasenaktivierung nicht konfluenten Fibroblasten bei Stimulation mit Kaffeeextrakt in Medium mit Serum (Mittelwerte +/- mittlerer Fehler des Mittelwertes, Versuchszahl n = 3)

**Tabelle 13:** Phosphorylierung von Kinasen nach Stimulation nicht konfluenten Fibroblasten mit Nahrungsextrakten (Angegeben in Prozent der Nullkontrolle, Mittelwerte +/- mittlerer Fehler des Mittelwertes, letzter Mediumwechsel 24 h vor Versuchsbeginn, Medium mit Serum)

|                       |               | 0 min | 2,5 min           | 5 min             | 10 min             | 30 min            | 60 min            |
|-----------------------|---------------|-------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| <b>Phospho-Akt</b>    | <b>Brot</b>   | 100   | 116,96<br>± 9,56  | 131,97<br>±14,42  | 142,15*<br>± 9,56  | 184,53*<br>±17,67 | 165,00*<br>±13,48 |
|                       | <b>Kaffee</b> | 100   | 108,69<br>± 5,57  | 178,03<br>±46,72  | 185,42<br>±43,60   | 256,28<br>±75,27  | 312,25*<br>±29,90 |
| <b>Phospho-ERK1/2</b> | <b>Brot</b>   | 100   | 113,93<br>±21,98  | 165,33<br>±34,40  | 179,38<br>±33,73   | 174,55<br>±21,81  | 134,28<br>±20,74  |
|                       | <b>Kaffee</b> | 100   | 158,19*<br>± 7,42 | 236,85*<br>±24,54 | 223,27**<br>± 9,31 | 43,93**<br>± 4,71 | 36,99**<br>± 6,11 |
| <b>Phospho-p38</b>    | <b>Brot</b>   | 100   | 206,20<br>±30,60  | 293,49<br>±49,24  | 357,79<br>±71,08   | 557,50<br>±150,22 | 614,62*<br>±95,43 |
|                       | <b>Kaffee</b> | 100   | 107,33<br>± 9,77  | 206,98*<br>±15,12 | 246,24*<br>± 7,39  | 350,53*<br>±31,30 | 403,64*<br>±54,74 |

Signifikanzkennzeichnung: \* = p < 0,05 versus Kontrolle, \*\* = p < 0,01 versus Kontrolle.

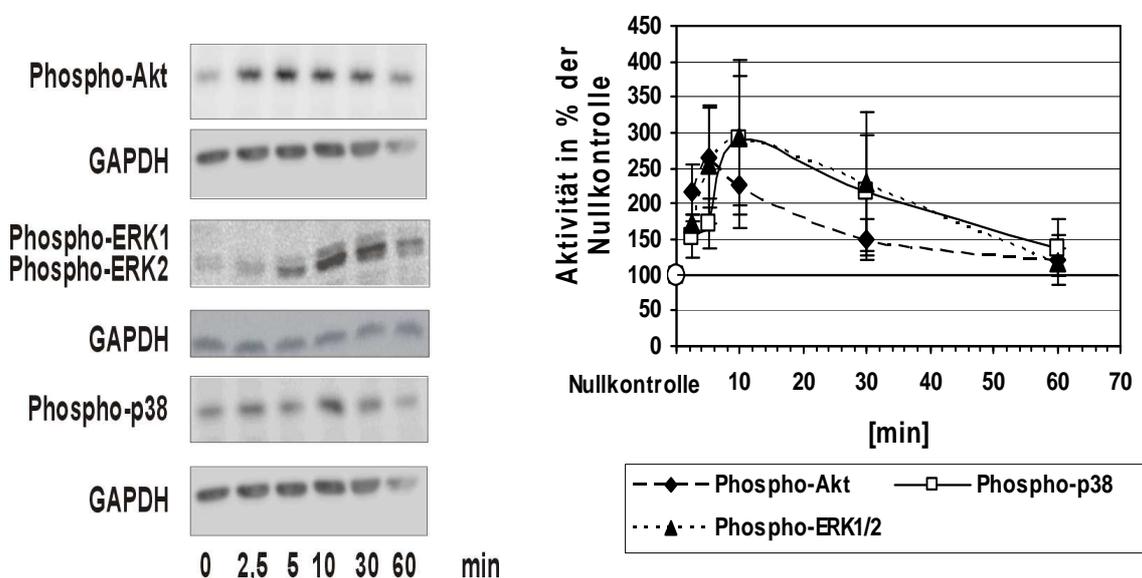
Versuchsanzahl: n = 3.

#### 4.2.5 Kinasenaktivierung durch Brotextrakt (konfluent, ohne FCS)

Die Stimulation der konfluenten Fibroblasten mit Brotextrakt in 48 h Serumfreiheit (s. Abb. 16a und 16b) zeigt bei allen drei Kinasen Optimumkurven. Einem rapiden Anstieg folgt jeweils ein langsamer Abfall.

Der Phospho-Akt-Nachweis erbringt eine maximale Aktivierung nach 5 min. Bei diesem Zeitpunkt ist die nachgewiesene Kinase um den Faktor 2,65 ( $\pm 0,70$ ) erhöht.

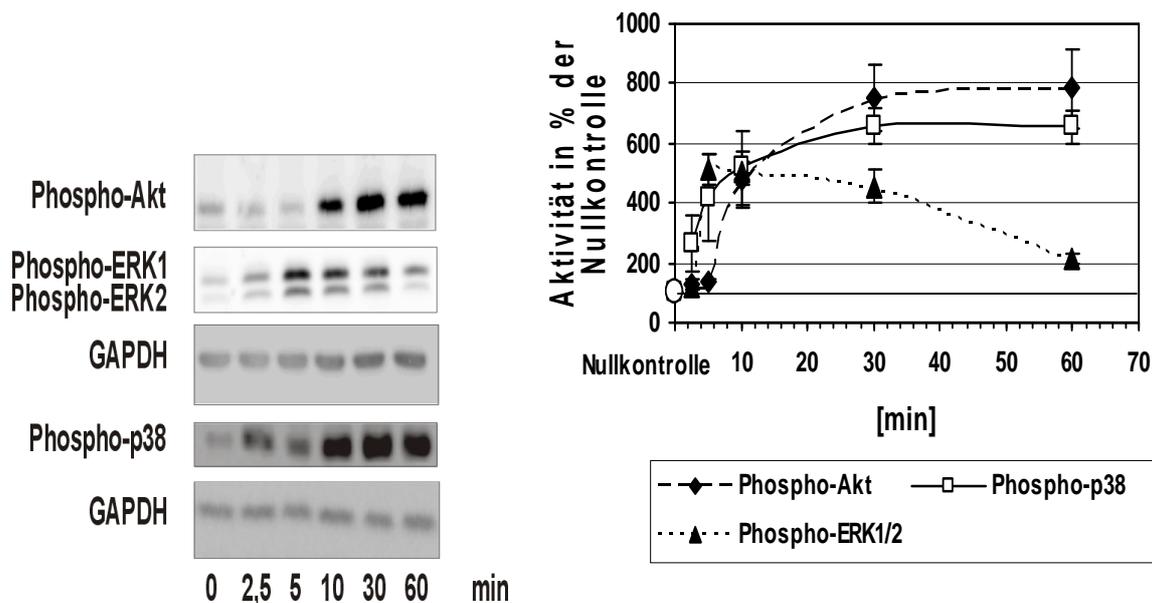
Phospho-ERK1/2 und Phospho-p38 erreichen jeweils nach zehnminütiger Stimulation ihre Maximalwerte: 293 %  $\pm 109$  (Phospho-ERK1/2) bzw. 289 %  $\pm 92$  (Phospho-p38). Die Vergleiche mit den Kontrollwerten ergeben bei allen drei Enzymen keine signifikanten Unterschiede (s. Tab. 14).



**Abbildungen 16a und 16b:** Zeitabhängige Kinasenaktivierung konfluenten Fibroblasten bei Stimulation mit Brotextrakt in Medium ohne Serum (Mittelwerte  $\pm$  mittlerer Fehler des Mittelwertes, Versuchszahl  $n = 3$ )

#### 4.2.6 Kinasenaktivierung durch Kaffeeextrakt (konfluent, ohne FCS)

Im Gegensatz zu den Versuchen in 4.2.5 zeigen sich bei den mit Kaffee behandelten Fibroblasten, Phospho-Akt und Phospho-p38 mit kontinuierlich ansteigenden Phosphorylierungsraten bis zu einem Maximum von 783 % ( $\pm 134$ ) nach 60 min (Phospho-Akt) bzw. 655 % ( $\pm 59,32$ ) nach 30 min (Phospho-p38). Der T-Test erbrachte im Nullkontrollenvergleich signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) für Phospho-Akt nach 5 min und für Phospho-p38 nach 30 min.



**Abbildungen 17a und 17b:** Zeitabhängige Kinasenaktivierung konfluenter Fibroblasten bei Stimulation mit Kaffeeextrakt in Medium ohne Serum (Mittelwerte +/- mittlerer Fehler des Mittelwertes, Versuchszahl n = 3)

**Tabelle 14:** Phosphorylierung von Kinasen nach Stimulation konfluenter Fibroblasten mit Nahrungsextrakten (Angegeben in Prozent der Nullkontrolle, Mittelwerte +/- mittlerer Fehler des Mittelwertes, letzter Mediumwechsel 48 h vor Versuchsbeginn, Medium ohne Serum)

|                       |               | 0 min | 2,5 min           | 5 min             | 10 min             | 30 min             | 60 min             |
|-----------------------|---------------|-------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| <b>Phospho-Akt</b>    | <b>Brot</b>   | 100   | 215,71<br>±40,90  | 265,44<br>±69,85  | 225,56<br>±58,77   | 149,90<br>±27,70   | 121,45<br>±35,49   |
|                       | <b>Kaffee</b> | 100   | 128,53<br>±20,41  | 138,54*<br>± 4,90 | 478,45*<br>±93,09  | 753,13*<br>±107,93 | 782,90*<br>±133,78 |
| <b>Phospho-ERK1/2</b> | <b>Brot</b>   | 100   | 173,65*<br>± 9,96 | 256,05<br>±82,39  | 292,52<br>±108,98  | 229,21<br>±100,79  | 118,06<br>±20,11   |
|                       | <b>Kaffee</b> | 100   | 120,49<br>± 5,93  | 515,94*<br>±52,10 | 500,74**<br>±35,52 | 454,67*<br>±53,95  | 212,34*<br>±19,71  |
| <b>Phospho-p38</b>    | <b>Brot</b>   | 100   | 154,77<br>±29,09  | 172,25<br>±35,44  | 288,89<br>±91,78   | 216,04<br>±80,52   | 138,11<br>±39,82   |
|                       | <b>Kaffee</b> | 100   | 263,75<br>±95,12  | 418,74<br>±143,03 | 517,83<br>±121,37  | 655,78*<br>±59,62  | 654,11*<br>±59,32  |

Signifikanzkennzeichnung: \* = p < 0,05 versus Kontrolle, \*\* = p < 0,01 versus Kontrolle.

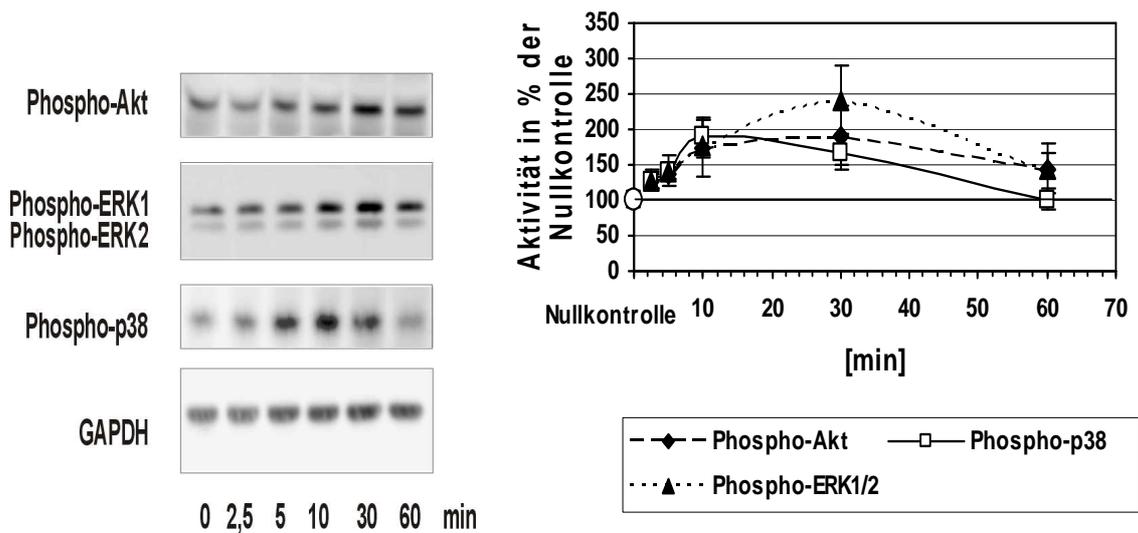
Versuchszahl: n = 3.

Die durch Kaffee aktivierte ERK1/2 weist Optimumsverhalten mit einem Höhepunkt nach 5 min auf (515,94 % ± 52,10) ( $p < 0,05$ ). Die Abbildungen 17a und 17b geben die Versuchsergebnisse grafisch wieder.

#### 4.2.7 Kinasenaktivierung durch Brotextrakt (konfluent, mit FCS)

Unter den hier gewählten Zellbedingungen erreichen die Aktivierungen der Phospho-Akt und Phospho-ERK1/2 jeweils nach 30 min (191,67 % ± 42,98 bei Phospho-Akt, 240,49 % ± 48,72 bei Phospho-ERK1/2) Maximalwerte.

Die p38 verzeichnet ein Phosphorylierungsmaximum nach 10 min mit 188 % ± 27,57. Alle hier untersuchten Kinasen weisen Optimumsverhalten auf. Die Aktivierungen unterscheiden sich unter allen Bedingungen nicht signifikant von den jeweiligen Nullkontrollen (s. Abb. 18a und 18b).

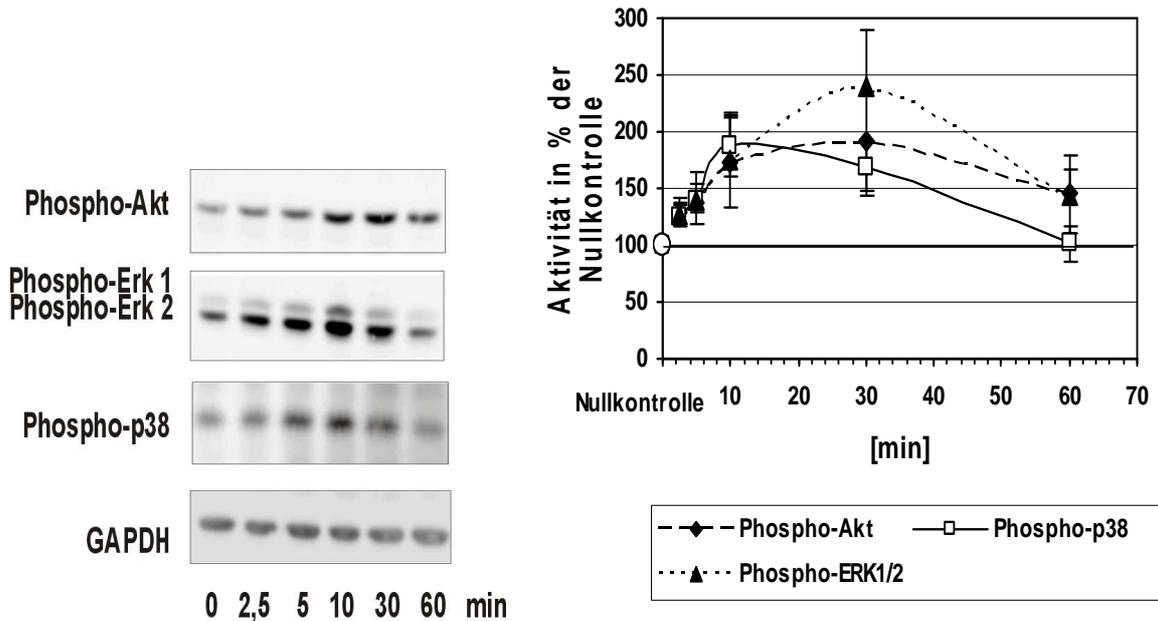


**Abbildungen 18a und 18b:** Zeitabhängige Kinasenaktivierung konfluenter Fibroblasten bei Stimulation mit Brotextrakt in Medium mit Serum (Mittelwerte +/- mittlerer Fehler des Mittelwertes, Versuchszahl n = 3)

#### 4.2.8 Kinasenaktivierung durch Kaffeeextrakt (konfluent, mit FCS)

Das Maximum der Akt-Aktivierung ist mit 372,47 % ( $\pm 10,33$ ) nach 30-minütiger Stimulation erreicht. Der T-Test ergibt hier zur Nullprobe einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,01$ ).

Phospho-ERK1/2 zeigt ein deutlicheres Optimumsverhalten mit einem Maximum nach 10 min (341,18 %  $\pm 26,02$ ). Der Nullproben-Vergleich ist ebenfalls signifikant ( $p < 0,05$ ).



**Abbildungen 19a und 19b:** Zeitabhängige Kinasenaktivierung konfluenter Fibroblasten bei Stimulation mit Kaffeeextrakt in Medium mit Serum (Mittelwerte  $\pm$  mittlerer Fehler des Mittelwertes, Versuchszahl  $n = 3$ )

Phospho-p38 zeigt eine ähnliche Phosphorylierungskurve wie die Akt-Kinase. Nach 10-minütiger AGE-Einwirkung ist die Phosphorylierung auf das 2,51-Fache ( $\pm 0,24$ ) maximal und signifikant angestiegen ( $p < 0,05$ ). Beide Kurven fallen nach Erreichen eines Plateaus langsam ab (s. Abb. 19a und 19b).

Eine zusammenfassende Darstellung der Versuchsergebnisse erfolgt in der Tabelle 15.

**Tabelle 15:** Phosphorylierung von Kinasen nach Stimulation konfluenten Fibroblasten mit Nahrungsextrakten (Angegeben in Prozent der Nullkontrolle, Mittelwerte +/- mittlerer Fehler des Mittelwertes, letzter Mediumwechsel 48 h vor Versuchsbeginn, Medium mit Serum)

|                       |               | 0 min | 2,5 min          | 5 min             | 10 min             | 30 min             | 60 min             |
|-----------------------|---------------|-------|------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| <b>Phospho-Akt</b>    | <b>Brot</b>   | 100   | 128,18<br>±10,26 | 136,61<br>±18,02  | 173,04<br>±40,68   | 191,67<br>±42,98   | 144,96<br>±33,71   |
|                       | <b>Kaffee</b> | 100   | 128,26<br>±13,07 | 177,81<br>±28,99  | 285,72**<br>± 9,96 | 372,47**<br>±10,33 | 347,75**<br>±20,62 |
| <b>Phospho-ERK1/2</b> | <b>Brot</b>   | 100   | 126,57<br>±15,27 | 140,19<br>±23,43  | 175,98<br>±37,40   | 240,49<br>±48,72   | 143,59<br>±23,77   |
|                       | <b>Kaffee</b> | 100   | 158,47<br>±22,10 | 270,00*<br>±29,05 | 341,18*<br>±26,02  | 209,00<br>±33,50   | 130,11<br>±25,89   |
| <b>Phospho-p38</b>    | <b>Brot</b>   | 100   | 125,95<br>± 9,31 | 139,09<br>± 9,12  | 188,46<br>±27,57   | 168,30<br>±23,65   | 101,46<br>±16,22   |
|                       | <b>Kaffee</b> | 100   | 133,83<br>±17,11 | 232,87*<br>±19,95 | 251,46*<br>±24,15  | 241,57*<br>±27,20  | 160,97<br>±37,00   |

Signifikanzkennzeichnung: \* =  $p < 0,05$  versus Kontrolle, \*\* =  $p < 0,01$  versus Kontrolle.

Versuchsanzahl:  $n = 3$ .

### 4.3 Vergleich der Zellkulturbedingungen und deren Einfluss auf die Kinasenaktivierungen mithilfe der Western-Blot-Analyse

Während in der vorhergehenden Kapiteln die Ergebnisse der jeweiligen Einzelversuche beschrieben wurden, werden im Folgenden die Effekte der Zellkulturbedingung (Stimulation konfluent / subkonfluent bzw. in Gegenwart von Medium mit oder ohne Serum) vergleichend dargestellt. Die Statistik wird im Vergleich zu konfluenten Zellen ohne Serum gerechnet.

#### 4.3.1 Untersuchung der Phospho-Akt

Betrachtet man die konzentrationsabhängigen Veränderungen der Akt Kinase (s. Tab. 16) in konfluenten FCS-haltigen Fibroblasten bei Stimulation mit Brotextrakt, so fällt ein signifikanter Unterschied der Kinasenaktivierung in niedriger Konzentration (bis 1 mg/ml) auf ( $p < 0,05$ ). Im weiteren Vergleich ergeben höhere Konzentrationen keine signifikanten Unterschiede. Keinen Unterschied ergab die Gegenüberstellung der hungernden Zellen (subkonfluent und konfluent).

## Ergebnisse

Bei der Stimulation mit Kaffeeextrakt liegt ein signifikanter Unterschied des Phospho-Akt-Nachweises ab einer Konzentration von 1 mg/ml bei dem Vergleich der konfluenten WI-38-Fibroblasten ohne Serum mit den nicht konfluenten Fibroblasten ohne Serum vor ( $p < 0,01$ ). Auch in höheren Konzentrationen bleibt der Vergleich signifikant unterschiedlich.

In den Zeitkinetiken, dargestellt in Tabelle 17, kann für die Stimulation der Kinase mit Brotextrakt kein signifikanter Unterschied gezeigt werden.

Bei der Stimulation mit Kaffeeextrakt zeigt sich eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Ergebnisdifferenz bei 30 min dauernder Stimulation zwischen den konfluenten WI-38-Fibroblasten ohne Serum und den nicht konfluenten Fibroblasten mit Serum.

**Tabelle 16:** Mittelwerte der Phospho-Akt bei konzentrationsabhängiger Stimulation in Prozent der Nullkontrolle

|   |               | 0 mg/ml | 0,3 mg/ml          | 1 mg/ml            | 3 mg/ml           | 10 mg/ml           | 30 mg/ml          |
|---|---------------|---------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| <b>100 %<br/>Konfluenz<br/>ohne FCS</b> | <b>Brot</b>   | 100     | 166,56<br>±15,92   | 329,86<br>±63,24   | 367,92<br>±51,88  | 262,29<br>±71,70   | 207,51<br>±46,42  |
|   | <b>Kaffee</b> | 100     | 198,47<br>± 7,87   | 249,30<br>±25,37   | 262,39<br>±57,36  | 156,44<br>±44,28   | 145,48<br>±45,71  |
| <b>100 %<br/>Konfluenz<br/>mit FCS</b>  | <b>Brot</b>   | 100     | 509,11**<br>±43,25 | 601,19*<br>±73,69  | 312,52<br>±26,82  | 230,44<br>±73,52   | 166,50<br>±44,98  |
|   | <b>Kaffee</b> | 100     | 211,82<br>±53,74   | 255,90<br>±110,35  | 105,86<br>±36,90  | 42,98<br>±17,34    | 46,23<br>±18,96   |
| <b>70 %<br/>Konfluenz<br/>ohne FCS</b>  | <b>Brot</b>   | 100     | 217,62<br>±19,05   | 312,26<br>±41,77   | 340,87<br>±60,03  | 283,78<br>±20,60   | 225,20<br>±33,80  |
|   | <b>Kaffee</b> | 100     | 315,25<br>±31,90   | 468,50**<br>±27,04 | 502,15*<br>±37,00 | 451,62**<br>±21,13 | 375,42*<br>±10,96 |
| <b>70 %<br/>Konfluenz<br/>mit FCS</b>   | <b>Brot</b>   | 100     | 139,51<br>±10,38   | 165,79<br>±26,41   | 172,27<br>±18,42  | 115,07<br>± 7,88   | 106,47<br>± 8,06  |
|   | <b>Kaffee</b> | 100     | 177,45<br>±56,58   | 242,10<br>±59,42   | 160,77<br>±56,40  | 104,21<br>±10,45   | 98,05<br>±22,87   |

Signifikanzkennzeichnung: \* =  $p < 0,05$  versus Kontrolle, \*\* =  $p < 0,01$  versus Kontrolle.

Versuchsanzahl:  $n = 3$ .

**Tabelle 17:** Mittelwerte der Phospho-Akt bei zeitabhängiger Stimulation in Prozent der Nullkontrolle

|   |               | 0 min | 2,5 min          | 5 min            | 10 min           | 30 min            | 60 min            |
|---|---------------|-------|------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| <b>100 %<br/>Konfluenz<br/>ohne FCS</b> | <b>Brot</b>   | 100   | 215,71<br>±40,90 | 265,44<br>±69,85 | 225,56<br>±58,77 | 149,90<br>±27,70  | 121,45<br>±35,49  |
|   | <b>Kaffee</b> | 100   | 128,53<br>±20,41 | 138,54<br>± 4,90 | 478,45<br>±93,09 | 753,13<br>±107,93 | 782,90<br>±133,78 |
| <b>100 %<br/>Konfluenz<br/>mit FCS</b>  | <b>Brot</b>   | 100   | 128,18<br>±10,26 | 136,61<br>±18,02 | 173,04<br>±40,68 | 191,67<br>±42,98  | 144,96<br>±33,71  |
|   | <b>Kaffee</b> | 100   | 128,26<br>±13,07 | 177,81<br>±28,99 | 285,72<br>± 9,96 | 372,47<br>±10,33  | 347,75<br>±20,62  |
| <b>70 %<br/>Konfluenz<br/>ohne FCS</b>  | <b>Brot</b>   | 100   | 319,35<br>± 9,43 | 440,55<br>±27,62 | 425,02<br>±53,04 | 171,15<br>±20,40  | 163,46<br>±28,37  |
|   | <b>Kaffee</b> | 100   | 147,35<br>±73,96 | 240,06<br>±42,01 | 312,03<br>±73,57 | 481,07<br>±176,88 | 534,67<br>±170,85 |
| <b>70 %<br/>Konfluenz<br/>mit FCS</b>   | <b>Brot</b>   | 100   | 116,96<br>± 9,56 | 131,97<br>±14,42 | 142,15<br>± 9,56 | 184,53<br>±17,67  | 165,00<br>±13,48  |
|   | <b>Kaffee</b> | 100   | 108,69<br>± 5,57 | 178,03<br>±46,72 | 185,42<br>±43,60 | 256,28*<br>±75,27 | 312,25<br>±29,90  |

Signifikanzkennzeichnung: \* =  $p < 0,05$  versus Kontrolle, \*\* =  $p < 0,01$  versus Kontrolle.

Versuchsanzahl:  $n = 3$ .

#### 4.3.2 Untersuchung der Phospho-ERK1/2

Der Vergleich konfluenten Fibroblasten ohne Serum mit nicht konfluenten WI-38-Zellen mit FCS (s. Tab. 18) weist bei einer Stimulation mit 1 mg/ml Brotextrakt einen hoch signifikanten ( $p < 0,01$ ) und bei 10 mg/ml signifikanten ( $p < 0,05$ ) Unterschied auf. Die restlichen Bedingungen ergeben für Brotextrakt keine Unterschiede.

Bei dem Vergleich der konfluenten WI-38 ohne FCS-Inkubation und den konfluenten Zellen mit FCS-haltigem Medium kann bei 30 mg/ml der einzige signifikante ( $p < 0,05$ ) Unterschied für die Konzentrationsversuche mit Kaffeeextrakt gezeigt werden.

**Tabelle 18:** Mittelwerte der Phospho-ERK1/2 bei konzentrationsabhängiger Stimulation in % der Nullkontrolle

|   |               | 0 mg/ml | 0,3 mg/ml        | 1 mg/ml            | 3 mg/ml           | 10 mg/ml          | 30 mg/ml          |
|---|---------------|---------|------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| <b>100 %<br/>Konfluenz<br/>ohne FCS</b> | <b>Brot</b>   | 100     | 244,39<br>±36,51 | 261,37<br>±15,75   | 232,40<br>±33,90  | 162,35<br>± 9,56  | 154,16<br>± 7,21  |
|   | <b>Kaffee</b> | 100     | 170,25<br>±27,75 | 346,31<br>±58,66   | 481,02<br>±79,20  | 376,72<br>±83,94  | 153,30<br>±24,16  |
| <b>100 %<br/>Konfluenz<br/>mit FCS</b>  | <b>Brot</b>   | 100     | 141,81<br>±14,71 | 189,57<br>±33,13   | 299,99<br>±131,62 | 166,35<br>±32,62  | 124,32<br>±16,71  |
|   | <b>Kaffee</b> | 100     | 142,26<br>±11,13 | 218,82<br>±30,85   | 367,84<br>±16,62  | 365,60<br>±11,03  | 329,43*<br>±10,54 |
| <b>70 %<br/>Konfluenz<br/>ohne FCS</b>  | <b>Brot</b>   | 100     | 159,40<br>±24,77 | 209,85<br>±40,03   | 248,24<br>±13,03  | 297,71<br>±31,51  | 212,90<br>±31,11  |
|   | <b>Kaffee</b> | 100     | 161,94<br>±24,26 | 199,19<br>±31,83   | 219,18<br>±37,99  | 168,12<br>±24,40  | 147,67<br>±29,31  |
| <b>70 %<br/>Konfluenz<br/>mit FCS</b>   | <b>Brot</b>   | 100     | 283,91<br>±21,75 | 368,52**<br>± 5,90 | 340,24<br>± 9,82  | 268,63*<br>±23,10 | 196,12<br>±13,48  |
|   | <b>Kaffee</b> | 100     | 135,29<br>±15,42 | 194,10<br>±13,92   | 240,99<br>±19,91  | 240,84<br>±18,49  | 180,28<br>± 3,93  |

Signifikanzkennzeichnung: \* =  $p < 0,05$  versus Kontrolle, \*\* =  $p < 0,01$  versus Kontrolle.

Versuchsanzahl:  $n = 3$ .

In der Zeitreihe (s. Tab. 19) lässt sich ein signifikanter ( $p < 0,05$ ) Unterschied bei der Stimulation mit 10 mg/ml Brotextrakt für die Dauer von 5 min nachweisen. Die restlichen Ergebnisse variieren nicht signifikant.

Die Versuche mit Kaffeeextrakt erbringen bei mittlerer Einwirkdauer (5-30 min) für die konfluenten Zellen mit FCS und für die subkonfluenten Zellen mit FCS signifikante bis hochsignifikante Ergebnisunterschiede. Die vergleichende Untersuchung der subkonfluenten Zellen ohne Serum weist keine signifikanten Ergebnisabweichungen auf.

**Tabelle 19:** Mittelwerte der Phospho-ERK1/2 bei zeitabhängiger Stimulation in % der Nullkontrolle

|   |               | 0 min | 2,5 min           | 5 min              | 10 min            | 30 min            | 60 min           |
|---|---------------|-------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| <b>100 %<br/>Konfluenz<br/>ohne FCS</b> | <b>Brot</b>   | 100   | 173,65<br>± 9,96  | 256,05<br>±82,39   | 292,52<br>±108,98 | 229,21<br>±100,79 | 118,06<br>±20,11 |
|   | <b>Kaffee</b> | 100   | 120,49<br>± 5,93  | 515,94<br>±52,10   | 500,74<br>±35,52  | 454,67<br>±53,95  | 212,34<br>±19,71 |
| <b>100 %<br/>Konfluenz<br/>mit FCS</b>  | <b>Brot</b>   | 100   | 126,57<br>±15,27  | 140,19<br>±23,43   | 175,98<br>±37,40  | 240,49<br>±48,72  | 143,59<br>±23,77 |
|   | <b>Kaffee</b> | 100   | 158,47<br>±22,10  | 270,00**<br>±29,05 | 341,18*<br>±26,02 | 209,00*<br>±33,50 | 130,11<br>±25,89 |
| <b>70 %<br/>Konfluenz<br/>ohne FCS</b>  | <b>Brot</b>   | 100   | 501,66<br>±102,29 | 612,37*<br>±84,01  | 510,88<br>±89,08  | 198,71<br>± 5,76  | 130,85<br>± 8,85 |
|   | <b>Kaffee</b> | 100   | 253,72<br>±34,39  | 563,57<br>±190,09  | 395,97<br>±116,15 | 273,92<br>±118,43 | 216,43<br>±73,73 |
| <b>70 %<br/>Konfluenz<br/>mit FCS</b>   | <b>Brot</b>   | 100   | 113,93<br>±21,98  | 165,33<br>±34,40   | 179,38<br>±33,73  | 174,55<br>±21,81  | 134,28<br>±20,74 |
|   | <b>Kaffee</b> | 100   | 158,19<br>± 7,42  | 236,85*<br>±24,54  | 223,27*<br>± 9,31 | 43,93*<br>± 4,71  | 36,99*<br>± 6,11 |

Signifikanzkennzeichnung: \* =  $p < 0,05$  versus Kontrolle, \*\* =  $p < 0,01$  versus Kontrolle.

Versuchsanzahl:  $n = 3$ .

#### 4.3.3 Untersuchung der Phospho-p38

Wie in Tabelle 20 gezeigt, gibt es in den Konzentrationsreihen mit Brotextrakt einen einzigen signifikanten ( $p < 0,05$ ) Unterschied bei 10 mg/ml zwischen konfluenten WI-38-Fibroblasten ohne Serum und den nicht konfluenten mit Serum.

In der Konzentrationsreihe mit Kaffee lassen sich für die subkonfluenten Zellen ohne und die subkonfluenten Zellen mit FCS im Vergleich zu den konfluenten Zellen ohne Serum fast durchweg signifikante Ergebnisdifferenzen nachweisen (s. hierzu Tab. 20). Einen signifikanten ( $p < 0,05$ ) Unterschied ergibt sich auch im mittleren Konzentrationsbereich (3 mg/ml) für die konfluenten Zellen mit FCS.

Eine 60-minütige Stimulation der WI-38-Fibroblasten mit Brotextrakt erbringt in der Zeitreihe (s. Tab. 21) den einzigen signifikanten ( $p < 0,05$ ) Unterschied zwischen konfluenten Zellen ohne Serum und den subkonfluenten Zellen ohne Serum. Die restlichen Bedingungen verhalten sich ähnlich.

**Tabelle 20:** Mittelwerte der Phospho-p38 bei konzentrationsabhängiger Stimulation in % der Nullkontrolle

|   |               | 0 mg/ml | 0,3 mg/ml          | 1 mg/ml            | 3 mg/ml              | 10 mg/ml            | 30 mg/ml             |
|---|---------------|---------|--------------------|--------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| <b>100 %<br/>Konfluenz<br/>ohne FCS</b> | <b>Brot</b>   | 100     | 128,85<br>±10,34   | 135,90<br>± 9,92   | 176,60<br>±24,67     | 128,43<br>± 9,85    | 107,35<br>±15,91     |
|   | <b>Kaffee</b> | 100     | 122,89<br>±12,93   | 194,98<br>±62,03   | 290,32<br>±47,69     | 233,64<br>±50,17    | 221,36<br>±55,45     |
| <b>100 %<br/>Konfluenz<br/>mit FCS</b>  | <b>Brot</b>   | 100     | 105,02<br>±26,42   | 107,76<br>±28,15   | 135,37<br>±17,00     | 137,20<br>±22,22    | 92,73<br>±2,83       |
|   | <b>Kaffee</b> | 100     | 117,92<br>±15,95   | 300,44<br>±84,64   | 502,91*<br>±106,50   | 701,74<br>±161,42   | 1020,79<br>±404,39   |
| <b>70 %<br/>Konfluenz<br/>ohne FCS</b>  | <b>Brot</b>   | 100     | 128,07<br>±14,69   | 156,12<br>±18,39   | 250,01<br>±42,80     | 284,52<br>±39,52    | 306,92<br>±46,36     |
|   | <b>Kaffee</b> | 100     | 245,54**<br>±19,00 | 855,96**<br>±80,67 | 1070,26<br>±190,92   | 1112,72*<br>±179,43 | 1252,17**<br>±141,29 |
| <b>70 %<br/>Konfluenz<br/>mit FCS</b>   | <b>Brot</b>   | 100     | 145,07<br>±14,93   | 160,10<br>± 7,56   | 187,27<br>±10,23     | 245,35*<br>±17,74   | 239,47<br>±52,83     |
|   | <b>Kaffee</b> | 100     | 190,30<br>±30,21   | 825,68*<br>±99,34  | 1709,77**<br>± 56,54 | 1518,52*<br>±148,46 | 1425,34*<br>± 97,75  |

Signifikanzkennzeichnung: \* =  $p < 0,05$  versus Kontrolle, \*\* =  $p < 0,01$  versus Kontrolle.

Versuchsanzahl:  $n = 3$ .

Für die zeitabhängigen Kaffeestimulationen zeigen sich signifikante Ergebnisdifferenzen für die konfluenten WI-38-Fibroblasten mit FCS ( $p < 0,01$ ) und die subkonfluenten Zellen mit FCS ( $p < 0,05$ ) für 30 und 60 min gegenüber der Standardbedingung. Die hungernden subkonfluenten WI-38-Zellen verhalten sich hingegen bei kürzerer Einwirkungszeit (2,5 und 5 min) signifikant ( $p < 0,05$ ) unterschiedlich.

**Tabelle 21:** Mittelwerte der Phospho-p38 bei zeitabhängiger Stimulation in % der Nullkontrolle

|   |               | 0 min | 2,5 min           | 5 min               | 10 min             | 30 min             | 60 min             |
|---|---------------|-------|-------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| <b>100 %<br/>Konfluenz<br/>ohne FCS</b> | <b>Brot</b>   | 100   | 154,77<br>±29,09  | 172,25<br>±35,44    | 288,89<br>±91,78   | 216,04<br>±80,52   | 138,11<br>±39,82   |
|   | <b>Kaffee</b> | 100   | 263,75<br>±95,12  | 418,74<br>±143,03   | 517,83<br>±121,37  | 655,78<br>±59,62   | 654,11<br>±59,32   |
| <b>100 %<br/>Konfluenz<br/>mit FCS</b>  | <b>Brot</b>   | 100   | 125,95<br>± 9,31  | 139,09<br>± 9,12    | 188,46<br>±27,57   | 168,30<br>±23,65   | 101,46<br>±16,22   |
|   | <b>Kaffee</b> | 100   | 133,83<br>±17,11  | 232,87<br>±19,95    | 251,46<br>±24,15   | 241,57**<br>±27,20 | 160,97**<br>±37,00 |
| <b>70 %<br/>Konfluenz<br/>ohne FCS</b>  | <b>Brot</b>   | 100   | 114,26<br>± 8,62  | 163,91<br>±27,74    | 171,09<br>±32,95   | 187,34<br>±29,56   | 225,43<br>±52,14   |
|   | <b>Kaffee</b> | 100   | 784,40*<br>±36,51 | 1870,49*<br>±192,78 | 1892,98<br>±265,11 | 761,74<br>±19,89   | 683,42<br>±221,60  |
| <b>70 %<br/>Konfluenz<br/>mit FCS</b>   | <b>Brot</b>   | 100   | 206,20<br>±30,60  | 293,49<br>±49,24    | 357,79<br>±71,08   | 557,50<br>±150,22  | 614,62*<br>±95,43  |
|   | <b>Kaffee</b> | 100   | 107,33<br>± 9,77  | 206,98<br>±15,12    | 246,24<br>± 7,39   | 350,53*<br>±31,30  | 403,64*<br>±54,74  |

Signifikanzkennzeichnung: \* =p < 0,05 versus Kontrolle, \*\* =p < 0,01 versus Kontrolle.

Versuchsanzahl: n = 3.

#### 4.4 Zellzählversuche

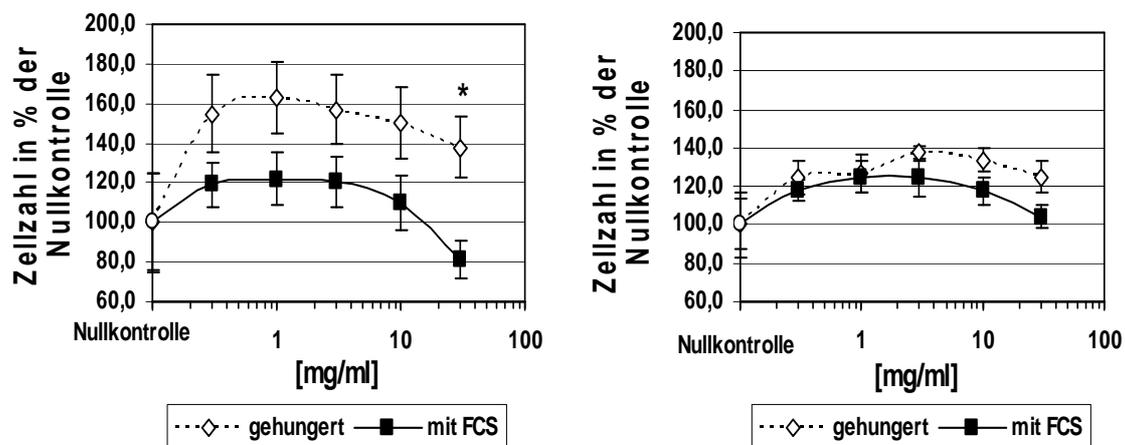
Im Folgenden wird dargestellt, wie sich die Stimulationen mit den Lebensmittelextrakten auf das Zellwachstum bzw. den Zelltod auswirken. Dazu wurden die Zellen abgelöst und mittels des CASY Zellzählers die Zahl der vitalen Zellen bestimmt.

##### 4.4.1 Zellzählungen in Abhängigkeit unterschiedlicher Kulturbedingungen bei Stimulation mit Brotkruste

Aus den Abbildungen 20 und 21 wird ersichtlich, dass es Unterschiede im Proliferationsverhalten der Zellen bei unterschiedlichen Kulturbedingungen unter Stimulation mit Brotextrakt gibt.

Hinsichtlich der Zellzahl ergibt sich bei den konfluenten Fibroblasten eine starke Abhängigkeit gegenüber dem zugegebenen Medium. Die hungernden und konfluenten Zellen proliferieren bei Brotzugabe deutlich stärker als die mit FCS inkubierten konfluenten Zellen. Die 70 % konfluenten

WI-38 weisen jedoch mit und ohne FCS keine großen Unterschiede auf. Bei allen Zählversuchen zeigt sich konzentrationsabhängig ein Optimusverhalten.



**Abbildungen 20 und 21:** Die Zellzahl von WI-38-Fibroblasten unter dem Einfluss verschiedener Brotkonzentrationen in Prozent des Mittelwertes der Nullkontrolle, links 100 % Konfluenz, rechts 70 % Konfluenz.

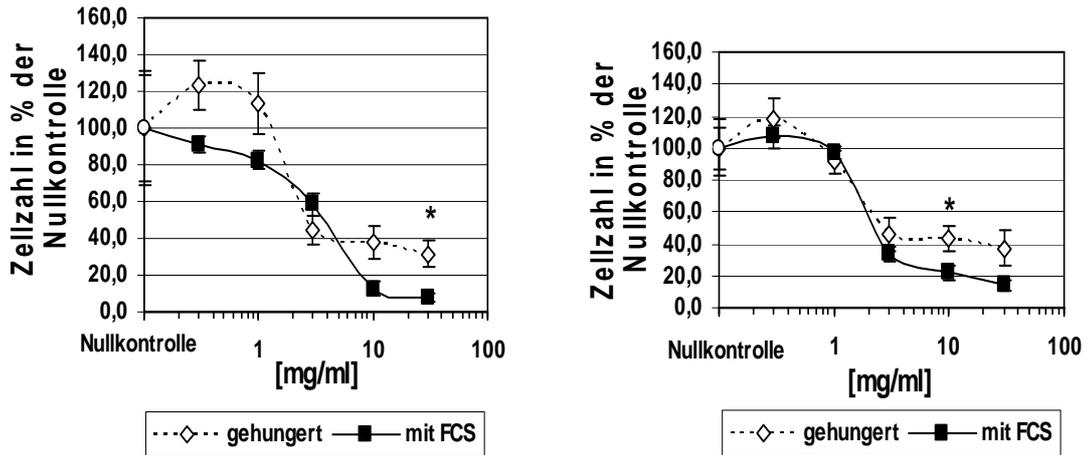
Signifikanzkennzeichnung: \* =  $p < 0,05$  versus Kontrolle. Versuchsanzahl  $n = 6$ .

Bei einer Konzentration von 30 mg/ml kommt es bei den konfluenten Zellen, die mit FCS kultiviert wurden, zu einem Abfall der Zellzahl auf  $81,4 \pm 9,5$  %. Hier zeigt sich ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen konfluenten WI-38 mit und ohne Serumkultivierung hinsichtlich der Zellzahl.

#### 4.4.2 Zellzählungen in Abhängigkeit unterschiedlicher Kulturbedingungen bei Stimulation mit Kaffeepulver

Zur Überprüfung der proliferationsfördernden oder –hemmenden Wirkung des Kaffeepulvers erfolgten in Analogie zu den Versuchen aus Kapitel 4.4.1 Zellzählungen unter dem Einfluss des Kaffees bei verschiedenen Kulturbedingungen.

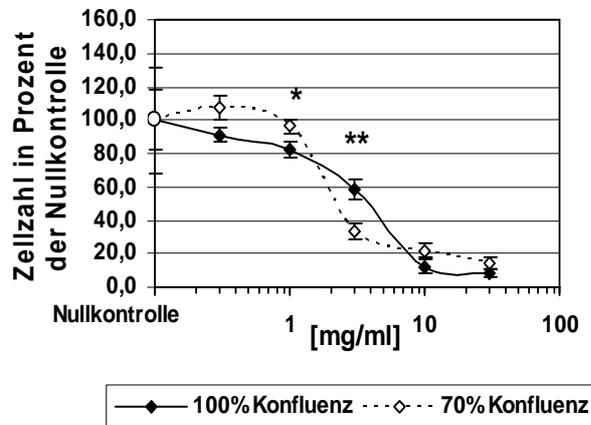
Kaffee wirkt stark reduzierend auf die Zellzahl, so dass es durchschnittlich ab einer Konzentration von 1 mg/ml zu einem Abfall der Zellzahl kommt. Eine Abhängigkeit der konfluenten Zellen hinsichtlich der Zellzahl und deren Inkubation mit oder ohne FCS zeigt sich mit einer Proliferation bei den hungernden Zellen bis zu 1 mg/ml. Bei den konfluenten WI-38 mit FCS kommt es hingegen bei niedriger Dosis (0,3 mg/ml) bereits zu einem Absinken der Zellzahl (s. Abb. 22 und 23).



**Abbildungen 22 und 23:** Die Zellzahl von WI-38-Fibroblasten unter dem Einfluss verschiedener Kaffeekonzentrationen in Prozent des Mittelwertes der Nullkontrolle, links 100 % Konfluenz, rechts 70 % Konfluenz.

Signifikanzkennzeichnung: \* =  $p < 0,05$  versus Kontrolle. Versuchszahl  $n = 6$ .

Signifikante Proliferationsunterschiede gibt es für die konfluenten Zellen bei 30 mg/ml und für die 70 % konfluenten Zellen bei 10 mg/ml ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 24:** Die Zellzahl von WI-38-Fibroblasten unter dem Einfluss verschiedener Kaffeekonzentrationen in Prozent des Mittelwertes der Nullkontrolle. Kultivierung in FCS-haltigem Medium.

Signifikanzkennzeichnung: \* =  $p < 0,05$  versus Kontrolle, \*\* =  $p < 0,01$ . Versuchszahl  $n = 6$ .

Signifikante Unterschiede des Wachstumsverhaltens zeigen sich auch beim Vergleich der nicht hungernden konfluenten mit den nicht hungernden subkonfluenten WI-38 bei Anzucht in FCS-haltigem Zellmedium (s. Abb. 24) bei 1 mg/ml ( $p < 0,05$ ) und 3 mg/ml ( $p < 0,01$ ). Tabelle 22 gibt die Zählversuche wieder.

**Tabelle 22:** Die Zellzahl von WI-38-Fibroblasten in % des Mittelwertes der Nullkontrolle unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen von Kaffee- und Brotextrakt bei unterschiedlichen Zellkulturbedingungen

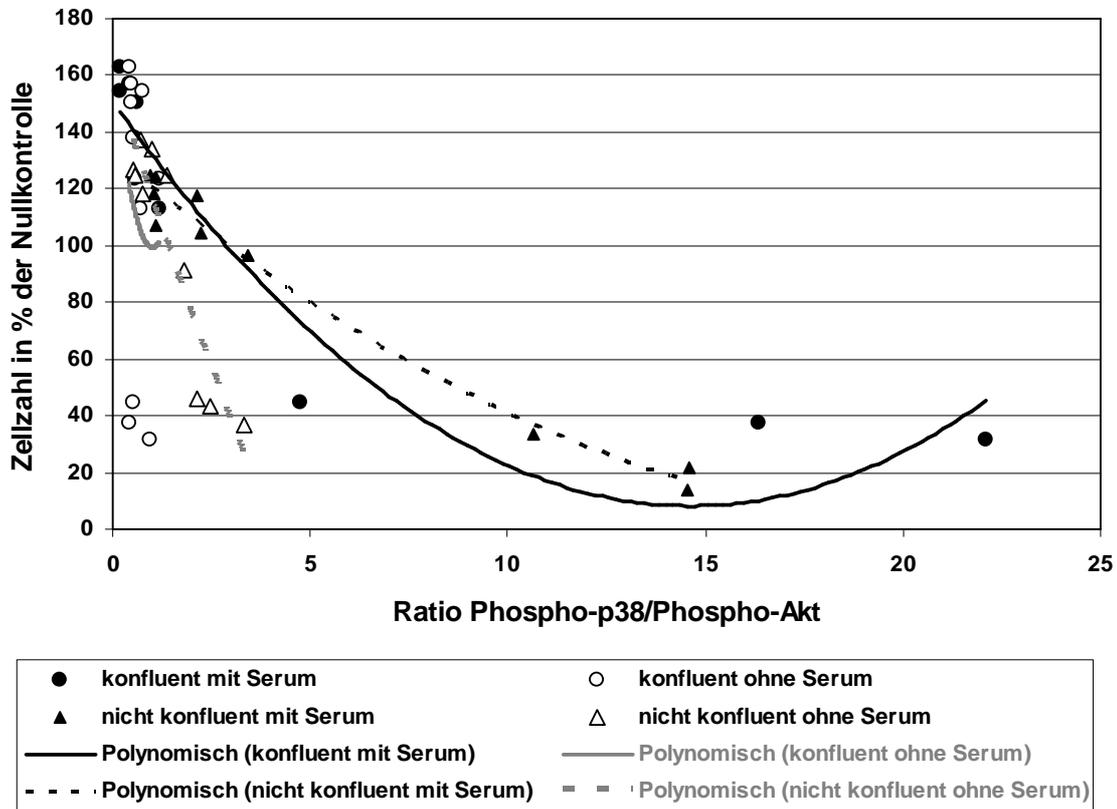
|   |               | 0 mg/ml | 0,3 mg/ml | 1 mg/ml | 3 mg/ml | 10 mg/ml | 30 mg/ml |
|---|---------------|---------|-----------|---------|---------|----------|----------|
| <b>100 %<br/>Konfluenz<br/>ohne FCS</b> | <b>Brot</b>   | 100     | 154,7     | 162,8   | 156,7   | 150,3    | 137,7    |
|   |               | ±24,3   | ±19,6     | ±18,1   | ±17,3   | ±18,3    | ±15,2    |
|   | <b>Kaffee</b> | 100     | 123,2     | 113,2   | 44,6    | 37,6     | 31,5     |
|   |               | ±29,9   | ±13,4     | ±16,7   | ±8,0    | ±8,6     | ±7,5     |
| <b>100 %<br/>Konfluenz<br/>mit FCS</b>  | <b>Brot</b>   | 100     | 119,2     | 121,7   | 120,7   | 109,8    | 81,4     |
|   |               | ±25,0   | ±11,2     | ±13,3   | ±13,0   | ±14,2    | ±9,5     |
|   | <b>Kaffee</b> | 100     | 91,2      | 82,2    | 58,5    | 12,5     | 8,0      |
|   |               | ±31,4   | ±4,6      | ±5,0    | ±5,7    | ±3,9     | ±2,1     |
| <b>70 %<br/>Konfluenz<br/>ohne FCS</b>  | <b>Brot</b>   | 100     | 124,5     | 126,8   | 137,7   | 133,7    | 124,7    |
|   |               | ±13,1   | ±8,3      | ±9,9    | ±3,5    | ±6,3     | ±8,1     |
|   | <b>Kaffee</b> | 100     | 118,5     | 91,5    | 46,0    | 43,5     | 37,0     |
|   |               | ±13,3   | ±12,0     | ±7,5    | ±10,2   | ±8,2     | ±11,4    |
| <b>70 %<br/>Konfluenz<br/>mit FCS</b>   | <b>Brot</b>   | 100     | 118,1     | 124,7   | 124,0   | 117,8    | 104,2    |
|   |               | ±17,0   | ±5,5      | ±8,4    | ±9,4    | ±7,2     | ±6,0     |
|   | <b>Kaffee</b> | 100     | 107,1     | 96,6    | 33,8    | 21,9     | 13,8     |
|   |               | ±18,0   | ±7,2      | ±4,1    | ±4,7    | ±4,5     | ±3,5     |

#### 4.5 Explorative Analyse

Vor dem Hintergrund der gewonnenen Daten stellt sich die Frage, ob tatsächlich ein Zusammenhang zwischen der Induktion der Phosphorylierung von Kinasen und der Proliferation bzw. des Zelltodes besteht. Da die p38-MAPK für die Antwort der Zellen auf Stress, die Akt-Kinase für den Survival Pathway und die ERK1/2-MAPK für das Zellwachstum stehen, sollten deren Aktivierung im Vergleich zur Zellzahl analysiert werden. Explorativ wurden daher Quotienten aus Phospho-p38/Phospho-Akt bzw. Phospho-p38/Phospho-ERK1/2 (gemessen in den Konzentrationsreihen (Kap. 4.1)) gebildet und mit der gemessenen Zellzahl (Kap. 4.4) verglichen. Die Datenanalyse aus Stimulationen mit Brotkruste und Kaffeepulver erfolgt gemeinsam, um die Datenmenge zu erhöhen.

#### 4.5.1 Das Verhältnis zwischen stress pathway (p38) und survival pathway (Akt) im Bezug zur Zellzahl

Abbildung 25 zeigt, dass ein niedriger Quotient aus Phospho-p38 und Phospho-Akt mit einer hohen Zellzahl einhergeht.



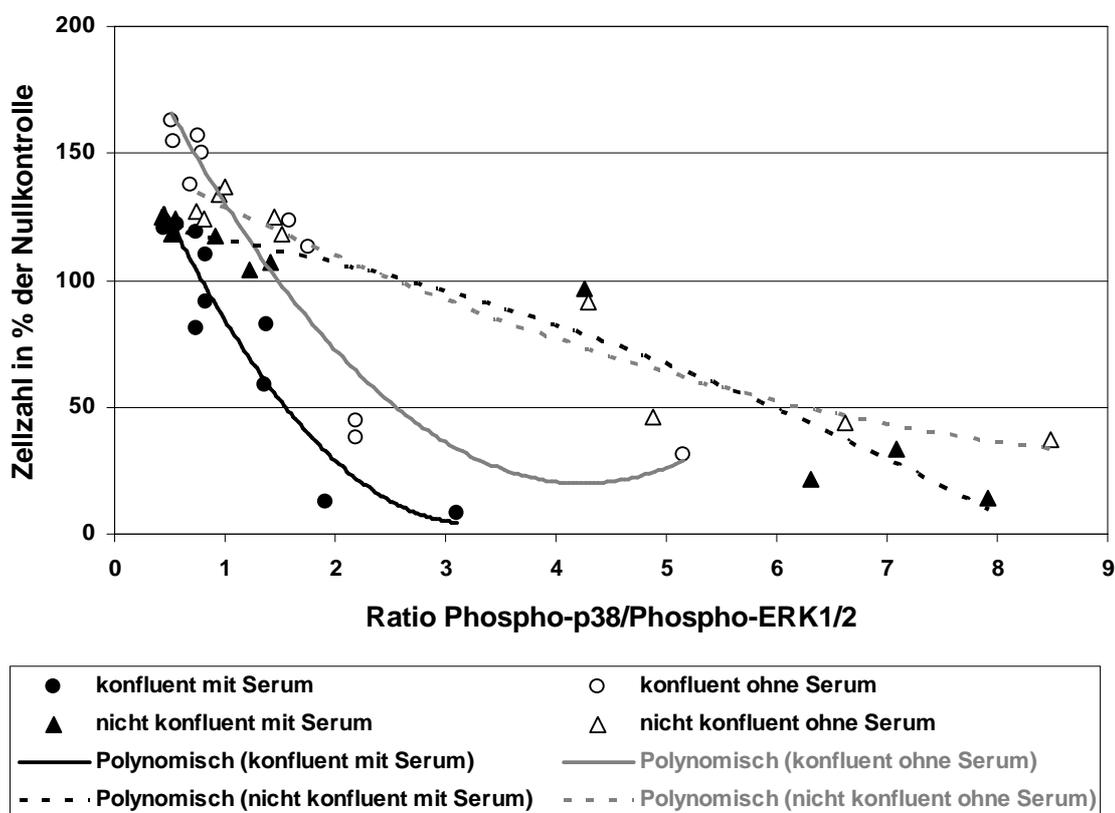
**Abbildung 25:** Darstellung des Einflusses verschiedener AGEs (Extrakte aus Kaffee und Brotkruste) auf die intrazelluläre Kinasenaktivierung im Zusammenhang mit der gemessenen Zellzahl der WI-38-Fibroblasten unter verschiedenen Kulturbedingungen anhand des Ratios Phospho-p38/Phospho-Akt. Darstellung unter zu Hilfenahme polynomischer Trendlinien.

Besonders deutlich ist bei Betrachtung der mit FCS inkubierten Zellreihen ein Absinken der gemessenen Zellzahl bei Zunahme des dargestellten Ratios zu sehen. Die graphisch eingefügten Trendlinien schneiden die 100 % (Zellzahl bleibt konstant) im Mittel bei einem Ratio von 2,0 (konfluent mit FCS: 2,9; konfluent ohne FCS: 0,9; nicht konfluent mit FCS: 2,9; nicht konfluent ohne FCS: 1,4).

#### 4.5.2 Das Verhältnis zwischen stress pathway (p38) und Zellproliferation (ERK 1/2) im Bezug zur Zellzahl

Aus Abbildung 26 ist ersichtlich, dass eine hohe Zellzahl ebenfalls mit einem niedrigen Quotienten aus Phospho-p38 und Phospho-ERK1/2 einhergeht. Ein hoher Quotient (hohe p38-Aktivierung) geht folglich mit einer niedrigen Zellzahl einher.

Ein Unterschied der Zellzahl (100 %) ist durchschnittlich bei einem Ratio von 1,8 (konfluent mit FCS: 0,8; konfluent ohne FCS: 1,5; nicht konfluent mit FCS: 2,5; nicht konfluent ohne FCS: 2,5) zu verzeichnen.



**Abbildung 26:** Darstellung des Einflusses verschiedener AGEs (Extrakte aus Kaffee und Brotruste) auf die intrazelluläre Kinasenaktivierung im Zusammenhang mit der gemessenen Zellzahl der WI-38-Fibroblasten unter verschiedenen Kulturbedingungen anhand des Ratios Phospho-p38/Phospho-ERK1/2. Darstellung unter zu Hilfenahme polynomischer Trendlinien.

## 5 Diskussion

AGEs gelten als die aromatischen Hauptbestandteile erhitzter Nahrung und entstehen bei der Maillard-Reaktion protein- und karbohydrathaltiger Nahrung unter Einwirkung hoher Temperaturen [2].

Bisher ist wenig bekannt über den Effekt der mit der Nahrung aufgenommenen AGEs auf den menschlichen Körper. Von den „*in vitro*“ entstandenen AGEs weiß man, dass sie zur Entstehung degenerativer Erkrankungen wie Alzheimer, Diabetes oder kardiovaskulären Erkrankungen führen können [11]. Es wurde mehrfach beschrieben, dass AGEs in Säugetierzellen Kinasenkaskaden aktivieren können [36, 84, 44, 45].

### 5.1 Die intrazelluläre Kinasenaktivierung durch Glykierungsend-produkte aus Nahrungsmitteln

Mit der ersten Fragestellung dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob AGEs einen konzentrations- und/oder zeitabhängigen Einfluss auf die Aktivierung der Akt-, ERK1/2- und p38-Kinasen haben. Eine Stimulation der WI-38-Zellen wurde hierzu unter verschiedenen Zellkulturbedingungen mit AGE-reichen Nahrungsmitteln durchgeführt und mittels Western-Blot eine Kinasenaktivierung analysiert. Die Ergebnisse sollen jetzt getrennt für die jeweiligen Kinasen kurz zusammengefasst und im Kontext bisheriger Forschung diskutiert werden.

#### 5.1.1 Konzentrations- und zeitabhängiger Einfluss von Brot- und Kaffeeextrakt auf die Phosphorylierung der Akt-Kinase in humanen Lungenfibroblasten

Für viele Zellarten (z.B. WI-38-Fibroblasten, humane Hautfibroblasten, Retinale Ganglienzellen, Glioblastomzellen, etc.) wurde die Akt-Aktivierung als ein Marker für das Zellüberleben identifiziert [75, 85, 86, 87, 88, 89]. Die Akt/PKB-Signalkaskadenaktivierung führt dazu, dass Zellen apoptotischen Stimuli widerstehen können [90].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sich sowohl durch Brotextrakt als auch durch Kaffeeextrakt teilweise signifikante Aktivierungen der Akt-Kinase in WI-38-Fibroblasten erzielen lassen. Eine durchschnittlich maximale Akt-Aktivierung durch Kaffee- und Brotextrakt wird bei einer Dosis von 1-3 mg/ml erreicht. Sie impliziert eine positive Wirkung natürlicher AGEs für das Zellüberleben innerhalb dieses Dosisbereichs.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu bisherigen Experimenten der Arbeitsgruppe Simm mit kardialen Mausfibroblasten bei denen kein positiver Effekt auf die Phosphorylierung der Akt-Kinase durch Brotextrakt nachgewiesen werden konnte [91].

Bei höheren Dosen scheinen wiederum zytotoxische Effekte zu überwiegen und es kommt zu einer Reduktion des Überlebenssignals. Muscat *et al.* (2007) wiesen an einer humanen Macrophagenzelllinie den zytotoxischen Effekt koffeinhaltigen Kaffees über eine RAGE-unabhängige Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Weges nach [92]. Dabei werden verschiedene Möglichkeiten für die beschriebene zytotoxische Wirkung des Kaffees diskutiert: Im Kaffee enthaltene Tanninsäure hat durch die Produktion von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zytotoxische Potenz. Park *et al.* (2008) zeigten in einer Arbeit diesbezüglich die zytotoxischen Effekte von gallischer Säure, ein Hydrolysat der Tanninsäure, an einer testikulären Zelllinie [93]. Zum anderen gibt es eine direkte zytotoxische Wirkung von AGEs [94]. Dies könnte auch der Mechanismus sein, welcher sich in den vorliegenden Experimenten im Absinken der Akt-Phosphorylierung unter Ausgangsniveau bei hohen Kaffeekonzentrationen der FCS-haltigen Fibroblasten widerspiegelt.

Eine bei den gewählten Konzentrationen vorhandene zeitabhängige Akt-Aktivierung konnte mit vergleichbaren Verläufen der Aktivierungskurven serum- und Stimulanzienabhängig gezeigt werden. Kaffee verursacht in den durchgeführten Experimenten meistens eine kontinuierliche Zunahme der Kinasenaktivierung, während durch die Aktivierung mit Brotextrakt ein Optimumverhalten erreicht wird. Kaffee erzielt in der hier gewählten Konzentration einen stärkeren Effekt als Brotkruste auf die Phosphorylierung der Akt-Kinase.

Ob es sich um einen Effekt der Kaffeesäure [95] handelt, die unter Zellstressbedingungen einen protektiven Effekt auf das Überleben von Fibroblasten haben kann, bleibt offen. Guijarro *et al.* (2007) propagierten hingegen eine Myc-induzierte Apoptoseresistenz hungernder Fibroblasten in Kultur durch freie Radikale, die sich über eine Akt-Aktivierung zeigt [96]. Weitere Untersuchungen hinsichtlich der Konzentration freier Radikale unter den in dieser Arbeit gegebenen Versuchsbedingungen wären interessant.

Welche AGEs zu der Aktivierung der Akt-Kinase geführt haben, lässt sich aus den gewonnenen Ergebnissen nicht sagen. In Frage kämen bei der thermischen Bearbeitung von Lebensmitteln entstehende Melanoidine [97]. Eines dieser Melanoidine konnte als Pronyl-L-Lysin identifiziert werden, welches u.a. beim Backvorgang von Brot entsteht [83]. Im Rahmen der Maillard-Reaktion entsteht auch regelmäßig CML, welches als sensitiver Marker für hitzebehandelte Nahrung Eingang in die Lebensmittelchemie gefunden hat [91, 98].

### **5.1.2 Konzentrations- und zeitabhängiger Einfluss von Brot- und Kaffeeextrakt auf die Phosphorylierung der ERK1/2-MAP-Kinase in humanen Lungenfibroblasten**

Durch die Aktivierung der ERK1/2 werden in den meisten Zelltypen eine Proliferation induziert und die Apoptose gehemmt [52, 53]. In dieser Arbeit wurde eine ERK1/2-Aktivierung in humanen Lungenfibroblasten durch natürliche AGEs nachgewiesen.

Die Stimulationsversuche der ERK1/2-Kinase durch Kaffee- und Brotextrakt weisen vorwiegend eine signifikante und konzentrationsabhängige Aktivierung der Kinase für alle Zellbedingungen auf. Unter subkonfluenten Bedingungen hat Brot einen stärkeren Aktivierungseffekt als Kaffee.

Die eigenen Experimente bestätigen die von Zill *et al.* (2003) an hungernden (serum-freien) Caco-2-Zellen gezeigte Aktivierung der ERK1/2-MAPK. Im Gegensatz zu den Experimenten mit Caco-2-Zellen erreichte in den vorliegenden Versuchen (mit Ausnahme der nicht konfluenten, FCS-freien WI-38) die Kinasenaktivierung durch Kaffee höhere Aktivierungsraten. Zill *et al.* (2003) führten jedoch keine Differenzierung hinsichtlich der Konfluenz durch [45].

Aus Ergebnissen an HeLa-Zellen weiß man, dass eine direkte Interaktion der p38 $\alpha$  mit der ERK1/2 MAP-Kinase zu einer Komplexbildung führen kann, in deren Folge eine Phosphorylierung der ERK1/2 durch die MEK1/2 verhindert wird [99]. Dieser Zusammenhang scheint möglicherweise auch in WI-38-Fibroblasten zu bestehen, da eine zunehmende Phospho-p38-Aktivierung mit einer verminderten Phospho-ERK1/2-Aktivierung einhergeht. Besonders deutlich zeigt sich dieser Zusammenhang bei Stimulation mit Kaffeeextrakt.

Dies erklärt allerdings den Effekt beim Brot nicht, da hier ein Nachweis der ERK1/2-Kinasenaktivierung trotz erhöhter Phospho-p38 gelingt. Brotkruste verursacht in kardialen Mausfibroblasten nur einen moderaten oxidativen Stress [91], welcher vielleicht hier mit einer MAP-Kinasen-Aktivierung der ERK1/2 einhergeht und mit einer Proliferation assoziiert ist.

Ähnlich wie bei der konzentrationsabhängigen Aktivierung der ERK1/2-MAP-Kinase konnte eine Zeitabhängigkeit nachgewiesen werden, die meistens ein Maximum zwischen 5 und 10 min Stimulationsdauer erreicht. Die nicht konfluenten Zellen mit FCS weisen bei Kaffeestimulation ab 30 min niedrigere Aktivierung der MAP-Kinase auf als die nicht stimulierte Kontrolle. Möglicherweise spielt hier die zytotoxische Wirkung des Kaffees durch die Bildung freier Radikale [92] eine so starke Rolle, dass es bedingt durch Zelltod zu einer Signalabschwächung kommt.

### **5.1.3 Konzentrations- und zeitabhängiger Einfluss von Brot- und Kaffeeextrakt auf die Phosphorylierung der p38 in humanen Lungenfibroblasten**

Die Aktivierung der p38-MAPK gilt in vielen Zelllinien als Stress bzw. Apoptosemarker [47, 49].

Für die Phospho-p38 ließen sich tatsächlich auch bei den WI-38 Zellen in den Konzentrations- und Zeitreihen dieser Arbeit durch Brot und Kaffee signifikante Phosphorylierungsraten messen. Kaffeeextrakt führt in allen Versuchen zu einer stärkeren Aktivierung der p38-MAP-Kinase als Brotextrakt.

Verschiedene AGEs (CML, Pronylglycin, etc.) können eine vermehrte p38-Phosphorylierung auslösen [45, 91, 100]. Wie in der Einleitung erwähnt, ist die Aktivierung der p38-MAP-Kinase durch Kaffee und Brotkruste u.a. an Caco-2-Zellen bereits bekannt [45]. Brotkruste triggert die Bildung von ROS und kann über diesen Weg eine p38-Aktivierung bedingen [84, 91]. Muscat *et al.* (2007)

beschrieben diesen Aktivierungsweg ebenfalls für koffeinhaltigen Kaffee. Über den NFκB-Weg kommt es hier zu einer p38-Aktivierung [92].

Die eigenen Resultate bestätigen die Ergebnissen von Zill *et al.* (2003): Kaffee scheint auch in humanen Lungenfibroblasten ein stärkerer Verursacher von Zellstress zu sein als Brotkruste [45]. Einige Autoren klassifizierten bereits bestimmte zytotoxische AGEs als Toxic AGEs (TAGs) [101, 102, 103]. Die stärkere Kinasenaktivierung der Phospho-p38 und die verminderte Zellzahl (s. Kap. 5.3 und 5.4) unter Einfluss von Kaffeeextrakt lässt möglicherweise darauf schliessen, dass in Kaffee viele dieser TAGs enthalten sind. Neuere Ergebnisse von Hegele *et al.* (2009) weisen hingegen darauf hin, dass H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> welches in AGE-reichen Nahrungsmittelkomponenten und Kaffee reichlich entsteht, als Hauptverursacher der Zytotoxizität zu sehen ist [104].

Kritisch anzumerken ist, dass bei den Western-Blot-Versuchen mit Kaffeeextrakt teilweise ein älterer und ein neuerer p38-Antikörper verwendet wurden, so dass es hier zu Abweichungen der Intensität der Absorptionsraten im Bandenmuster trotz Abgleich mit GAPDH kam - der teilweise höhere Standardfehler des Mittelwertes lässt sich möglicherweise so erklären.

### **5.2 Der Einfluss der Kulturbedingungen auf die Kinasenaktivierung in WI-38 Fibroblasten**

Als zweite Fragestellung dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob unterschiedliche Zellkulturbedingungen zu unterschiedlichen Versuchsergebnissen hinsichtlich der Kinasenaktivierungen führen. Normalerweise werden Untersuchungen zu MAPK-Phosphorylierungen an konfluenten Zellen mit Serumentzug durchgeführt. Diese Ergebnisse geben die „*in vivo*“-Verhältnisse jedoch nicht wieder. Neben dem teilweise unterschiedlichen Verhalten der einzelnen Kinasen variieren die Einzelwerte der Phospho-Akt, Phospho-ERK1/2 und der Phospho-p38 in der eigenen Untersuchung unter verschiedenen Kulturbedingungen teilweise signifikant voneinander.

In den Zeitversuchen der Akt-Aktivierung kommt es zu ähnlichen Kurvenverläufen der Kinase in Abhängigkeit der Zugabe von FCS zum Zellmedium. Kaffee führt in gewählter Konzentration von 1 mg/ml unter hungernden Bedingungen zu einer kontinuierlichen Zunahme der Akt-Aktivierung, während es unter FCS-Zugabe zu einem Optimumsverhalten kommt. Brot zeigt hier ein generelles Optimumsverhalten.

Die Effekte der Serum-Zugabe (FCS-frei/FCS-haltig) zu den Zellen und die Zell-Zellkontakte (Subkonfluenz/Konfluenz) und deren Interaktionen sind komplex.

Andjelkovic *et al.* (1997) erklärten eine rasche Akt-Aktivierung in embryonalen Nierenzellen (293-Zellen) durch Wachstumsfaktoren (IGF1-abhängig). Die Arbeitsgruppe liess Zellen in 24 h-Serumfreiheit wachsen und stimulierte diese anschließend mit IGF-1 [62]. Die eigenen Ergebnisse weisen hingegen darauf hin, dass AGE-reiche Nahrungsmittel selbst in der Lage sind, weitgehend unabhängig von Wachstumsfaktoren (FCS-freies Medium) zu einer Akt-Aktivierung zu führen.

Des Weiteren zeigt sich, dass eine Aktivierung der ERK1/2-Kinase durch Zell-Zell-Kontakte in konfluenten Zellen nicht verhindert wird. In diploiden Fibroblasten, wie den WI-38, kommt es normalerweise durch Zell/Zell-Kontakte zu einer Hemmung des Wachstums über das Protein Kontaktinhibin [105]. Vinals *et al.* präsentierten 1999 einen Zusammenhang für die Hemmung der ERK1/2-MAP-Kinase mit Zunahme der Konfluenz von Zellen und den damit verbundenen Zell/Zellkontakten. In der Folge kam es zu einer verminderten Mitoserate [106]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass trotz Konfluenz keine Hemmung der ERK1/2 erreicht wird.

### **5.3 Der konzentrationsabhängige Einfluss von Brot- und Kaffeeextrakt auf die absolute Zellzahl humaner WI-38-Fibroblasten**

In einer dritten Fragestellung sollte geklärt werden, ob zum einen die untersuchten Nahrungsmittel-extrakte direkt auf die Zellzahl Einfluss haben und zum anderen ob es hier wiederum zu Unterschieden unter verschiedenen Kulturbedingungen kommt. Neben den kurzfristigen Effekten (diskutiert in Kap. 5.1) sollten hier die längerfristige Wirkung der Extrakte untersucht werden.

In der eigenen Arbeit zeigt sich, dass Brotkruste mehr als Kaffee eine proliferationsfördernde Wirkung auf die WI-38-Fibroblasten hat. Lediglich in der Kombination hohe Konzentration (30 mg/ml), FCS-haltiges Medium und Konfluenz wirkt Brotkruste verringern auf die Zellzahl. Kaffee hingegen bewirkt generell in Dosen unter 1 mg/ml eine Proliferation und in höheren Konzentrationen eine Verminderung der Zellzahl. Dies bestätigt auch für WI-38 Ergebnisse von Neuro2-Zellen, bei denen AGEs in niedriger Konzentration zu einer Proliferation und in hohen Dosen zytotoxisch wirkten [107]. Ein positiver Effekt des Brotextraktes auf hungernde Zellen und deren Überlebenspotential wurde in ähnlichen Konzentrationen auch für kardiale Mausfibroblasten beschrieben [91]. Kaffee ist stärker zytotoxisch und reduziert in niedrigerer Konzentration die Zellzahl als Brotkruste. Eine Ursache könnte eine stärkere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion mit anschließender Aktivierung des NF-κB-Weges [92, 93] durch Kaffee sein. Hierzu müsste man weiterführend die WI-38-Fibroblasten hinsichtlich des genauen Apoptoseweges untersuchen. Im Gegensatz zu den eigenen Experimenten zeigten Muscat *et al.* (2009) an Makrophagen lediglich eine Proliferationshemmung unter AGE-Wirkung statt einer Reduktion der Zellzahl [108].

### **5.4 Der Einfluss von Brot- und Kaffeeextrakt auf die absolute Zellzahl unter verschiedenen Kulturbedingungen in WI-38-Fibroblasten**

Mit der vierten Fragestellung sollte geklärt werden, ob es zu Unterschieden der Zellzahl in Abhängigkeit der Zellkulturverhältnisse bei gleichem Versuchsaufbau kommt, was sich teilweise signifikant bestätigen lässt.

Der Nährstoffgehalt des Serums hat Einfluss darauf, ob sich Zellen teilen oder diese in hoher oder niedriger Konfluenz vorliegen. WI-38-Fibroblasten arretieren normalerweise unter Serummangel in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus [80]. Kälberserum enthält zusätzlich anti-apoptotische bioaktive Substanzen [109], die dies verhindern. Unter FCS-Entzug kam es hingegen bei Zugabe von Brotextrakt in unseren Versuchen zu einer Zellzahlvermehrung.

Wie bei der Inkubation mit Brotextrakt in hoher Dosis scheint hohe Konfluenz in Zusammenhang mit FCS unter Kaffeewirkung generell zu einer Verringerung der Zellzahl zu führen. Zytotoxizität hoher AGE-Konzentrationen und eine begrenzte Ausdehnung in den Kulturschalen führt eventuell zu einer Apoptose. Eine für das Wachstum der WI-38 notwendige „anchorage dependency“ [78, 79] wird vielleicht bei Konfluenz durch den begrenzten Platz in den Kulturschalen verhindert. Kaffee könnte diesen Prozess durch schädliche TAGEs oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion [101, 102, 103] zusätzlich beschleunigen.

Aufgrund der hohen Komplexität dieser Mechanismen konnte in der vorliegenden Arbeit keine zu favorisierende Zellbedingung spezifiziert werden.

### **5.5 Wechselwirkungen der Kinasen im Bezug zur Zellzahl**

Über die eigentliche Fragestellung dieser Dissertation hinaus wurde betrachtet, inwieweit es einen Zusammenhang zwischen dem Verhältnis der Aktivierung einzelner Kinasen und der Zellzahl gibt, da es in eukaryoten Zellen immer ein Zusammenspiel verschiedener Kinasen gibt.

#### **5.5.1 Die Wechselwirkungen der Stresskinase p38 und des Überlebenssignals Akt im Bezug zur Zellzahl**

Es lässt sich vermuten, dass das Verhältnis zwischen dem Überlebenssignal Phospho-Akt [85] und der stressinduzierten MAP-Kinase Phospho-p38 [47, 49] mit der Veränderung der Zellzahl humaner Lungenfibroblasten assoziiert sein könnte. Erstellt man ein Ratio pp38/pAkt, so zeigt sich unterhalb eines bestimmten Quotienten eine Vermehrung der WI-38-Fibroblasten. Oberhalb kommt es zu einem Überwiegen der Apoptose.

Bei der zusammenfassenden Betrachtung der Versuchsergebnisse wird deutlich, dass es mit zunehmender Akt-Aktivierung eher zu einem Überleben der Fibroblasten kommt. Dieser Zusammenhang lässt sich mit Ausnahme der konfluenten Zellen ohne Serum für alle Kulturbedingungen zeigen. So könnte die Fähigkeit einer Akt-Aktivierung überhaupt erst die Voraussetzung dazu sein, den Zelltod zu umgehen. Möglicherweise kommt es aber auch zu einer Downregulierung der Akt-Kinase im Gegenzug zu einer p38-Aktivierung. Ein Zusammenhang könnte darin bestehen, dass eine Verminderung der Akt-Aktivierung Zellen für oxidativen Stress empfindlicher machen kann

[110], was sich im Gegenzug in einer vermehrten Aktivierung der p38 unter dem Einfluss natürlicher AGEs zeigt.

Bei einer stärkeren Aktivierung der p38 sterben die WI-38 ab. Die p38 dürfte somit als Marker einer AGE-induzierten Apoptose gelten.

### **5.5.2 Die Wechselwirkung der Stresskinase p38 und des Proliferationssignals ERK1/2 im Bezug zur Zellzahl**

Betrachtet man kumulativ die Versuchsergebnisse (s. Kap. 4.5) dieser Arbeit, zeigt sich, dass das Verhältnis zwischen der p38- und der ERK1/2-Aktivierung ein Marker hinsichtlich der Zellverhaltens (Zellproliferation oder Absterben) ist.

Es stellt sich auch hier dar, dass bei erniedrigter Zellzahl eher eine p38-Aktivierung nachweisbar ist und bei erhöhter Zellzahl eher die antiapoptotisch wirkende und das Zellwachstum regulierende pERK1/2 [52, 53] gemessen werden kann. Betrachtet man die in Kap. 4.5 bestimmten Ratios, so ergibt sich ein pp38/pERK1/2-Quotient, unterhalb dessen eine Zellproliferation und darüber eine Apoptose überwiegen.

Weniger deutlich wird der Effekt bei den nicht-konfluenten Zellen mit FCS-Inkubation, wo eine niedrigere Zellzahl nicht zwingend mit einem hohen Phospho-p38/Phospho-ERK1/2-Quotienten einhergeht. So könnte die ERK1/2-Aktivierung hier im Gegensatz auch eine Apoptoseinduktion bedeuten, wie sie für neuronale und renale Epithelien beschrieben worden ist [56]. Eine gezielte ERK1/2-Inhibierung könnte hier aussagekräftige Ergebnisse liefern.

Insgesamt bestätigt sich erneut, dass Kaffee eher zytotoxisch und Brotextrakt eher proliferationsfördernd auf die WI-38 wirkt.

### **5.6 Relevanz der gewonnenen Ergebnisse für Forschung und Klinik**

Bestimmte Krankheiten wie zum Beispiel Diabetes mellitus [11] oder Nierenfunktionsstörungen [13] führen zu einer vermehrten AGE-Anreicherung im menschlichen Körper. Über AGE-reiche Nahrungsmittel (z.B. Kaffee und Brot) werden AGEs absorbiert, gelangen in die Blutzirkulation und werden teilweise mit dem Urin wieder ausgeschieden [98,111], zum Teil kommt es aber auch zur Ablagerung im Gewebe. Aus Experimenten mit Lungenfibroblasten junger Wistaratten weiss man, dass es unter AGE-reicher Diät zu einer intrazellulären Konzentrationszunahme kommt.

Einige Arbeitsgruppen bewiesen bereits eine profibrinogene Wirkung der AGEs in kardialem [112] und renalem Gewebe [113]. Die Experimente dieser Arbeit zeigen, dass durch AGE-reiche Nahrungsmittel eine Proliferation von Lungenfibroblasten *in vitro* ausgelöst werden kann. Möglicherweise kommt es so auch *in vivo* zu einer Organfibrosierung und AGEs könnten das Potential besitzen, fibrosierende Erkrankungen des Lungengewebes zu aggravierern. Es wird bereits eine Modulation der Akt-Kinase als therapeutische Option der Lungengefibrose diskutiert [114].

Da die AGE-Anreicherung im menschlichen Gewebe als eine Normvariante des Zellalters angesehen wird [11], können die Versuche mit den WI-38 zudem als Alterungsmodell für fötale Lungenfibroblasten verstanden werden.

Auf biochemischer Ebene konnte in humanen Lungenfibroblasten eine vermehrte p38-Phosphorylierung verbunden mit einem Absinken der Zellzahl gezeigt werden und lässt eine erhöhte Apoptoserate [33, 115, 116, 117] vermuten. Zum einen könnte sie in Zukunft Auskunft über das Fortschreiten degenerativer und AGE-induzierter Krankheiten geben, zum anderen in der Krebstherapie von Bindegewebstumoren den Erfolg einer gezielten zytotoxischen Therapie anzeigen. Weiterführende Experimente könnten hier Auskunft geben.

Eine mit der Zellvermehrung einhergehende ERK1/2- und Akt-Aktivierung könnte aussagekräftig für die Prognose und Aggressivität von Bindegewebstumoren sein und damit einen unabhängigen Prognosefaktor darstellen. Die immunhistochemische Detektion von pERK1/2 und pAkt lässt eventuell eine Identifikation von „high risk“-Patienten zu. Hingegen könnte eine Zellsensibilisierung für Apoptosemechanismen in Fibroblasten durch eine gezielte Inhibierung der pERK1/2 oder der pAkt zu einer erhöhten Radiosensibilität führen. Belka *et al.* (2004) beschrieben diese Möglichkeit in einer Studie [118].

Die in den Kapiteln 4.5 beschriebenen Ratios vermögen Auskunft darüber zu geben, inwieweit Zellen im Rahmen der Forschung oder einer Therapie auf externe Stimuli reagieren. So lassen sich eventuell Normwerte festlegen, die mit einer Proliferation bzw. mit einer Apoptose korrelieren.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass Zellen in Kultur oder im Gewebe sehr unterschiedlich reagieren und diese Normwerte zell- und gewebeabhängig festzulegen sind. Bei der Forschung mit Zellkulturen werden die Kulturbedingungen oft unberücksichtigt gelassen. Die Ergebnisse dieser Disertationsarbeit zeigen hingegen, wie wichtig die Berücksichtigung von Zelldichte, Kulturbedingungen und verwendeten Wachstumsmedien in der medizinischen Forschung sind.

### **5.7 Einschränkungen dieser Arbeit**

Bedingt durch die Versuchsanzahl von  $n = 3$  war nur eine begrenzte statistische Auswertung möglich.

Das Ziel dieser Arbeit war es, AGE-reiche Nahrungsmittel und ihre Wirkung auf Fibroblasten zu untersuchen. Da in den untersuchten Extrakten verschiedene AGEs enthalten sein können (z.B. Pronyl-Lysin, CML, etc.) [83, 91] ist eine Aussage hinsichtlich eines einzelnen AGEs nicht möglich. Untersuchungen von Hegele *et al.* (2009) weisen darauf hin, dass ROS wie  $H_2O_2$  im Kaffee ursächlich für seine zytotoxische Wirkung sind [104]. So bleibt unklar welche Substanz letztendlich in den vorliegenden Experimenten zu den gemessenen Effekten geführt hat.

Angaben wie das Molekulargewicht von Kaffeeextrakt oder Brotkruste sind nicht möglich, so dass die Konzentrationsangaben in mg/ml erfolgen mussten. Die wirklich endgültige Konzentration der

AGEs in den WI-38 Fibroblasten bleibt damit offen. Aus Experimenten mit über 10 Tagen diätisch ernährten Wistarratten weis man allerdings, dass unter AGE-Diät erhöhte AGE-Konzentrationen (zwischen 15-30 a. U.  $\times 10^{-3}$ ) im Lungengewebe der Tiere vorliegen [25]. Auch hierbei handelt es sich nur um Relativwerte. Somoza *et al.* (2005) analysierten über 6 Wochen mit Brotkruste diätisch behandelte Wistarratten und wiesen erhöhte AGE-Konzentrationen im Plasma der Tiere nach [5], so dass auch unter physiologischen Bedingungen von einer Gewebeanreicherung ausgegangen werden kann.

Ein Kritikpunkt, den alle Zellkulturexperimente gemeinsam haben, ist, dass die physiologischen Verhältnisse im menschlichen Körper nicht wiedergegeben werden können.

### 6 Zusammenfassung

AGEs sind mit einer Reihe degenerativer und entzündlicher Krankheiten assoziiert. In dieser Arbeit wurde der konzentrations- und zeitabhängige Einfluss AGE-haltiger Nahrungsextrakte (Brotkruste und Kaffee) auf die Aktivierung der intrazellulären Kinasen Akt, ERK1/2 und p38 in WI-38-Fibroblasten unter verschiedenen Zellkulturbedingungen (70 und 100 % Konfluenz, gehungerte und mit FCS inkubierte Zellen) untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass Brotkruste und Kaffeeextrakt konzentrations- und zeitabhängig eine rasche Kinasenaktivierung der Akt-, ERK1/2- und p38-Kinase hervorrufen. Eine im Mittel stärkere p38-Phosphorylierung durch Kaffeeextrakt im Vergleich zu Brotkruste spiegelt den stärkeren zytotoxischen Effekt zudem wieder. Die Kinasenphosphorylierungen sind dabei abhängig von den Zellkulturbedingungen.

Beim Vergleich der Zellkulturbedingungen zeigen sich zum Teil signifikante Unterschiede der Versuchsergebnisse bei ansonsten unverändertem Versuchsaufbau, was für die Forschung mit Zellkulturen und die anschließende Ergebnisinterpretation von erheblicher Bedeutung ist und häufig unzureichend Beachtung findet.

Zellzahlversuche erbrachten, dass AGE-reiche Nahrungsextrakte auf WI-38-Fibroblasten bis zu einem Dosisbereich von 30 mg/ml (Brot) und 0,3-1 mg/ml (Kaffee) die Zellzahl vermehrend wirken, wobei v.a. Kaffee im höheren Dosisbereich zytotoxisch wirkt. Es bleibt jedoch unklar, welche Wirksubstanzen hierfür verantwortlich sind.

Überträgt man die gemessenen Kinasenaktivierungen auf die Zellzahl, so zeigt sich, dass ein kleiner Phospho-p38/Phospho-Akt-Quotient sowie ein kleiner Phospho-p38/Phospho-ERK12-Quotient gute Vorhersagekraft für Zellüberleben und Proliferation von WI-38-Fibroblasten haben.

Klinische Relevanz könnten diese Quotienten hinsichtlich des Proliferationsverhaltens von Bindegewebstumoren haben. So lassen sich eventuell gewebe- und zellspezifische Normwerte festlegen, bei denen eine Proliferation oder ein Zellüberleben einer Apoptose überlegen ist. Diese könnten aussagekräftig über den Erfolg oder Misserfolg einer Tumorthherapie haben.

## 7 Literatur

1. Bucala R, Makita Z, Vega G, Grundy S, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H (1994) Modification of low density lipoprotein by advanced glycation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc Natl Acad Sci* 91:9441-9445.
2. Webster J, Wilke M, Stahl P, Kientsch-Engel R, Münch G (2005) Maillardprodukte aus Lebensmitteln als pro-entzündliche und pro-arteriosklerotische Faktoren bei degenerativen Erkrankungen. *Z Gerontol Geriat* 38:347-353.
3. Thornally PJ (1996) Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification - a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen Pharmacol* 27:565-573.
4. Faist V, Ebersdorfer HF (2001) Metabolic transit and „in vivo“ effects of melanoidins and precursor compounds deriving from the Maillard reaction. *Ann Nutr Metab* 45:1-12.
5. Somoza V (2005) Five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products: an update. *Mol Nutr Food Res* 49:663-672.
6. Vlassara H, Chai W, Crandall J, Goldberg T, Oberstein R, Dardaine V, Peppas M, Rayfield EJ (2002) Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:15596-15601.
7. Tauer A, Knerr T, Niwa T, Schaub TP, Lage C, Passlick-Deetjen J, Pischetsrieder M (2001) In vitro formation of N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine and imidazolones under conditions similar to continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Biochem Biophys Res Commun* 280:1408-1414.
8. Hasenkopf K, Ubel B, Bordiehn T, Pischetsrieder M (2001) Determination of the Maillard product oxalic acidmonolysinylamide (OMA) in heated milk products by ELISA. *Nahrung/Food* 45:206-209.
9. Henle T, Schwarzenbolz U, Klostermeyer H (1997) Detection and quantification of pentosidine in foods. *Z Lebensm Unters F.A* 204:95-98.
10. Sjöberg JS, Bulterijs S (2009) Characteristics, formation, and pathophysiology of glucosepane: a major protein cross-link. *Rejuvenation Res* 12:137-148.
11. Baynes JW (2001) The role of AGEs in aging: causation or correlation. *Exp Gerontol* 36:1527-1537.
12. Vlassara H, Palace MR (2002) Diabetes and advanced glycation end products. *J Intern Med* 251:87-101.

13. Dawnay A, Millar DJ (1998) The pathogenesis and consequences of AGE formation in uraemia and its treatment. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 44:1081-1094.
14. Hein GE (2006) Glycation endproducts in osteoporosis - is there a pathophysiologic importance? *Clin Chim Acta* 371:32-36.
15. Verzijl N, DeGroot J, Thorpe SR, Bank RA, Shaw JN, Lyons TJ, Bijlsma JW, Lafeber FP, Baynes JW, Tekoppele JM (2000) Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *J Biol Chem* 275:39027-39031.
16. Verzijl N, DeGroot J, Ben ZC, Brau-Benjamin O, Maroudas A, Bank RA, Mizrahi J, Schalkwijk CG, Thorpe SR, Baynes JW, Bijlsma JW, Lafeber FP, TeKoppele JM (2002) Crosslinking by advanced glycation end products increases the stiffness of the collagen network in human articular cartilage: a possible mechanism through which age is a risk factor for osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 46:114-123.
17. Chen AC, Temple MM, Ng DM, Verzijl N, DeGroot J, TeKoppele JM, Sah RL (2002) Induction of advanced glycation end products and alterations of the tensile properties of articular cartilage. *Arthritis Rheum* 46:3212-3217.
18. Münch G, Thome J, Foley P, Schinzel R, Riederer P (1997) AGEs in ageing and Alzheimer's disease. *Brain Res Rev* 23:134-143.
19. Taguchi A (2009) Vascular factors in diabetes and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 16:859-864.
20. Zheng F, He C, Cai W, Hattori M, Steffes M, Vlassara H (2002) Prevention of diabetic nephropathy in mice by a diet low in glycoxidation products. *Diabetes Metab Res Rev* 18:224-237.
21. Dukic-Stefanovic S, Schinzel R, Riederer P, Münch G (2001) AGEs in brain ageing: AGE-inhibitors as neuroprotective and anti-dementia drugs? *Biogerontology* 2:19-34.
22. Gasic-Milenkovic J, Dukic-Stefanovic S, Deuther-Conrad W, Gartner U, Münch G (2003) Beta-amyloid peptide potentiates inflammatory responses induced by lipopolysaccharide, interferon-gamma and AGEs in a murine microglia cell line. *Eur J Neurosci* 17:813-821.
23. Neumann A, Schinzel R, Palm D, Riederer P, Münch G (1999) High molecular weight hyaluronic acid inhibits advanced glycation endproduct-induced NF-kappaB activation and cytokine expression. *FEBS Letters* 453:283-287.
24. Hofmann SM, Dong HJ, Li Z, Cai W, Altomonte J, Thung SN, Zeng F, Fisher EA, Vlassara H (2002) Improved insulin sensitivity is associated with restricted intake of dietary glycoxidation products in the db/db mouse. *Diabetes* 51:2082-2089.

25. Bartling B, Fuchs C, Somoza V, Niemann B, Silber RE, Simm A (2007) Lung level of HMBG1 is elevated in response to advanced glycation end product-enriched food „in vivo“. *Mol Nutr Food Res* 51:479-487.
26. Neeper M, Schmidt AM, Brett Y, Yan SD, Wang F, Pan YC, Elliston K, Stern D, Shaw A (1992) Cloning and expression of RAGE: a cell surface receptor for advanced glycation end products of proteins. *J Biol Chem* 267:14998-15004.
27. Queisser MA, Kouri FM, Königshoff M, Wygrecka M, Schubert U, Eickelberg O, Preissner KT (2008) Loss of RAGE in pulmonary fibrosis: molecular relations to functional changes in pulmonary cell types. *Am J Respir Cell Mol Biol* 39:337-345.
28. Kislinger T, Fu C, Huber B, Qu W, Taguchi A, Du Yan S, Hofmann M, Yan SF, Pischetsrieder M, Stern D, Schmidt AM (1999) N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *J Biol Chem* 274:31740-31749 .
29. Hofmann M, Drury S, Caifeng F, Qu W, Lu Y, Avila C, Kambhan N, Slattery T, McClary J, Nagashima M, Moser J, Stern D, Schmidt AM (1999) RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 97:889-901.
30. Miyata T, Hori O, Zhang J, Yan SD, Ferran L, Iida Y, Schmidt AM (1996) The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a central mediator of the interaction of AGE-beta2microglobulin with human mononuclear phagocytes via an oxidant-sensitive pathway. Implications for the pathogenesis of dialysis-related amyloidosis. *J Clin Invest* 98:1088-1094.
31. Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern DM (1999) Activation of receptor for AGEs: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vacuolopathy and atherosclerosis. *Circ Res* 84:489-497.
32. Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM (2000) The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. *Biochim Biophys Acta* 1498:99-111.
33. Sano H, Nagai R, Matsumoto K, Horiuchi S (1999) Receptors for proteins modified by advanced glycation end products (AGE) - their functional role in atherosclerosis. *Mech Ageing Dev* 107:333-346 (review) .
34. Horiuchi S, Sakamoto Y, Sakai M (2003) Scavenger receptors for oxidized and glycated proteins. *Amino Acids* 25:283-292.
35. De Vries-Seimon T, Li Y, Yao PM, Stone E, Wang Y, Davis RJ, Flavell R, Tabas I (2005) Cholesterol-induced macrophage apoptosis requires ER stress pathways and engagement of type A scavenger receptor. *J Cell Biol* 171:61-73.

36. Lander HM, Tauras JM, Ogiste JS, Hori O, Moss RA, Schmidt AM (1997) Activation of the receptor for AGEs triggers a p21ras dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. *J Biol Chem* 272:17810-17814.
37. Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W, Tanji N, Lu Y, Lalla E, Fu C, Hofmann MA, Kislinger T, Ingram M, Lu A, Tanaka H, Hori O, Ogawa S, Stern DM, Schmidt AM (2000) Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumor growth and metastases. *Nature* 405:354-360.
38. Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D (1994) Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of AGEs with their receptors/ binding proteins. *J Biol Chem* 269:9889-9897.
39. Yeh CH, Sturgis L, Haidacher J, Zhang XN, Sherwood RJ, Blercke RJ, Juhasz O, Crow MT, Tilton RG, Denner L (2001) Requirement for p38 and p44/42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor- $\kappa$ B transcriptional activation and cytokine secretion. *Diabetes* 50:1495-1504.
40. Herskowitz I (1995) MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell* 80:187-197
41. Kyriakis JM, Avurch J (1996) Sounding the alarm: protein kinase cascaded activated by stress and inflammation. *J Biol Chem* 271:24313-24316.
42. Marshall CJ (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signalling: transient versus sustained extracellular signal regulated kinase activation. *Cell* 80:179-185.
43. Blüthgen N, Legewie S (2008) Systems analysis of MAPK signal transduction. *Essays Biochem* 45:95-107.
44. Zill H, Günther R, Erbersdobler HF, Fölsch UR, Faist V (2001) RAGE expression and AGE-induced MAP kinase activation in caco-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 288:1108-1111.
45. Zill H, Beck S, Hofmann T, Huber J, Frank O, Lindenmeier M, Weigle B, Ebersdobler HF, Scheidler S, Busch AE, Faist V (2003) RAGE-mediated MAPK activation by food-derived AGE and non-AGE. *Biochem Biophys Res Commun* 300:311-315.
46. Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ (1994) A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265:808-811.
47. New L, Han J (1998) The p38 MAP Kinase pathway and its biological function. *Trends Cardiovasc Med* 8:220-229.
48. Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heyes JR, Landvatter SW, Strickler JE, McLaughlin MM, Siemens IR, Fisher SM,

- Livi GP, White JR, Adams JL, Young P (1994) A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 273:739-746.
49. Schwenger P, Bellosta P, Vietor I, Basilico C, Skolnik EY, Vilcek J (1997) Sodium salicylate induces apoptosis via p38 mitogen-activated protein kinase but inhibits tumor necrosis factor-induced c-Jun terminal kinase/stress-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2869-2873.
50. Lépiciér P, Bibeau-Poirier A, Lagneux C, Servant MJ, Lamontagne D (2006) Signaling pathways involved in the cardioprotective effects of cannabinoids. *J Pharmacol Sci* 102:155-166.
51. Wei S, Siegal GP (2007) p38 MAPK as a potential therapeutic target for inflammatory osteolysis. *Adv Anat Pathol* 14:42-45.
52. Fang JY, Richardson BC (2005) The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol* 6:322-327.
53. Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG (1998) Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 74:49-139.
54. Werry TD, Christopoulos A, Sexton PM (2006) Mechanisms of ERK1/2 regulation by seven-transmembrane-domain receptors. *Curr Pharm Des* 12:1683-1702.
55. Yen A, Roberson MS, Varvayanis S, Lee AT (1998) Retinoic acid induced mitogen-activated protein (MAP) extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase-dependent MAP kinase activation needed to elicit HL-60 cell differentiation and growth arrest. *Cancer Res* 58:3163-3172.
56. Zhuang S, Schnellmann RG (2006) A death-promoting role for the extracellular signal-regulated kinase. *J Pharmacol Exp Ther* 319:991-997.
57. Papakrivopoulou J, Lindahl GE, Bishop JE, Laurent J (2004) Differential roles of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38<sup>MAPK</sup> in mechanical load-induced procollagen  $\alpha 1$  (I) gene expression in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 61:736-744.
58. Simm A, Münch G, Seif F, Schenk O, Heidland A, Richter H, Vamvakas S, Schinzel R (1997) AGEs stimulate the MAP-kinase pathway in tubulus cell line LLC-PK1. *FEBS Letters* 410:481-484.
59. Manning BD, Cantley LC (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129:1261-1274.
60. Miyamoto S, Murphy AN, Brown JH (2009) Akt mediated mitochondrial protection in the heart: metabolic and survival pathways to the rescue. *J Bioenerg Biomembr* 41:169-180.

61. Vanhaesebroeck B, Alessi DR (2000) The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 346:561-576.
62. Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJC, Frech M, Cron P, Cohen P, Lucocq JM, Hemmings BA (1997) Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem* 272:31515-31524.
63. Hajduch E, Litherland GJ, Hundal HS (2001) Protein kinase B (PKB/Akt) - a key regulator of glucose transport? *FFBS Letters* 492:199-203.
64. Alberts B, Bray D, Lewis J: *Molecular Biology of the Cell*. 4. Aufl. Taylor and Francis, London, 2002, pp. 1300- 1308.
65. Shiojima I, Walsh K (2006) Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the AktPKB signalling pathway. *Genes Dev* 24:3347-3365.
66. Kreisberg JI, Malik SN, Prihoda TJ, Bedolla RG, Troyer DA, Kreisberg S, Ghosh PM (2004) Phosphorylation of Akt (Ser<sup>473</sup>) is an excellent predictor of poor clinical outcome in prostate cancer. *Cancer Res* 64:5232-5236.
67. Vasko V, Saji M, Hardy E, Kruhlak M, Larin A, Savchenko V, Miyakawa M, Isozaki O, Murakami H, Tsushima T, Burman KD, De Micco C, Ringel MD (2004) Akt activation and localisation correlate with tumour invasion and oncogene expression in thyroid cancer. *J Med Genet* 41:161-170.
68. Shinohara M, Chung YJ, Saji M, Ringel MD (2007) Akt in thyroid tumorigenesis and progression. *Endocrinology* 148:942-947.
69. Charollais RH, Tiwari S, Thomas NSB (1994) Into and out of G1: The control of cell proliferation. *Biochimie* 76:887-894.
70. Cross F, Roberts J, Weintraub H (1989) Simple and complex cell cycles. *Annu Rev Cell Biol* 5:341-396.
71. Hesketh R: *The Oncogene Handbook*. 2. Aufl. Academic Press Limited, London, 1995, pp. 352-361.
72. Korvary K, Bravo R (1991) The jun and fos families are both required for cell cycle progression in fibroblasts. *Mol Cell Biol* 11:4466-4472.
73. Korvary K, Bravo R (1992) Existence of different fos/jun complexes during the G0-to-G1 transition and during exponential growth in mouse fibroblasts: Differential role of fos proteins. *Mol Cell Biol* 12:5015-5023.
74. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, Fauci AS (1986) Transforming growth factor type  $\beta$ : Rapid induc-

- tion of fibrosis and angiogenesis „in vivo“ and stimulation of collagen formation „in vitro“. Proc Natl Acad Sci 83:4167-4171.
75. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC: Biochemie and Pathobiochemie. 8. Aufl. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2007, S 219-241.
  76. Li JM, Brooks G (1999) Cell cycle regulatory molecules (cyclines, cyclin-dependent kinases and cyclin-dependent kinase inhibitors) and the cardiovascular system. Eur Heart J 20:406-420.
  77. Cotter TG (2009) Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. Nat Rev Cancer 9:501-507.
  78. Hayflick L, Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp Cell Res 25:585-621.
  79. Hayflick L (1965) The limited „in vitro“ lifetime of human diploid cell strains. Exp Cell Res 37:614-636.
  80. Faßhauer M: Einfluß der Organisation des Mikrofilamentsystems auf die Synthese von Proto-Onkogen-Proteinen und Cyclinen. Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss.(1998).
  81. Grana X, Reddy EP (1995) Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). Oncogene 11:211-219.
  82. Iwig M, Czeslick E, Müller A, Gruner M, Spindler M, Glaesser D (1995) Growth regulation by cell shape alteration and organization of cytoskeleton. Eur J Cell Biol 67:145-157.
  83. Lindenmeier M, Faist V, Hofmann T (2002) Structural and functional characterization of pronyl-lysine, a novel protein modification in bread crust melanoidins showing „in vitro“ antioxidative and phase I/II enzyme modulating activity. J Agric Food Chem 50:6997-7006.
  84. Alikhani M, Maclellan CM, Raptis M, Vora S, Trackman PC, Graves DT (2007) Advanced glycation end products induce apoptosis in fibroblasts through activation of ROS, MAP kinases, and the FOXO1 transcription factor. Am J Cell Physiol 292:850-856.
  85. Song G, Ouyang G, Bao S (2005) The activation of Akt/PKB signalling pathway and cell survival. J Cell Mol 9:59-71.
  86. Oh SH, Lim SC (2009) Endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy/apoptosis induced by capsaicin (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide) and dihydrocapsaicin is regulated by the extent of c-Jun NH2-terminal kinase/extracellular signal-regulated kinase activation in WI38 lung epithelial fibroblast cells. J Phramacol Exp Ther 329:112-122.

87. Cantarelli B, Duca L, Blanchevoye C, Poitevin S, Martiny L, Debelle L (2009) Elastin peptides antagonize ceramide-induced apoptosis. *FFBS Lett* 583:2385-2391.
88. Biswas SK, Zhao Y, Sandirasegarane L (2009) Imatinib induces apoptosis by inhibiting PDGF- but not insulin-induced PI 3-kinase/Akt survival signaling in RGC-5 retinal ganglion cells. *Mol Vis* 15:1599-1610.
89. Kapitonov D, Allegood JC, Mitchell C, Hait NC, Almenara JA, Adams JK, Zipkin RE, Dent P, Kordula T, Milstien S, Spiegel S (2009) Targeting sphingosine kinase 1 inhibits Akt signaling, induces apoptosis, and suppresses growth of human glioblastoma cells and xenografts. *Cancer Res* 69:6915-6923.
90. Yao R, Cooper GM (1995) Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 267:2003-2006.
91. Ruhs S, Nass N, Somoza V, Friess U, Schinzel R, Silber RE, Simm A (2007) Maillard reaction products enriched food extract reduce the expression of myofibroblast phenotype markers. *Mol Nutr Food Res* 51:488-495.
92. Muscat S, Pelka J, Hegele J, Weigle B, Münch G, Pischetsrieder M (2007) Coffee and Maillard products activate NF-kappaB in macrophages via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. *Mol Nutr Food Res* 51:525-535.
93. Park W, Chang MS, Kim H, Choi HY, Yang WM, Kim do R, Park EH, Park SK (2008) Cytotoxic effect of gallic acid on testicular cell lines with increase H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level in GC-1 spg cells. *Toxicol In Vitro* 22:159-163.
94. Ravelojaona V, Péterszegi G, Molinari J, Gesztesi JL, Robert L (2007) Demonstration of the cytotoxic effect of advanced glycation endproducts (AGEs). *J Soc Biol* 201:185-188.
95. Kang AK, Lee KH, Zhang R, Piao M, Chae S, Kim KN, Jeon JJ, Park DB, You HJ, Kim J S, Hyun JW (2006) Caffeic acid protects hydrogen peroxide induced cell damage in WI-38 human lung fibroblast cells. *Biol. Pharm. Bull* 29:1820-1824.
96. Guijarro MV, Link W, Rosado A, Leal JF, Carnero A (2007) MAP17 inhibits Myc-induced apoptosis through PI3K/AKT pathway activation. *Carcinogenesis* 28:2443-2450.
97. Somoza V, Lindenmeier M, Wenzel E, Frank O, Ebersdobler HF, Hofmann T (2003) Activity-guided identification of a chemopreventive compound in coffee beverage using „in vitro“ and „in vivo“ techniques. *J Agric Food Chem* 51:6861-6869.
98. Somoza V, Wenzel E, Weiß C, Clawin-Rädecker I, Grübel N, Ebersdobler F (2006) Dose-dependent utilisation of casein-linked lysinoalanine, N(epsilon)-fructoselysine and N(epsilon)-carboxy-methyllysine in rats. *Mol Nutr Food Res* 50:833-841.

99. Zhang H, Xiaoqing S, Hampong M, Blanis L, Pelech S (2001) Stress-induced inhibition of ERK1 and ERK2 by direct interaction with p38 MAP kinase. *J Biol Chem* 276:6905-6908.
100. Somoza V, Lindenmeier M, Hofmann T, Frank O, Erbersdobler HF, Baynes JW, Thorpe SR, Heidland A, Zill H, Bek S, Hubetz J, Weigle T, Scheidler S, Busch AE, Sebekova K (2005) Dietary bread crust advanced glycation end products bind to the receptor for AGEs in HEK-293 kidney cells but are rapidly excreted after oral administration to healthy and subtotaly nephrectomized rats. *Ann N Y Acad Sci* 1043:492-500.
101. Sato T, Shimogaito N, Wu X, Kikuchi S, Yamagishi S, Takeuchi M (2006) Toxic advanced glycation end products (TAGE) theory in Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 21:197-208.
102. Takeuchi M, Yamagishi S (2009) Involvement of Toxic AGEs (TAGE) in the pathogenesis of diabetic vascular complications and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 16:845-858.
103. Van Nguyen C (2006) Toxicity of the AGEs generated from the Maillard reaction: On the relationship of food-AGEs and biological AGEs. *Mol Nutr Food Res* 50:1140-1149.
104. Hegele J, Münch G, Pischetsrieder M (2009) Identification of hydrogen peroxide as a major cytotoxic component in Maillard reaction mixtures and coffee. *Mol Nutr Food Res* 53:760-769.
105. Wiesner RJ, Schutz S, Thschanck G, Thomas H, Dienes HP, Oesch F (1990) Isolation and characterization of a 60-70kD plasma membrane glycoprotein involved in the contact-dependent inhibition of growth. *J Cell Biol* 111:2681-2692.
106. Vinals F, Pouysségur J (1999) Confluence of vascular endothelial cells induces cell exit by inhibiting p42/p44 mitogen-activated protein kinase activity. *Mol Cell Biol* 19:2763-2772.
107. Schmidt A, Kuhla B, Bigl K, Münch G, Arendt T (2007) Cell cycle related signalling in neuro2a cells proceeds via the receptor for advanced glycation end products 114:1413-1424.
108. Muscat S, Pischetsrieder M, Maczurek A, Rothmund S, Münch G (2009) Cytotoxicity of maillard reaction products with a peptid spot library. *Mol Nutr Food Res* 53:1019-1029.
109. Skarzynski DJ, Shibaya M, Tasaki Y, Korzewka A, Murakami S, Woclawek-Potocka I, Majewska M, Okuda K (2007) Fas-mediated apoptosis is suppressed by calf serum in cultured bovine luteal cells. *Reprod Biol* 7:3-15.
110. Yoon SO, Yun CH, Chung AS (2002) Dose effect of oxidative stress on signal transduction in aging. *Mech Ageing Dev* 123:1597-1604.
111. Gawlowski T, Stratmann B, Ruetter R, Buenting CE, Menart B, Weiss J, Vlassara H, Koschinsky T, Tschoepe D (2009) Advanced glycation end products strongly activate platelets. *Eur J Nutr* 48:475-481.

112. Aragno M, Mastrocola R, Alloatti G, Vercellinato I, Bardini P, Geuna S, Catalano MG, Danni O, Boccuzzi G (2008) Oxidative Stress Triggers Cardiac Fibrosis in th Heart of Diabetic Rats. *Endocrinology* 149:380-388.
113. Bohlender JM, Franke S, Stein G, Wolf G (2005) Advanced glycation end products and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 289:645-659.
114. Garneau-Tsodikova S, Thannickal VJ (2008) Protein kinase inhibitors in the treatment of pulmonary fibrosis. *Curr Med Chem* 15:2632-2640.
115. Chuang PY, Yu Q, Fang W, Uribarri J, He JC (2007) Advanced glycation endproducts induce podocyte apoptosis by activation of the FOXO4 transcription factor. *Kidney Int* 72:965-976.
116. Münch G, Gasic-Milencovic J, Arendt T (2003) Effect of advanced glycation endproducts on cell cycle and their relevance for Alzheimer´s disease. *J Neural Transm Suppl* 65:63-71.
117. Yamagishi S, Nakamura K, Matsui T (2009) Regulation of advanced glycation end product (AGE)-receptor (RAGE) system by PPAR-gamma agonists and its implication in cardiovascular disease. *Pharmacol Res* 60:174-178.
118. Belka C, Jendrossek V, Pruschy M, Vink S, Veheij M, Budach W (2004) Apoptosis-modulating agents in combination with radiotherapy-current status and outlook. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58:542-554.

## 8 Thesen

1. Ziel der Arbeit war es die Wirkung AGE-reicher Nahrungsmittel auf intrazelluläre Signalkaskaden in humanen Lungenfibroblasten zu untersuchen
2. AGEs akkumulieren in Gewebe mit dem Altern unter physiologischen Bedingungen, können aber auch vermehrt über die Nahrung aufgenommen werden und können zu degenerativen Erkrankungen führen
3. Analysiert wurden eine Aktivierung der „Überlebenskinase“ (Akt), der „Stresskinase“ (p38) und des Proliferationswegs (ERK1/2) mittels Western-Blot
4. Brotkruste- und Kaffeeextrakt stimulieren konzentrations- und zeitabhängig die Akt-, p38<sup>MAPK</sup>- und ERK1/2<sup>MAPK</sup>-Kinasen in WI-38 Fibroblasten (kurzfristige Analyse)
5. Zellzuchtbedingungen finden nur unzureichend Beachtung in der medizinischen Forschung
6. Die Versuchsergebnisse variieren mit den Zellzuchtbedingungen zum Teil signifikant voneinander (FCS-haltiges versus FCS-freies Medium, konfluent versus subkonfluent)
7. Keine Zellzuchtbedingung konnte als favorisierend herausgestellt werden
8. Kaffeeextrakt führt eher zu einer Aktivierung des Apoptoseweges (p38) mit einer Verminderung der absoluten Zellzahl, während Brotextrakt eher eine Zellzahlvermehrung bewirkt (langfristige Ergebnisse)
9. Der Quotient pp38/pAkt ist ein guter Prädiktor hinsichtlich des Zellüberlebens
10. Eine hohe p38-Phosphorylierung verbunden mit einer niedrigen Akt-Phosphorylierung ist bezeichnend für eine hohe Zytotoxizität
11. Eine Modulation der untersuchten Kinasen können eventuell eine therapeutische Option bestimmter degenerativer Krankheiten bieten

## **9 Lebenslauf**

### **Kristian Weißenberg**

Geboren am 29.06.1979 in Minden (Westf.)

Deutsch

Ledig

### **Ausbildung**

|                     |   |
|---------------------|---|
| 1989 - 1998         | Herder Gymnasium Minden: Abschluss Abitur   |
| 1998 - 1999         | Zivildienst und Ausbildung als Rettungssanitäter bei der Feuer- und Rettungswache der Stadt Minden  |
| 1999 - 2001         | Studium der Humanmedizin<br>Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  |
| Herbst 2001         | Ärztliche Vorprüfung<br>Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  |
| 2001 - 2002         | Studium der Humanmedizin<br>Facultat de Medicina i Odontologia<br>Universitat de Valencia, Spanien<br>(Stipendiat ERASMUS-Programm)   |
| 2002 - 2006         | Studium der Humanmedizin<br>Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  |
| Frühjahr 2003       | 1. Teil des Staatsexamens der Humanmedizin<br>Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  |
| Frühjahr 2005       | 2. Teil des Staatsexamens der Humanmedizin<br>Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  |
| 04/ 2005 - 11/ 2005 | Praktisches Jahr Akademisches Lehrkrankenhaus Carl-v.-Basedow-Klinikum, Merseburg: Anästhesie und Innere Medizin  |
| 11/ 2005 - 03/ 2006 | Auslandstertial in der Chirurgie, University of the Free State, Bloemfontein, Südafrika (Abteilungen für Traumatologie, Orthopädie, Allgemeinchirurgie, Schwerstverbranntenzentrum) |
| 06/ 2006            | 3. Teil des Staatsexamen der Humanmedizin<br>Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und Approbation   |

### **Beruf**

|  |   |
|--|---|
| 07/ 2006 – 11/ 2009<br>und<br>01/ 2010 - heute | Assistenzarzt in der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie<br>Städtisches Klinikum Dessau, Chefarzt Dr. med. J. Zagrodnick                                |
| 12/ 2009 – 01/ 2010                            | Assistenzarzt in der Klinik für Unfall-, Wiederherstellungs- und Plastische Chirurgie, Universitätsklinikum Leipzig,<br>Chefarzt Professor Dr. med. C. Josten |

## **Danksagung**

Hiermit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Andreas Simm und Herrn Prof. Dr. med. Ralf-Edgar Silber für ihre Bemühungen bedanken, die mir die Arbeit an der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie ermöglicht haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Andreas Simm für die Überlassung des Themas, seine ausgezeichnete Betreuung während der Erstellung dieser Dissertation und für das sorgfältige Heranführen an die Problematik dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Frau Renate Donath für die geduldige Einführung in die Methodik der Zellkultivierung, Frau Corinna Giersberg, die mir die Technik des Western Blots näher gebracht hat und bei Frau Thekla Wangemann für die Geduld und Hilfe bei der Durchführung der Zellzählexperimente.

Ein aufrichtiges Dankeschön gilt auch Frau Dr. rer. nat. Stefanie Ruhs, Herrn Dr. rer. nat. Torsten Gursinsky, Herrn Dr. rer. nat. Norbert Nass, Frau Dr. rer. nat. Babett Bartling sowie allen anderen, die an dieser Arbeit mitgewirkt haben, für die freundliche Unterstützung und gute Zusammenarbeit.

Für die kritische Durchsicht und textlichen Korrekturen möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dipl.-Psych. Hedwig Schmidinger, Herrn Dr. med. Wolfgang Weißenberg und Frau Sarah Weißenberg bedanken.

## **Erklärung**

### **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selber angefertigt habe, und versichere, dass ich keine anderen als die von mir angegebenen Quellen benutzt habe.

### **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Hiermit erkläre ich, dass ich keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.