

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor Prof. Dr. Guido Posern)

Der Einfluss von Glykierung auf Neuroblastomzellen

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

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

von Maximilian Scheer
geboren am 18.06.1989 in Prenzlau

Betreuer: Prof. Dr. Rüdiger Horstkorte
Gutachter: 1. Prof. Dr. Rüdiger Horstkorte
2. Prof. Dr. Christian Strauß
3. PD Dr. Martina Mühlenhoff (MH Hannover)

12.07.2016

20.02.2017

Referat:

Hohe Glukosespiegel wie sie beim Diabetes mellitus auftreten begünstigen die Glykierung von Proteinen und führen zur Bildung von *Advanced Glycation Endproducts* (AGEs). Diese AGEs beschleunigen Alterungsprozesse und stehen in Verbindung mit mikro- und makrovaskulären Komplikationen sowie neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und der Amytrophen Lateralsklerose. Viele Effekte geschehen rezeptorabhängig, wobei der *Receptor for Advanced Glycation Endproducts* (RAGE) als einer der wichtigsten Interaktionspartner für AGEs gilt.

Der Einfluss von Glykierung auf Neuroblastomzellen war Gegenstand dieser Arbeit. Es kam durch Behandlung mit Methylglyoxal (MGO), dem potentesten AGE-Bildner zur Bildung von AGEs, was im Western Blot via Bildung von Carboxymethyllysin (CML) registriert werden konnte. Es zeigte sich, dass eine Behandlung mit MGO keinen Einfluss auf die Zellviabilität hat. Weiterhin konnte durch Glykierung eine gesteigerte Expression von RAGE festgestellt werden. Sowohl für CML als auch für RAGE waren nach Glykierung spezifische Signale in der Durchflusszytometrie ersichtlich. Eine Untersuchung via impedanzbasierter Echtzeitanalyse (RTCA) zeigte eine Reduktion der Adhäsion von Neuroblastomzellen auf glykiertem Laminin. Eine Glykierung von Kollagen IV und Fibronectin führte hingegen zu keiner signifikanten Änderung der Adhäsion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Des Weiteren führte eine Glykierung der Zellen zu einer signifikanten Erhöhung der Migration, welche ebenfalls via impedanzbasierter Echtzeitanalyse untersucht wurde.

Zusammenfassend führte die Glykierung mit MGO zur AGE-Bildung, welche über eine positive Rückkopplung eine Steigerung der RAGE-Expression bewirkte. Es kam zu einer Reduktion der Adhäsion sowie zu einer Steigerung der Migration, was für ein stärkeres Metastasierungspotential des Tumors spricht. Die Ergebnisse unterstreichen, im Einklang mit anderen Forschungsergebnissen, die pathologische Rolle von AGEs und RAGE bei der Tumorbilogie. Dabei könnte zukünftig RAGE sowohl prognostisch als auch therapeutisch relevant werden.

1	Einleitung	1
1.1	Neuroblastom.....	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Geschichtlicher Hintergrund.....	1
1.1.3	Epidemiologie	2
1.1.4	Klinisches Bild	2
1.1.4	Diagnostik	3
1.1.5	Stadien	4
1.1.6.	Genetik.....	5
1.1.7.	Prognose	5
1.1.8.	Behandlung.....	6
1.2.	Glykierung.....	6
1.2.1	Exogene Glykierung	6
1.2.2	Endogene Glykierung.....	7
1.3	Advanced Glycation Endproducts.....	7
1.3.1	Die Rolle von Methylglyoxal bei der Bildung von AGEs	8
1.3.2	Pathologie und AGE-vermittelte Effekte	9
1.3.3	Clearance	10
1.3.4	Therapeutische Ansätze.....	11
1.3.5	Rezeptoren für AGEs.....	12
1.4	Rezeptor für Advanced Glycation Endproducts (RAGE)	12
1.4.1	Signaltransduktion	14
1.5	Beziehung zwischen Zelle und Extrazellulärmatrix.....	15
1.6	Basalmembran.....	16
1.6.1	Aufgaben der Basalmembran	16
1.6.2	Molekularer Aufbau der Basalmembran	17
1.6.3	Laminin	17
1.6.4	Kollagen IV	18
1.6.5	Fibronectin.....	18
2	Zielstellung	20
3	Material und Methoden	21
3.1	Material	21
3.1.1	Chemikalien	21

3.1.2	Zellkulturmaterialien	21
3.1.3	Organismen.....	21
3.1.4	Glykierungsreagenz	22
3.1.5	Materialien für MTT-Test.....	22
3.1.6	Antikörper.....	23
3.1.7	Größenmarker	24
3.1.8	Inhibitoren	24
3.1.9	Medien.....	24
3.1.10	Adhäsionsproteine.....	25
3.1.11	Medienzusätze.....	25
3.1.12	Membranen	25
3.1.13	Lösungen und Puffer.....	25
3.1.15	Geräte	28
3.1.16	Arbeits- und Hilfsmaterialien.....	28
3.2	Methoden	30
3.2.1	Behandlung von Geräten und Lösungen	30
3.2.2	Allgemeine zellbiologische Methoden.....	30
3.2.3	Kultivieren und Passagieren von eukaryotischen Zellen	30
3.2.4	Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	31
3.2.5	Mikroskopie der Zellen	31
3.2.6	Zellzahlbestimmung.....	31
3.2.7	Glykierung.....	32
3.2.8	MTT-Test.....	32
3.2.9	Durchflusszytometrie.....	33
3.2.10	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	34
3.2.11	Western Blot.....	35
3.2.12	Das xCELLigence RTCA DP System	36
4	Ergebnisse.....	38
4.1	Zellviabilität.....	38
4.2	Durchflusszytometrie.....	39
4.2.1	Nachweis von CML.....	39
4.2.2	Nachweis von RAGE	41
4.3	Western Blot	43
4.3.1	Nachweis von CML.....	44
4.3.2	Nachweis von RAGE	45

4.4	Adhäsions-Assay	47
4.4.1	Adhäsion auf Laminin	47
4.4.2	Adhäsion auf Fibronectin.....	49
4.4.3	Adhäsion auf Kollagen IV	50
4.4.4	Vergleich der Substrate	51
4.5	Migrations-Assay	52
5	Diskussion.....	55
5.1	MGO-Behandlung hat keinen Einfluss auf Zellviabilität	55
5.2	Verstärkte Bildung von CML als Nachweis der Glykierung durch MGO	56
5.3	Glykierung führt zu gesteigerter Expression von RAGE	58
5.4	Reduzierte Adhäsion auf glykiertem Laminin	60
5.5	Erhöhte Migration durch Glykierung.....	61
6	Zusammenfassung	64
7	Literaturverzeichnis.....	66
8	Thesen	79

Curriculum vitae (Tabellarischer Lebenslauf)

Selbstständigkeitserklärung

Danksagung

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ALK	anaplastische Lymphomkinase
AGE	Advanced Glycation Endproducts
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Celsius
CD	Cluster of Differentiation
CEL	Carboxyethyllysin
CI	Cell Index (Zell-Index)
CIM	Cell Invasion and Migration
CML	Carboxymethyllysin
COX	Cyclooxygenase
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMBA	Dimethylbenzo(a)anthracen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
ECIS	Electric Cell-Substrate Impedance Sensing
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
FACS	Fluorescence activated cell sorting
F _c	crystallisable fragment (kristallisierbaren Fragment)
FCS	Fetal Calf Serum (Fetales Kälberserum)
FEEL	Fasciclin EGF-like, laminin-type EGF-like, link domain-containing SR
g	Gramm
HCl	Chlorwasserstoff
HDL	High Density Lipoprotein
HRP	Horseradish peroxidase (Merrettichperoxidase)
H ₂ O	Wasser
IGF	Insulin-like Growth Factor (Insulinähnlicher Wachstumsfaktor)

IgG	Immunglobulin G
INSS	International Neuroblastoma Staging System
INRG	International Neuroblastoma Risk Group
IRF1	Interferon regulatory factor 1
ISRE	Interferon stimulated response element
JAK	Januskinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
L	Liter
LDL	Low Density Lipoprotein
LOX	Lectin-like oxidized Low Density Lipoprotein Receptor
m	Milli
M	Mol
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MGO	Methylglyoxal
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMP	Matrixmetalloprotease
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NEAA	Non-Essential Amino Acid (nicht-essentielle Aminosäuren)
NF- κ B	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NGF	Nerve Growth Factor (Nervenwachstumsfaktor)
Nm	Nanometer
PBS	Phosphate buffered Saline
PC12	Zelllinie aus einem Phäochromozytom der Ratte
RAGE	Receptor for Advanced Glycation Endproducts
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktive Sauerstoffspezies)

rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SR	Scavenger Receptor
sRAGE	soluble RAGE
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline with Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNM	Tumor, Nodus lymphoideus, Metastase (Klassifikationssystem)
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
μ	Mikro

1 Einleitung

1.1 Neuroblastom

1.1.1 Definition

Das Neuroblastom ist ein maligner embryonaler Tumor und entsteht aus unreifen Zellen des sympathischen Nervensystems. Neuroblastome können Katecholamine produzieren, weshalb sie zu den neuroendokrinen Tumoren gezählt werden. Sie zählen zu den häufigsten extrakraniellen soliden Tumorformen im Kindesalter. Die Tumorzellen entstammen der Neuralleiste und können überall dort auftreten, wo Zellen des Sympathikus aufzufinden sind (Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie 2011). Typische Orte sind das Nebennierenmark oder der sogenannte Grenzstrang, der Bereich des Nervengeflechts beidseits der Wirbelsäule (Yiallourous und Berthold 2014). Es werden 3 Risikostufen von niedrig, über intermediär bis hoch unterschieden (Cohn 2009).

1.1.2 Geschichtlicher Hintergrund

Rudolf Virchow gilt als Erstbeschreiber dieser Erkrankung und konstatierte bei einem Kind im Jahre 1864 ein abdominelles Gliom. 1891 wurden weitere Charakteristika vom deutschen Pathologen Felix Marchand notiert, der die Abstammung des Tumors vom sympathischen Nervensystem und vom Nebennierenmark entdeckte (Rothenberg 2009).

Die Abstammung von Zellen der Neuralleiste wurde im Jahre 1910 von James Homer Wright beschrieben, der den Tumor daher Neuroblastom nannte. Ebenso entdeckte er die typischen Zellnester im Knochenmarkausstrich, die nach ihm Homer-Wright-Rosetten genannt werden (Rothenberg 2009). Ein mikroskopisches Bild eines Knochenmarkausstriches ist in Abbildung 1 zu sehen.

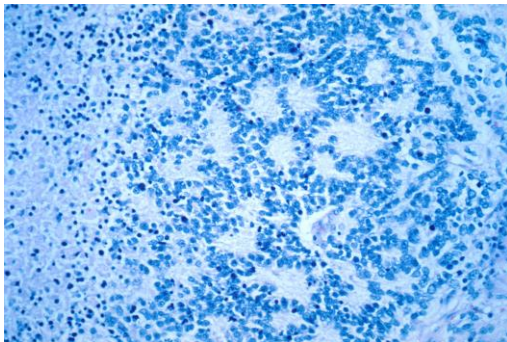


Abb. 1:
Mikroskopisches Bild der typischen Homer-
Wright-Rosetten eines Neuroblastoms
(Tsokos 1993)

1.1.3 Epidemiologie

Das Neuroblastom ist für ca. 7,3% der Tumorerkrankungen im Kindesalter verantwortlich (Berthold 2002) und bei rund 15% der kindlichen Krebserkrankungen die Todesursache. Die höchste Inzidenz von etwa 40% ist dabei im ersten Lebensjahr zu verzeichnen. Circa 90% der Patienten erkranken in den ersten 5 Lebensjahren, nur 10% der Fälle treten später auf (Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie 2011).

1.1.4 Klinisches Bild

Die Erkrankung kann ein sehr heterogenes Bild zeigen. Sie prägt sich häufig mit unspezifischen Symptomen wie Müdigkeit, Abgeschlagenheit und Inappetenz aus, welche typisch für eine Tumorerkrankung sind (Yiallouros und Berthold 2014).

Das klinische Bild hängt sehr von der Lokalisation des Tumors ab. Abbildung 2 zeigt den häufigsten Manifestationsort: die Nebenniere (Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie 2011).

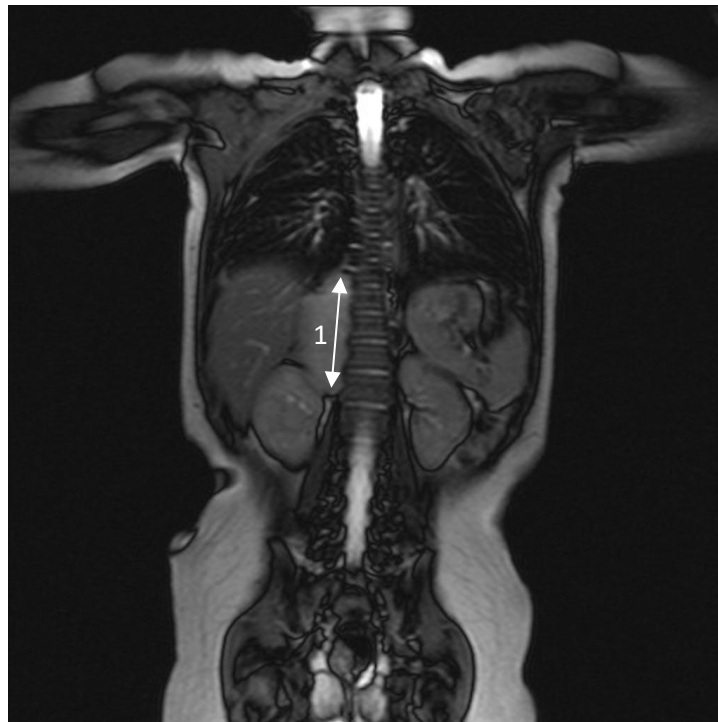


Abb. 2: Neuroblastom der rechten Nebenniere (1) (Jha 2015)

Hier kann sich neben Bauchschmerzen eine palpable Raumforderung im Abdomen bemerkbar machen (Yiallourous und Berthold 2014). Ein Wachstum im Bereich des Mediastinums kann zu einer Behinderung der Atmung mit Dyspnoe führen. Es kann aber auch zu Muskelschwäche der unteren Extremitäten bei Kompression des Spinalkanals kommen. Zum Teil imponieren die Symptome der autonomen Katecholaminproduktion. Das können unter anderem eine arterielle Hypertonie oder eine therapieresistente Diarrhoe sein. Eine Myelosuppression mit Ausbildung einer Anämie spricht klinisch für den Verdacht einer Metastasierung des Tumors in das Knochenmark.

Das Horner-Syndrom, bestehend aus der Symptomtrias Miosis, Ptosis und Enophthalmus, sowie das paraneoplastische Opsoklonus-Ataxie-Syndrom stellen weitere mögliche Symptome dar (Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie 2011). Die Ausbildung eines Brillenhämatoms bei retrobulbärer Infiltration ist ein wichtiger klinischer Hinweis (Yiallourous und Berthold 2014).

1.1.4 Diagnostik

Ein Großteil der Neuroblastome produziert Katecholamine. Zur Diagnostik können die Abbauprodukte der Katecholamine in Form von Homovanillinsäure oder Vanillinmandelsäure aus dem Blut sowie aus dem Urin genutzt werden. In etwa 90% der Fälle zeigt sich ein erhöhter Spiegel dieser Abbauprodukte (Strenger 2007). Weiterhin können erhöhte Werte der Laktatdehydrogenase (Kinumaki et al. 1976) und der neuronenspezifischen Enolase im Blut diagnostisch hilfreich sein (Tsokos et al. 1984). Eine Bildgebung durch eine Magnetresonanztomographie oder Computertomographie ist obligat und dient zur Einschätzung des Tumorstadiums. Eine Skelettszintigraphie zum Ausschluss von Skelettmetastasen sollte in jedem Fall zur Komplettierung des Stagings durchgeführt werden. Eine Knochenmarkspunktion ist ebenfalls ratsam, um eine Infiltration des Knochenmarks durch den Tumor auszuschließen.

Die Abklärung des Ausmaßes der Metastasierung ist ausschlaggebend, da beim Beginn der ersten Symptome in bereits 50-60% der Fälle eine Streuung der Tumorzellen erfolgt ist (Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie 2011). Trotz dieser häufigen Metastasierung wurden spontane Remission des Tumors samt Metastasen häufig beschrieben. Dabei kommt es insbesondere bis zum Stadium 2 in 50% der Fälle zu spontanen Remissionen (Maris 2010).

1.1.5 Stadien

Im Jahre 2009 wurde die bis dahin gängige Einteilung des *International Neuroblastoma Staging System (INSS)* erneuert und die Einteilung der *International Neuroblastoma Risk Groups (INRG)* im internationalen Konsens eingeführt (Cohn 2009). Die Einteilung nach *INSS* beinhaltet 4 Stadien. Ein lokalisierter Tumor ohne Lymphknotenbefall steht für Stadium 1. Eine Infiltration in die nähere Umgebung steht für Stadium 2a. Einen regionalem Lymphknotenbefall bezeichnet man mit 2b. Das Stadium 3 bezeichnet einen Tumor mit Überschreitung der Mittellinie. Ein Tumor mit hämatogenen Fernmetastasen entspricht dem Stadium 4. Ein Sonderfall ist das Stadium 4S, das nur für Säuglinge bis 18 Monaten gilt. Es entspricht dem Stadium 1 oder 2 mit Fernmetastasen in Haut, Leber oder maximal 10% des Knochenmarks. Dieses Stadium zeigt häufig spontane Remissionen, sodass hier unter sorgfältiger Beobachtung abgewartet werden kann (Brodeur et al. 1988). In der neuen Einteilung nach INRG werden nun neben Ausbreitung und Lymphknotenstatus auch andere Merkmale wie Alter, histologische Besonderheiten und genetische Veränderungen wie N-myc-Amplifikation und 11q-Aberration beachtet, um verschiedene Risikostufen zu stratifizieren (Cohn 2009). Abbildung 2 zeigt die verschiedenen Kriterien der Einteilung.

INRG Stage	Age (months)	Histologic Category	Grade of Tumor Differentiation	MYCN	11q Aberration	Ploidy	Pretreatment Risk Group	
L1/L2		GN maturing; GNB intermixed					A Very low	
L1		Any, except GN maturing or GNB intermixed		NA			B Very low	
				Amp			K High	
L2	< 18	Any, except GN maturing or GNB intermixed		NA	No		D Low	
					Yes		G Intermediate	
	≥ 18		GNB nodular; neuroblastoma	Differentiating	NA	No		E Low
				Poorly differentiated or undifferentiated		Yes		H Intermediate
				Amp		N High		
M	< 18			NA		Hyperdiploid	F Low	
	< 12			NA		Diploid	I Intermediate	
	12 to < 18			NA		Diploid	J Intermediate	
	< 18			Amp			O High	
	≥ 18						P High	
MS	< 18			NA	No		C Very low	
					Yes		Q High	
				Amp			R High	

Abb. 3: Stadieneinteilung nach INRG (Cohn 2009)

Abkürzungen: GN – Ganglioneurom GNB – Ganglioneuroblastom
 NA – nicht amplifiziert Amp – amplifiziert

Die Abkürzung L1 steht bei dieser Einteilung für einen lokalen Tumor ohne weitere Risikofaktoren. Bestehen weitere Risikofaktoren bei einem lokalen Tumor wird die Abkürzung L2 verwendet. Stadium M steht in Analogie zur TNM-Klassifikation (Klassifikation für maligne Tumoren, T für Primärtumor, N für Lymphknotenbefall, M für Metastasen) für ein metastasiertes Geschehen. Das Stadium MS entspricht dem ehemaligen Stadium 4S, wobei hier trotz Metastasierung eine hohe Spontanremissionsrate beobachtet wird (Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie 2011).

1.1.6. Genetik

Ursache für die Entstehung dieses Krankheitsbildes ist die Entartung unreifer Zellen des sympathischen Nervensystems, welche durch Chromosomenveränderung sowie Mutationen begünstigt werden kann (Yiallourous und Berthold 2014). Das Auftreten der Erkrankung ist hauptsächlich sporadisch, nur 1-2% der Fälle treten familiär auf und sind mit Mutationen assoziiert. Untersuchungen zu diesem Sachverhalt haben gezeigt, dass diese hereditären Fälle oft mit einer Mutation der anaplastischen Lymphomkinase (ALK) einhergehen (Mossé 2008). Wichtig für die Tumorprogression scheint die Amplifikation des N-myc-Protoonkogens zu sein (Brodeur et al. 1984). Diese Amplifikation zeigte eine Inzidenz von 20% bei Erstdiagnosen (Seeger et al. 1985). Strukturelle Chromosomenaberrationen in Form von Deletionen von 1p36 sowie 11q23 sind ebenfalls mit einer schlechten Prognose assoziiert (Attiyeh 2005).

1.1.7. Prognose

Die Prognose der Patienten hängt stark vom Stadium, Alter sowie molekulargenetischen Veränderungen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ab. Mithilfe dieser Parameter lässt sich eine Stratifizierung des Risikoprofils erstellen.

Ein hoher Grad der Expression des N-myc-Protoonkogens geht mit einer schlechteren Prognose der Patienten einher (Westermann 2008).

Hoch-Risiko-Formen sprechen nur inadäquat auf die Therapie an. Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit ist insgesamt bei 79%, für Niedrig-Risiko-Patientin sogar bei über 95%. Die Überlebensrate für 5 Jahre bei Hoch-Risiko-Patienten ist mit 30-40% deutlich schlechter (Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie 2011). Die meisten Langzeitüberlebenden zeigen bleibende Behandlungsfolgen wie Hörverlust,

Wachstumsstörungen oder Schilddrüsenfunktionsstörungen. Des Weiteren ist hier das Risiko für Zweit-Karzinome erhöht. (Oeffinger 2006)

1.1.8. Behandlung

Die Behandlung des Neuroblastoms richtet sich nach dem individuellen Risikoprofil. Erkrankungen mit niedrigem Risiko (Stadium 1 und 2) können unter regelmäßiger Kontrolle geführt werden, ohne dass eine Behandlung erfolgen muss. Eine chirurgische Intervention ist ebenfalls möglich (Yiallourous und Berthold 2014). Patienten mit mittlerem Risiko (Stadium 3) sollten eine Chemotherapie und eine operative Entfernung des Tumors erhalten. Hoch-Risiko-Tumore (Stadium 4) sollten eine 3-fach-Therapie mit chirurgischer Intervention, intensivierter Radio- sowie Chemotherapie erhalten (Berthold 2002). Bei Infiltration des Knochenmarks muss eine Knochenmarktransplantation in Betracht gezogen werden. Außerdem sind hier die Anwendung von Antikörpern sowie von 13-cis-Retinsäure möglich (Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie 2011).

1.2. Glykierung

Glykierung bezeichnet die Reaktion von Lipiden, Proteinen oder Nukleinsäuren mit Carbonylen, ohne dass dabei Enzyme wirksam werden (Thornalley 1996). Ausgangsstoffe für diese nicht-enzymatische Reaktion sind ein reduzierender Zucker und eine freie, reaktive Aminogruppe. Über eine Kondensation entsteht zunächst eine Schiff'sche Base und durch weitere Umlagerungsschritte ein Amadori Produkt (Belitz et al. 2009).

Die Endformen aus den Reaktionen von Proteinen und Kohlenhydraten sind die Advanced Glycation Endproducts (AGEs) (Brownlee 1995). Man kann die Glykierung in eine exogene und eine endogene Form unterscheiden, die im Folgenden genauer spezifiziert werden sollen.

1.2.1 Exogene Glykierung

Die exogene Glykierung läuft außerhalb des Körpers ab und ist eine Reaktion, die stattfindet, wenn Proteine mit Kohlenhydraten in Verbindung kommen. Temperaturen von über 120°C begünstigen diesen Prozess, der auch als Maillard-Reaktion bezeichnet wird. In der Lebensmittelindustrie spielt diese Reaktion eine wichtige Rolle, um einerseits Produkten die gewünschte Farbe zu geben oder andererseits als Geschmacksverstärker. Kaffee, Karamell, Brot,

Pommes Frites aber auch Steak erhalten wesentliche Teile ihres Geschmacks durch diese Reaktion. Reduzierende Zucker und Aminosäuren reagieren dabei zu AGEs (Belitz et al. 2009). Diese Reaktion könnte ebenfalls bei der Bildung von Acrylamid beteiligt sein, welches als wahrscheinlich kanzerogen eingestuft wurde (Stadler et al. 2002).

Bei häufigem Verzehr von erhitzten Lebensmitteln kann es zur Akkumulation der AGEs kommen, da diese nur bis zu bestimmten Konzentrationen abgebaut und ausgeschieden werden können. Durch Anhäufung dieser Verbindungen im Körper steigt der oxidative Stress und es kann zu DNA-Schäden kommen (Stadler et al. 2002).

Rauchen ist ebenfalls als Quelle für die externe Zufuhr von AGEs zu nennen. Tabakblätter werden zu diesem Zweck in Anwesenheit von Zucker getrocknet, wobei wiederum AGEs entstehen. Die gebildeten Reaktionsprodukte werden beim Rauchen in die Lunge inhaliert und erreichen so das Körperinnere (Cerami et al. 1997).

1.2.2 Endogene Glykierung

Auch im menschlichen Organismus laufen Glykierungsvorgänge ab. Diese Reaktionen finden im Blutkreislauf oder zytosolisch unter Beteiligung von Fruktose und Galaktose, zum Teil auch unter der Nutzung von Glukose statt. Dabei entstehen Dicarbonylverbindungen, die stark reaktiv sind (Thornalley 2005). Beispiele für diese Verbindungen sind Glyoxal, Mehtylglyoxal und 3-Deoxyglucoson (Angeloni et al. 2014). Eine diabetische Stoffwechsellage mit erhöhten Blutglukosewerten fördert die Entstehung von AGEs (Singh et al. 2014). Ein Beispiel für physiologische AGEs ist das glykierte Hämoglobin HbA1c, welches das erste entdeckte glykierte Protein darstellt. Neben der Diagnostik dient HbA1c aufgrund der Lebenszeit von Hämoglobin von circa 120 Tagen als Marker für Langzeitblutzuckerwerte beim Diabetes mellitus (Koenig et al. 1976).

1.3 Advanced Glycation Endproducts

Wie oben beschrieben, können die Glykierungsprodukte der Reaktion aus Proteinen und Kohlenhydraten sowohl exogen als auch endogen entstehen. Diese *Advanced Glycation Endproducts* (AGEs) stellen posttranslationale Modifikationen von Proteinen dar und spielen über verschiedene Wege eine Rolle bei Alterungsprozessen und der Entstehung von Krankheiten (Brownlee 1995). Beispiele für AGE-Modifikationen sind Carboxyethyllysin (CEL) und Carboxymethyllysin (CML) (Bohlender et al. 2005). Zwischenstufen auf dem Weg dieser

nicht-enzymatischen Reaktion sind die Schiff'sche Basen und die Amadori Produkte, wie in Abbildung 4 gezeigt wird.

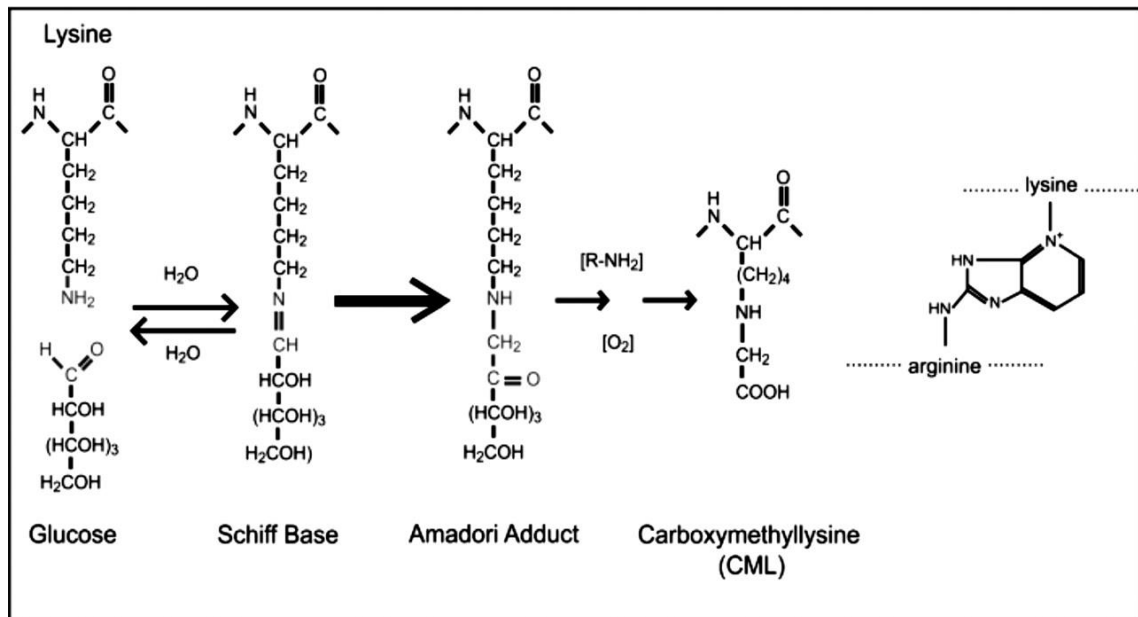


Abb. 4: Entstehung von CML (Bohlender et al. 2005)

Glykierung findet vorwiegend an den Aminogruppen von Arginin und Lysin statt. Beim Menschen enthalten die Histone im Nucleus die größte Menge von Lysin und haben eine erhöhte Wahrscheinlichkeit glykiert zu werden (Ansari et al. 2011). Als Reaktionsprodukt entsteht, wie oben bereits erwähnt, unter anderem CML. Dieses Reaktionsprodukt ist zur Zeit der meist genutzte Marker für die Entstehung von AGEs (Hangaishi et al. 1998).

1.3.1 Die Rolle von Methylglyoxal bei der Bildung von AGEs

Methylglyoxal (MGO) ist ein reaktives Zwischenprodukt des Zellmetabolismus und kommt in allen lebenden Zellen vor (Sousa Silva et al. 2013). Es ist ein α -Ketoaldehyd, welches endogen als Nebenprodukt der Glykolyse, bei der Degradation von Glycerinaldehyd-3-phosphat oder nicht-enzymatisch bei der Fragmentierung von Zuckern entsteht. Circa 0,1-0,4 % der Glukose werden bei der Glykolyse zu MGO umgewandelt. MGO ist 20.000-mal reaktiver als Glukose, hat jedoch eine sehr kurze Halbwertszeit, da es sehr schnell an Proteine gebunden oder rasch abgebaut wird (Kalapos 2008).

Eine exogene Zufuhr ist durch Stoffe wie Kaffee, Alkohol und Lebensmittel möglich (Nemet et al. 2006). Bei der Bildung von MGO spielen bei Lebensmitteln verschiedene Reaktionen und

Prozesse wie Photodegradation, Autooxidation, prolongierte Lagerung (Nemet und Varga-Defterdarović 2007) und Erhitzung eine Rolle (Pfeifer et al. 2013). Zigarettenrauch ist ebenfalls als Quelle exogener Zufuhr von MGO zu nennen (Fujioka und Shibamoto 2006).

MGO konnte zum ersten Mal bei dem Bakterium *Escherichia coli* nachgewiesen werden, wo es Konzentrationen von 20 μmol erreichte (Cooper und Anderson 1970). Durch konstant hohe Glukoselevel konnte ein Konzentrationsanstieg für MGO bei diesem Bakterium festgestellt werden (Freedberg et al. 1971).

Im menschlichen Liquor kommt MGO in Konzentrationen von 10-20 μmol vor (Kuhla et al. 2005). Es wird angenommen, dass MGO ähnliche Level im unteren mikromolaren Bereich innerhalb der Zellen erreicht (Rabbani und Thornalley 2012).

MGO ist der potenteste Präkursor für die AGE-Bildung (Thornalley 1996). Es ist in der Lage Zellschäden und Protein-Quervernetzungen durch Glykierung hervorzurufen (Thornalley 2005). Viele Studien haben den Zusammenhang zwischen MGO, AGE-Bildung, oxidativem Stress (Angeloni et al. 2014) und pathologischen Effekten wie Diabetes mellitus (Dmitriev und Titov 2010), arterieller Hypertonie (Chang und Wu 2006), Alterungsprozessen (Desai et al. 2010) und neurodegenerativen Erkrankungen gezeigt (Chen et al. 2006). Gesteigerte Konzentrationen an MGO gehen mit einer Hirnatrophie sowie einer Verschlechterung der kognitiven Fähigkeiten einher (Srikanth et al. 2011).

1.3.2 Pathologie und AGE-vermittelte Effekte

Die Bildung von AGEs gehört zum physiologischen Alterungsprozess (Koriyama et al. 2015). Untersuchungen konnten zeigen, dass Diabetiker aufgrund höherer Glukoselevel auch vermehrt AGEs aufweisen und somit eher an den Folgen im Sinne von beschleunigten Alterungsprozessen leiden (Schleicher et al. 1997). Durch Ablagerung von AGEs in den Gefäßen kommt es zu einer Begünstigung der Atherosklerose. AGEs begünstigen die Oxidation von *Low Density Lipoprotein* (LDL), welche von Makrophagen aufgenommen werden, wodurch es zur Ausbildung von Schaumzellen kommt (Aronson und Rayfield 2002). Durch die resultierende Entzündungsreaktion kann sich eine Fibrose ausbilden und so die Atherosklerose weiter vorantreiben (Steinberg et al. 1989). Durch hohe Level an AGEs wird ebenfalls das *High Density Lipoprotein* (HDL) glykiert und so leichter oxidiert. Dadurch kann es seinen protektiven Effekt verlieren (Stirban et al. 2014). Es konnte gezeigt werden, dass sich AGEs in atheromatösen

Plaques (Aronson und Rayfield 2002) sowie in der glomerulären Basalmembran ablagern (Bohlender et al. 2005).

Man kann bei den Folgeerkrankungen der Gefäße mikrovaskuläre Komplikationen wie Retinopathie, Neuropathie und Nephropathie von den makrovaskulären Folgen wie *Apoplexia cerebri*, Myokardinfarkt und periphere arterielle Verschlusskrankheit unterscheiden (Singh et al. 2014). Des Weiteren wird die Ausbildung einer Katarakt beim Diabetes mellitus durch Ablagerung von AGEs in der Linse des Auges beschleunigt (Singh et al. 2014). Durch Modifikation neuronaler Zellen mit AGEs wurden höhere Werte für β -Amyloid sowie intrazelluläre Tau-Proteine nachgewiesen (Sachdev et al. 2013), was in kausalem Zusammenhang mit der Entstehung des Morbus Alzheimer steht (Koriyama et al. 2015). Weitere neurodegenerative Krankheiten wie der Morbus Parkinson, die Amyotrophe Lateralsklerose sowie die Amyloid-Polyneuropathie werden ebenfalls durch Aggregation von β -Amyloid hervorgerufen (Salahuddin et al. 2014).

Durch Glykierung von Kollagenen kommt es zur Ausbildung von komplexen Quervernetzungen, die vom Körper aufgrund fehlender Enzyme nicht mehr gespalten werden können. Die glykierten Kollagene sind weniger für Matrix-Metalloproteasen angreifbar, welche für den Abbau der Kollagene verantwortlich sind (Mott et al. 1997). Durch Störung beim Remodelling verlieren sie an Elastizität, mit dem Resultat einer erhöhten Steifigkeit von verschiedenen Gewebestrukturen. Es kann zur Fibrose bzw. Sklerose kommen (Sakata et al. 1995). Durch Akkumulation von AGEs im Knochen kommt es zur Ausbildung von Quervernetzungen von Kollagenen und anderen Proteinen. Die mechanischen Eigenschaften des Knochens sind gestört und der Knochenumbau wird behindert. Als Folge kann es zur Osteoporose kommen (Sanguineti et al. 2014).

Beim Gestationsdiabetes spielen hohe Spiegel von AGEs ebenfalls eine Rolle. Sie haben eine proinflammatorische Wirkung und erhöhen die Komplikationsrate in der Schwangerschaft sowohl bei der Mutter als auch beim Ungeborenen (Tomaschitz 2009). Weitere Effekte werden durch Interaktion von AGEs mit den speziellen Rezeptoren ausgelöst. Diese Effekte sollen hier in Zusammenhang mit dem RAGE genannt werden.

1.3.3 Clearance

Ein Großteil der AGEs entzieht sich aufgrund der Quervernetzungen dem enzymatischen Abbau, was über die Zeit zur Akkumulation führt. Die Ausscheidung der AGEs geschieht abhängig von

der Nierenfunktion durch glomeruläre Filtration dieser Stoffe durch die Bowman-Membran. Anschließend folgt bei filtrierbaren AGEs die endozytotische Aufnahme durch Zellen des proximalen Tubulus. In diesen Zellen erfolgt der lysosomale Abbau durch Proteolyse (Gugliucci und Bendayan 1996). Bei Menschen mit eingeschränkter Nierenfunktion kann es somit zur verstärkten Akkumulation von AGEs im menschlichen Körper mit entsprechenden pathologischen Folgen kommen (Miyata et al. 1996).

Komplexere AGE-Moleküle können aufgrund ihrer Größe die Bowman-Membran der Niere nicht passieren. Für die Ausscheidung über die Niere bedarf es zunächst der Spaltung in kleinere Peptide durch periphere Makrophagen (Miyata et al. 1998). Bei dieser Zersetzung spielen die Endothelzellen und Kupffer-Zellen der Leber eine wesentliche Rolle (Smedsrød et al. 1997).

Aber auch an der Bowman-Membran kann es durch Ablagerung von AGEs zur typischen Nephropathie mit fibrotischem Umbau sowie einer Verdickung der Basalmembran kommen, was zu einer Einschränkung der Nierenfunktion führt (Gugliucci und Bendayan 1995).

1.3.4 Therapeutische Ansätze zur Inhibierung der Glykierung

Es gibt zurzeit verschiedene therapeutische und präventive Ansätze. Durch eine entsprechende Diät mit weniger Kohlenhydraten in Form von Monosacchariden konnten bei Patienten mit Diabetes mellitus rückläufige Werte für oxidativen Stress, Entzündung und Insulinresistenz konstatiert werden (Vlassara et al. 2002), ebenso sank das Level an AGEs im Blut (Uribarri et al. 2003).

Für Lebensmittel besteht die einfachste und kosteneffektivste Methode die Menge an AGEs zu senken, indem die Zubereitungstemperatur erniedrigt und die Luftfeuchtigkeit erhöht wird (Uribarri et al. 2010).

Therapeutische Möglichkeiten bieten spezielle AGE-Inhibitoren, wie z.B. Pyridoxamine oder AGE-Crosslinkbreaker, wie z.B. Phenacylthiazolium (Rahbar und Figarola 2003). Weiterhin sind bekannte antiinflammatorische Medikamente, wie Aspirin oder Diclofenac, und nephroprotektive Substanzen wie *Angiotensin-Converting-Enzym-Inhibitoren* oder Angiotensin-II-Rezeptorblocker wirksam. Antidiabetika wie Metformin oder Pioglitazone können ebenfalls zum Einsatz kommen (Monnier 2003). Untersuchungen konnten zeigen, dass das lipidlösliche Thiaminderivat Benfotiamin vaskuläre Schäden effektiv reduzieren kann. Dies geschieht durch Aktivierung der Transketolase, welche im Pentose-Phosphat-Weg reaktive Zucker in weniger aggressive Formen umwandelt (Hammes et al. 2003)

1.3.5 Rezeptoren für AGEs

Über membranständige Rezeptoren führt die Bildung von AGEs zur Aktivierung verschiedener Signalwege. Der meist untersuchte Rezeptor ist dabei der multi-liganden *Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE)* (Ott et al. 2014). Abbildung 5 soll eine Übersicht über die Fülle der weiteren Rezeptoren für AGEs vermitteln.

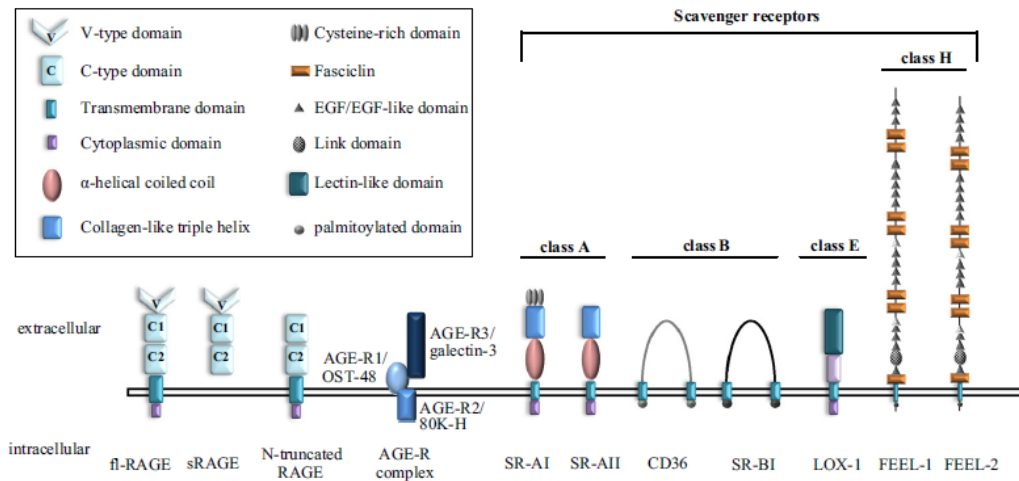


Abb. 5: Übersicht der Rezeptoren für AGEs (Ott et al. 2014)

Neben den verschiedenen Formen von RAGE gibt es noch die AGE-Rezeptoren 1-3. Diese Rezeptoren werden überwiegend von Makrophagen, T-Lymphozyten, Endothelzellen und neuronalen Zellen exprimiert. Zu den Funktionen dieser Rezeptoren gehören unter anderem Zelladhäsion, Wachstum, Differenzierung und maligne Transformation (Stirban et al. 2014). Eine weitere Gruppe von Rezeptoren für AGEs sind die oben abgebildeten Rezeptoren *Scavenger Receptor (SR) AI, AII, BI, CD36, LOX-1, FEEL-1 / 2*, welche alle zu den Scavenger-Rezeptoren gehören. Die genannten Vertreter werden zu einem Großteil auf Endothelzellen, Makrophagen sowie in der Leber exprimiert und haben ihre Hauptaufgabe im Fettstoffwechsel, wie z.B. der endozytotischen Aufnahme von HDL bzw. LDL sowie der Degradation von AGEs (Ott et al. 2014).

1.4 Rezeptor für Advanced Glycation Endproducts (RAGE)

Dieser Rezeptor ist ein Transmembranprotein, welches zur Immunglobulin-Superfamilie gehört (Neeper et al. 1992). RAGE hat eine extrazelluläre Domäne zur Bindung von Liganden, eine

Transmembrandomäne zur Verankerung in der Zellmembran sowie eine zytosolische Domäne, welche die weitere Signaltransduktion übernimmt (González et al. 2013). Es ist ein Multi-Liganden-Rezeptor mit einer Masse von rund 50 kDa im Western Blot (Neeper et al. 1992), der neben AGEs auch *High-mobility group protein* (B)1 (HMGB1), S-100 kalziumbindendes Protein, β -Amyloid und Phosphatidylserin binden kann (Ramasamy et al. 2012).

Während der Embryonalentwicklung wird RAGE stark exprimiert und ist beim Neuritenwachstum involviert (Hori et al. 1995). Im Erwachsenenalter wird der Rezeptor nur noch schwach exprimiert (Brett et al. 1993), wobei eine Überexpression bei vielen chronischen Erkrankungen gefunden werden konnte (Chuah et al. 2013).

RAGE kann auf vielen Zellen des Immunsystems, wie z.B. Makrophagen und dendritischen Zellen gefunden werden, was seine Rolle bei Entzündungsreaktionen andeutet (Chuah et al. 2013). Der Rezeptor hat außerdem eine Funktion bei der Lungenhomöostase, dem Knochenstoffwechsel, der Nervenregeneration, dem Neuritenwachstum und der Immunantwort (Ott et al. 2014).

Das Gen für RAGE liegt auf Chromosom 6 im Bereich des *Major Histocompatibility Complex III* (MHC III), welches von speziellen Zellen des Immunsystems wie z.B. antigenpräsentierenden Zellen exprimiert wird (Sugaya et al. 1994). Bisher wurden über 20 verschiedene Isoformen von RAGE entdeckt, welche durch alternatives *Splicing* entstehen (Kim et al. 2012). Abbildung 6 gibt eine Übersicht der verschiedenen Übergruppen der Isoformen.

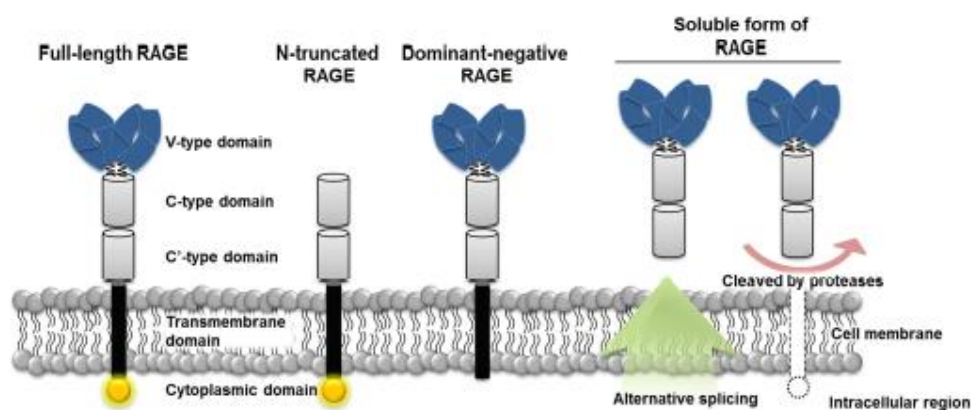


Abb. 6: Isoformen von RAGE (Lee und Park 2013)

Als Varianten können hier der *N-truncated RAGE*, der *dominant-negative RAGE* sowie der *soluble RAGE* (sRAGE) unterschieden werden (Neeper et al. 1992). Eine Interaktion mit Liganden ist bei der *N-truncated* Variante nicht möglich, da hier die V-Domäne auf der Extrazellulärseite zur Bindung fehlt. Der *dominant-negative RAGE* besitzt keine zytosolische Domäne, sodass zwar

eine Bindung von Liganden möglich ist, jedoch keine Signaltransduktion erfolgen kann (Hudson et al. 2008). Die lösliche Form des *RAGE* (*sRAGE*) besteht nur aus der extrazellulären Domäne und kann sowohl durch alternatives *Splicing* als auch durch eine membranassoziierte Matrix-Metalloprotease entstehen (Zhang et al. 2008). Ohne die Transmembrandomäne kann *sRAGE* in den Extrazellulärraum wandern und dort an Liganden binden (Hudson et al. 2008). Als Besonderheit werden die Liganden durch Bindung an *sRAGE* neutralisiert, wodurch keine Interaktion mit anderen *RAGE*-Varianten möglich ist. Daher könnte die lösliche Form des Rezeptors als Therapieansatz bei der Inhibierung der Signaltransduktion via *RAGE* bei vielen Krankheiten angewendet werden (Maillard-Lefebvre et al. 2009)

1.4.1 Signaltransduktion

Im Gegensatz zu vielen anderen Rezeptoren erfolgt bei *RAGE* durch Stimulation eine positive Rückkopplung und vermehrte Expression (Bierhaus et al. 2005).

Einen Eindruck über die Vielfältigkeit der AGE-vermittelten Signaltransduktionwege soll Abbildung 7 verschaffen.

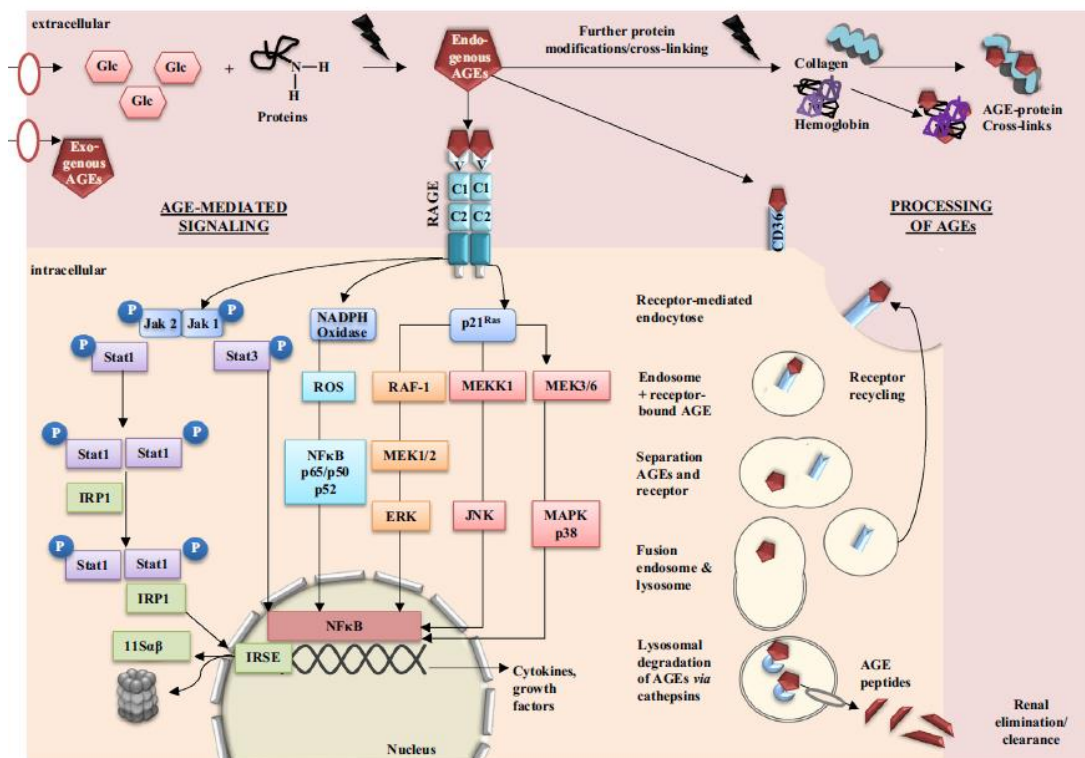


Abb. 7: AGE-vermittelte Signaltransduktionswege (Ott et al. 2014)

AGE-RAGE-Interaktion führt zur Aktivierung der NADPH-Oxidase, wodurch vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet werden (Wong et al. 2001). Diese ROS sind verantwortlich für die Aktivierung von NF- κ B, dem *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (Schmidt et al. 2000). Diese Aktivierung führt dazu, dass verschiedene Zytokine und Adhäsionsproteine exprimiert werden und eine Immunantwort ausgelöst wird (Barnes und Karin 1997).

NF- κ B führt weiterhin zur Produktion diverser Wachstumsfaktoren, wie z.B. *Nerve-Growth-Factor (NGF)* (Meffert et al. 2003) und kann ebenso die Apoptose von Zellen auslösen (Sheikh und Huang 2014). Ein Beispiel für ein durch NF- κ B reguliertes Gen ist die Cyclooxygenase 2 (COX2), welche durch vermehrte Transkription ebenfalls an der Apoptose beteiligt ist (Lan et al. 2015).

Der JAK/STAT-Signalweg kann ebenfalls durch RAGE aktiviert werden. Nach Dimerisierung und Phosphorylierung der Januskinase (JAK) erfolgt die Phosphorylierung sowie ebenfalls Dimerisierung der *Signaltransducers and activators of Transcription* (STAT) (Chung et al. 2011). Im Anschluss wandert der STAT zusammen mit dem *Interferon regulatory factor 1* (IRF1) in den Zellkern, wo die Bindung an den *Interferon stimulated response element* (ISRE) erfolgt. Es kommt zur vermehrten Produktion von Zytokinen sowie Proteasomen (Grimm et al. 2012).

RAGE ist ebenfalls in der Lage Signaltransduktion via der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) und deren Unterformen *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), p38 - mitogenaktivierte Proteinkinase und c-Jun-N-terminalen Kinase (JNK) auszulösen (Sparvero et al. 2009).

1.5 Beziehung zwischen Zelle und Extrazellulärmatrix

Zellen können mit Ihrer Umgebung vorübergehend oder auch dauerhaft in Interaktion treten. Dazu binden sie entweder direkt an einen Rezeptor der Extrazellulärmatrix oder durch Zwischenschaltung von Adhäsionsproteinen. Diese Zell-Matrix-Verbindungen dienen sowohl der mechanischen Verankerung als auch der Modulation der Zellfunktion.

Das Zusammenspiel verschiedener Zell-Matrix-Verbindungen ist somit wichtig für viele Zellfunktionen, aber auch relevant für die Karzinogenese hinsichtlich invasiven Wachstums. Zu den häufigsten Rezeptoren der Extrazellulärmatrix gehören die Integrine. Diese stellen eine Gruppe von Transmembranproteinen dar, die über den zytoplasmatischen Teil durch Adapterproteine an das Zytoskelett angeschlossen sind. Sie können an Aktin- oder

Intermediärfilamente angeschlossen sein sowie auch an andere Proteine, die Signalketten aktivieren oder inhibieren können.

Wichtige Adapterproteine zwischen Zelle und Matrix sind die Adhäsionsproteine, welche zu den Glykoproteinen gehören. Sie vermitteln über eine Vielzahl von Domänen Interaktion zwischen verschiedenen Matrix-Bestandteilen und Rezeptoren der Extrazellulärmatrix (Ayad 1998). Wichtige Vertreter dieser Glykoproteine sind Laminin und Fibronectin. Die genannten Beispiele sind zusammen mit Kollagenen an der Ausbildung der Basalmembran beteiligt (Lüllmann-Rauch 2012).

1.6 Basalmembran

Die Basalmembran ist ein Begriff der Lichtmikroskopie und ein Musterbeispiel für Zell-Matrix-Interaktionen. Man konnte bei der ultrastrukturellen Analyse zwei Hauptbestandteile in ihrem Aufbau feststellen. Zum einen besteht sie aus der Basallamina, welche sich aus der *Lamina rara* und der *Lamina densa* zusammensetzt. Zum anderen besteht sie aus der *Lamina fibroreticularis*, welche unter anderem ein Geflecht aus retikulären Fasern enthält (Lüllmann-Rauch 2012).

1.6.1 Aufgaben der Basalmembran

Die Basalmembran ist für die Integrität des Zellverbandes, also dessen mechanische Stabilität verantwortlich. Sie ermöglicht ein Anheften der Epithelzellen und somit deren Überleben sowie die Ausbildung einer Polarität. Dadurch ist sie elementar für die physiologische Zellfunktion.

Die Basalmembran unterliegt einem ständigen Umbau durch Matrix-Metalloproteasen (MMP) sowie durch Endozytose von Bruchstücken. Dieser ständige Umbau ist wichtig für die Wundheilung, die Anpassung an mechanische Belastung, die Angiogenese und für Zell-Abwehrprozesse (Lüllmann-Rauch 2012).

Auch bösartige Tumorzellen können MMP sezernieren und somit Basalmembranen zerstören und invasiv in andere Kompartimente wachsen. Dies gilt als Kennzeichen für die Entartung von Epithelien zum Karzinom. Die Basalmembran verliert ihre Barrierefunktion und ermöglicht eine Proliferation in andere Kompartimente sowie eine Streuung der Zellen (Liotta et al. 1980).

1.6.2 Molekularer Aufbau der Basalmembran

Wie bereits beschrieben, besteht die Basallamina aus der *Lamina densa* und der *Lamina rara*. Die *Lamina densa* besteht überwiegend aus Kollagen IV und Laminin in Form eines molekularen Netzes. Kollagen gibt dabei mechanische Stabilität und Laminin dient der Zelladhäsion. Beide Netze sind durch Nidogen und Perlecan miteinander verbunden. Die *Lamina rara* erscheint lichtmikroskopisch leer und wird von Adhäsionsmolekülen durchzogen. Integrine vermitteln die Haftung an Laminin. Über Adaptorproteine ist die Verbindung zum Zytoskelett gewährleistet. In der *Lamina fibroreticularis* sind neben verschiedenen Kollagenen unter anderem auch Fibronektine enthalten. Die Verbindung zwischen Basallamina und der *Lamina fibroreticularis* geschieht durch Ankerfibrillen aus Kollagen VII und durch Mikrofibrillen aus Fibrillin oder Kollagen VI (Paulsson 1992).

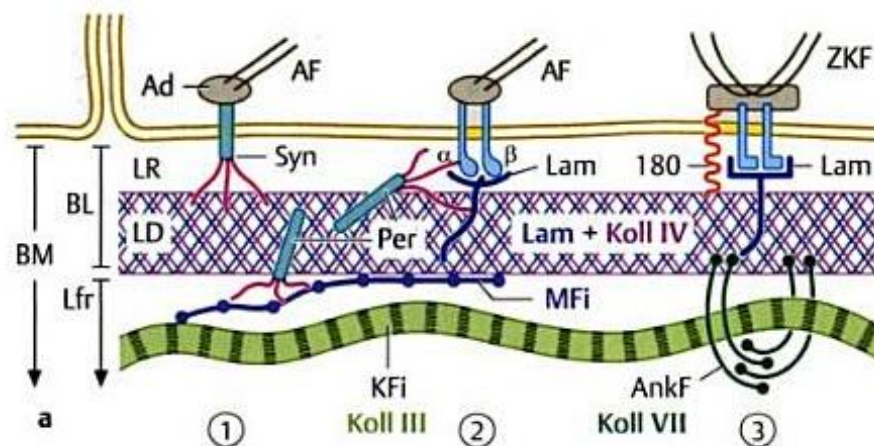


Abb. 8: Molekularer Aufbau der Basalmembran (Lüllmann-Rauch 2012)

Abkürzungen:

Ad – Adapterproteine	AF – Aktinfilament	AnkF – Ankerfibrille	BL – Basallamina
BM – Basalmembran	KFi – Kollagenfibrille	Koll – Kollagen	Lam – Laminin
LD – Lamina densa	Lfr – L. fibroreticularis	LR – Lamina rara	Mfi – Mikrofibrillen
Per – Perlecan	Syn – Syndecan		

1.6.3 Laminin

Laminine sind kollagenähnliche Glykoproteine und Bestandteile der extrazellulären Matrix. Sie sind neben Kollagen IV die wichtigsten Adhäsionsmoleküle der Basallamina. Alle Zellen mit einer solchen Basallamina produzieren Laminin. Die Bindung an die Zelle erfolgt durch verschiedene

Integrine oder Syndecan (Lüllmann-Rauch 2012). Insgesamt sind bisher 16 Isoformen bekannt, die sich jeweils aus Heterotrimeren zusammensetzen (Aumailley et al. 2005).

Es wurde gezeigt, dass Laminin die Adhäsion metastasierender Tumorzellen beeinflussen kann (Terranova et al. 1982).

1.6.4 Kollagen IV

Kollagen IV gehört zur großen Familie der Kollagene, die mit über 30% der Gesamtmasse aller Proteine das häufigste Eiweiß darstellen und mit 28 Vertretern eine große Variation besitzen. Dabei handelt es sich um Proteine der Extrazellulärmatrix, welche sich in zahlreichen Gewebetypen wie Knochen, Knorpel, Sehnen, Bänder und Zähnen befinden.

Eine Besonderheit ist das Wiederkehren von Glycin an jeder dritten Stelle der Kette. Dazwischen befinden sich Aminosäuren wie Prolin oder Hydroxyprolin. Ein hoher Anteil an Lysin und Hydroxylysin ist ebenfalls typisch für Kollagene. Dieser Sachverhalt ist wichtig für die kovalente Quervernetzung der Kollagenmoleküle und somit für deren Festigkeit.

Die Translation der Polypeptidketten erfolgt am rauen Endoplasmatischen Retikulum, welche anschließend posttranslational durch Hydroxylierung an Prolin sowie Lysinresten modifiziert werden. An diesen Schritt schließt sich die Glykosylierung der Hydroxylsyrinreste via Glukose und Galaktose an. Drei Polypeptidketten legen sich zu einer Tripelhelix zusammen, die durch Disulfidbrücken stabilisiert werden. Anschließend folgt die Sekretion in den Extrazellulärraum, wo die Bildung von Mikrofibrillen stattfindet. Als letzter Schritt erfolgt die Desaminierung durch die Lysyloxidase und die damit verbundene Quervernetzung der Fibrillen (Lüllmann-Rauch 2012).

Auch Kollagene spielen eine wichtige Rolle bei der Tumorbilogie, indem sie die Adhäsion und Migration beeinflussen (Favreau et al. 2014). Maligne Entartung steht daher in unmittelbarem Zusammenhang mit Modifikation an Kollagenen und den anderen Bestandteilen der Basalmembran (Rodriguez-Teja et al. 2015).

1.6.5 Fibronectin

Fibronectin gehört ebenfalls zu den Glykoproteinen der extrazellulären Matrix und spielt eine wichtige Rolle bei Zelladhäsion und -migration. Es fördert als unspezifisches Opsonin die Bindung von Antigenen (Ayad 1998).

Es existieren 20 verschiedene Isoformen, welche jeweils aus Heterodimeren aufgebaut sind. Man kann zwei verschiedene Arten von Fibronektin unterscheiden: Eine löslich Variante aus der Leber, die wichtig für Wundheilung und Blutgerinnung ist, sowie eine unlösliche Form als Bestandteil der extrazellulären Matrix, wo es für mechanische Stabilität sorgt (Lüllmann-Rauch 2012).

Fibronektin scheint durch Interaktion mit Integrinen ebenfalls einen gewissen Einfluss bei der Migration, der Invasion und der Metastasierung von Tumoren zu haben (Akiyama et al. 1995).

Ziel der Arbeit war es, den Zusammenhang von Alterungsprozessen und der Tumorprogression zu untersuchen. Durch Zugabe von MGO sollte Carbonylstress, wie er unter anderem beim Diabetes mellitus vorkommt, imitiert und dessen Auswirkung auf die physiologische Zellfunktion untersucht werden. Hauptaugenmerk lag auf der Untersuchung zur Adhäsion sowie Migration der verwendeten Neuroblastomzellen des Typs Kelly mittels des impedanzbasierten RTCA (*Realtime cell analysis*) -Verfahren. Für diese Experimente sollten die verwendeten Zellen bzw. Matrixproteine mit MGO behandelt und mit unbehandelten Proben verglichen werden.

Durch einen MTT-Test wurde untersucht, ob MGO in der verwendeten Konzentration von 1mM über 4 Stunden toxisch auf die verwendeten Zellen wirkt und die Zellvitalität beeinflusst. Mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie, dem FACS, erfolgte die Überprüfung glykierter Neuroblastomzellen hinsichtlich der Signale für RAGE und CML als Marker für die Reaktionen mit MGO. In weiteren Versuchsreihen sollte durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und dem anschließenden Western Blot geprüft werden, ob durch Behandlung mit MGO eine gesteigerte Detektion von CML und RAGE als Hinweis auf eine abgelaufene Glykierung möglich ist. Für die anschließende Prüfung der Adhäsion wurden Laminin, Fibronectin und Kollagen IV getrennt voneinander mit MGO glykiert und die Adhäsion via impedanzbasierter Echtzeitanalyse geprüft. Es folgte der Vergleich der Zellindizes miteinander. Für die Untersuchungen zur Migration wurden die Zellen ebenfalls mit MGO glykiert und deren Durchwanderung via impedanzbasierter Echtzeitanalyse untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Die gewählten Chemikalien für die Experimente wurden immer nach Herstellerangaben verwendet und entsprachen der höchsten Qualitätsstufe. Dabei handelte es sich um Produkte der Firmen AppliChem (Darmstadt), Bode Chemie (Hamburg), ECOLAB (Mumbai), MERCK Group (Darmstadt), Millipore (Billerica), ROTH (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (St. Louis).

3.1.2 Zellkulturmaterialien

Die für die Zellkultur gewählten sterilen Einwegmaterialien oder selbstständig autoklavierten und sterilisierten Materialien wurden bei den Arbeitsvorgängen immer nach Vorgabe der Hersteller verwendet und entsprachen der höchsten Qualitätsstufe. Hierbei handelte es sich um Produkte der Firmen Abcam (Cambridge), BD Biosciences (Franklin Lakes), Braun (Melsungen), DURAN Group (Wertheim), Eppendorf (Hamburg), Falcon (Heidelberg), Fermentas (Wilna), Invitrogen (Carlsbad), Greiner Bio-One (Frickenhausen), PAA Laboratories (Pasching), Thermo Scientific (Waltham) und ROCHE Diagnostics (Mannheim).

3.1.3 Organismen

Humane Neuroblastomzellen

Für die Experimente fanden humane Neuroblastomzellen des Typs Kelly Verwendung. Diese stammen aus dem Leibniz-Institut - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. Charakteristisches Merkmal dieser Zellreihe war die starke Amplifikation des n-myc-Protoonkogens. Sie waren außerdem positiv für die ALK und sind morphologisch rund bis fusiform. Die Zellen wuchsen adhärent einschichtig und mehrschichtig und wiesen ein polares Neuritenwachstum auf. Die verwendete Zellreihe unterlag der Sicherheitsstufe 1. Die Verdopplungszeit lag bei circa 30-40 Stunden. Die Inkubation erfolgte nach Herstellerangaben bei 37°C mit 5% CO₂-Gehalt der Luft sowie die Kultivierung mit dem Nährmedium RPMI1640 (90%) mit FCS (10%) unter Zugabe von Penicillin und Streptomycin. Das Splitten der Zellen in

Subkulturen erfolgte mit PBS/EDTA. Einige Subkulturen wurden gefroren in Medium mit 10% DMSO aufbewahrt.

3.1.4 Glykierungsreagenz

Methylglyoxal

Synonym:	Acetylformaldehyd
Molekulargewicht:	72,06 g/mol
Schmelzpunkt:	- 20°C
Siedepunkt:	> 72°C
Konzentration:	≈ 40% in H ₂ O
Vertreiber:	Sigma Aldrich (USA)

3.1.5 Materialien für MTT-Test

MTT-Lösung

Name:	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
Formel:	C ₁₈ H ₁₆ BrN ₅ S
Molekulargewicht:	414,32 g/mol
Form:	Puder
Konzentration:	5 mg/mL (in PBS)
Hersteller:	Sigma-Aldrich (St. Louis)

DMSO

Name:	Dimethylsulfoxid (Rotipuran®)
Formel:	C ₂ H ₆ OS
Molekulargewicht:	78,13 g/mol
Kochpunkt:	189°C
Hersteller:	ROTH (Karlsruhe)

3.1.6 Antikörper
3.1.6.1 Primäre Antikörper

Anti-CML-Antikörper

Typ: Kaninchen polyklonal
Hersteller: Abcam (Cambridge)
Verdünnung: 1:100 (FACS); 1:1000 (Western Blot)

Anti-RAGE-Antikörper

Typ: Maus monoklonal
Hersteller: Abcam (Cambridge)
Verdünnung: 1:100 (FACS); 1:1000 (Western Blot)

3.1.6.2 Sekundäre Antikörper

Ziege-anti-Maus

Typ: Ziege polyklonal gegen Maus-IgG; HRP
Hersteller: Abcam (Cambridge)
Verdünnung: 1:10.000

Ziege-anti-Kaninchen

Typ: Ziege polyklonal gegen Kaninchen- IgG; HRP
Hersteller: Abcam (Cambridge)
Verdünnung: 1:10.000

3.1.6.3 Fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper

Ziege-anti-Maus

Typ: Ziege polyklonal gegen Maus-IgG, DyLight 488
Verdünnung: 1:250
Hersteller: Abcam (Cambridge)

Ziege-anti-Kaninchen

Typ: Ziege polyklonal gegen Kaninchen-IgG; DyLight 488
Verdünnung: 1:250
Hersteller: Abcam (Cambridge)

3.1.6.4 IgG-Antikörper

Isotopenkontrolle Maus

Typ: Maus-IgG SC-2025
Hersteller: Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas)

Isotopenkontrolle Kaninchen:

Typ: Kaninchen-IgG SC-2027
Hersteller: Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas)

3.1.7 Größenmarker

Protein Page Ruler Prestained Protein Ladder

Bereich: 10-250kDa
Hersteller: Fermentas (Wilna)

3.1.8 Inhibitoren

Protease Inhibitor Cocktail

Hersteller: Sigma-Aldrich (St. Louis)

3.1.9 Medien

Nährmedien für die Zellkultivierung der Kelly-Zellen

RPMI 1640

Typ: Klassisches Zellkulturmedium, steril gefiltert,
pH: > 7,2
Lagerung: 4°C
Vertreiber: Sigma Aldrich (St. Louis)

3.1.10 Adhäsionsproteine

Laminin	(1 mg/mL)	Sigma Aldrich (St. Louis)
Fibronektin	(0,5 mg/mL)	Sigma Aldrich (St. Louis)
Kollagen IV	(0,5-2 mg/mL)	Sigma Aldrich (St. Louis)

3.1.11 Medienzusätze

Antibiotika

Penicillin (100U/ml)	Invitrogen (Carlsbad)
Streptomycin (0,1mg/ml)	Invitrogen (Carlsbad)

Aminosäuren:

NEAA (100x) – <i>Non-Essential Amino Acids</i>	Life Technologies (Carlsbad)
L-Glutamin (200mM)	Life Technologies (Carlsbad)

Seren

FCS (Fetales Kälberserum)	PAA Laboratories (Pasching)
---------------------------	-----------------------------

3.1.12 Membranen

Nitrocellulose Transfer Membran	Whatman (Springfield)
Whatmanpapier	Whatman (Springfield)

3.1.13 Lösungen und Puffer

Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Gellösungen:

Lösung 1:

1,5 M Tris
0,2 % SDS
Auffüllen auf 200 mL
pH 8,8

Lösung 2:

0,5 M Tris
0,2 % SDS
Auffüllen auf 200 mL
pH 6,8

10%ige Trenngellösung

7,5	mL	Acrylamid
5,6	mL	Lösung 1
9,4	mL	H ₂ O bidest.
125	µL	10% APS
12,5	µL	TEMED

4%iges Sammelgel:

0.4	ml	Rotiphorese® Gel 30
0.5	M	Tris/HCL pH 6.8
0.2	%	SDS
12	µl	10% APS
3	µl	TEMED
1.85	ml	H ₂ O bidest.

10 x Laufpuffer

0,25	M	Tris/ HCl, pH 8,8
1,92	M	Glycin
1	%	SDS (w/v) In H ₂ O bidest.

5 x reduzierender Probenpuffer

12,5	%	SDS (w/v)
0,3	M	Tris/ HCl, pH 6,8
50	%	Glycerin
25	%	DTT
0,015	%	Bromphenolblau (w/v)

Lösungen für den Western-Blot

Transfer-Puffer

150	mM	Glycin
20	mM	Tris/ HCl, pH 8,3
10	%	Ethanol (v/v)

Ponceaurot-Färbelösung

2	%	Ponceaurot (w/v)
30	%	Trichloressigsäure (v/v)
30	%	Sulfosalicylsäure (w/v)

Vor Gebrauch in H₂O bidest (1:10) verdünnen

Waschpuffer

TBS-Puffer

730	mM	NaCl
27	mM	KCl
4	M	Tris (pH 7,5)

TBS-Tween

TBS-Puffer + 0,1 % Tween 20 (v/v)

Lysepuffer

RIPA-Puffer		(Radioimmunoprecipitation assay buffer)
150	mM	sodium chloride
1.0	%	NP-40
0.5	%	sodium deoxycholate
0.1	%	SDS (sodium dodecyl sulphate)
50	mM	Tris, pH 8.0

Blockierungslösung

Gelatine	3 %	für Western-Blot CML	ROTH (Karlsruhe)
Milchpulver	5 %	für Western-Blot RAGE	ROTH (Karlsruhe)

Chemilumineszenz-Lösung

Luminata forte Western HRP Substrate	Millipore (Billerica)
--------------------------------------	-----------------------

Puffer für die Zellkultur

PBS

150	mM	NaCl
3	mM	KCl
8	mM	Na ₂ HPO ₄
1	mM	KH ₂ PO ₄

auf 1 L mit H₂O bidest. auffüllen, pH 7,2

Osmolarität mit NaCl auf 300 mosm eingestellt

PBS/EDTA

1,34mM	EDTA	(wird in 1 L PBS gelöst 0
--------	------	---------------------------

3.1.15 Geräte

Analysewaage	Sartorius AG (Göttingen)
BD Accuri C6 Flow Cytometer	BD Biosciences (Franklin Lakes)
Biosafety cabinet AURA 2000 M.A.C	BIOAIR Instruments (Mailand)
Countess Automated Cell Counter	Invitrogen (Carlsbad)
Inkubator Heraeus HERAccl 150	Kendro Laboratory Products (Hanau)
Kamera AxioCam ICc1	Carl Zeiss Microscopy (Berlin)
Laptop HP EliteBook Mobile	Hewlett-Packard Germany(Böblingen)
Magnetrührer Cimarec	Fisher Scientific (Schwerte)
Mikroskop Axiovert 100	Carl Zeiss Microscopy (Berlin)
Molecular Imager ChemiDoc XRS	Bio-Rad Laboratories (München)
Polyacrylamid-Gelelektrophoresesystem	C.B.S. Scientific Company (Del Mar)
RTCA DP (xCelligence Systems)	Roche Diagnostics Germany (Mannheim)
Thermomixer compact	Eppendorf Vertrieb (Hamburg)
Tischzentrifuge Biofuge Pico	Kendro Laboratory Products (Hanau)
Vortexer Minishaker MS2	IKA-Werke (Staufen)
Wasser/Inkubationsbad 1003	Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel)
Zentrifuge Hettich Universal 320	Hettich LAB Technology (Tuttlingen)

3.1.16 Arbeits- und Hilfsmaterialien

96-well Standard Microplate	Thermo Scientific (Waltham)
CIM-Plate 16	Roche Diagnostics Germany (Mannheim)
Desinfektion Hände Sterilium	Bode Chemie (Hamburg)
Desinfektion Oberfläche Bacillol	Bode Chemie (Hamburg)
Desinfektion Geräte Sekusept PLUS	ECOLAB (Mumbai)
E-Plate 16	Roche Diagnostics Germany (Mannheim)
Elektronische Pipette Easypet	Eppendorf (Hamburg)
ELISA-Reader Multiskan EX	Thermo scientific (Waltham)
Handschuhe Sempermed Premium	Semperit Tech. Produkte (Wien)
Kanülen Braun Sterican	B. Braun Medical Inc. (Melsungen)
Kryroröhrechen Greiner	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Laborglasflaschen	DURAN Group (Wertheim)

Microtubes Eppendorf Tubes	Eppendorf Vertrieb (Hamburg)
Microtubes Greiner Tubes	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Mikroliterpipetten (10/100/200/1000 µL)	BRAND (Wertheim)
Multichannel Pipette Research	Eppendorf (Hamburg)
Spritzen Braun Injekt Solo	B. Braun Medical Inc. (Melsungen)
Zellkulturröhrchen Greiner	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Zellkulturflaschen Greiner Cellstar (25/75/175cm ²)	Greiner Bio-One (Frickenhausen)

3.2 Methoden

3.2.1 Behandlung von Geräten und Lösungen

Die Sterilisierung der Materialien und Lösungen, die für die Experimente verwendet wurden, erfolgte durch Autoklavierung (20 Minuten bei 120°C) bzw. durch Erhitzen auf 180°C. Es erfolgte somit gleichzeitig die Beseitigung von Mikroorganismen als auch von DNAase-Aktivität. Nicht hitzestabile Geräte, Arbeitsflächen und Hilfsmittel wurden mit Flächendesinfektionsmittel (70% Ethanol) gereinigt. Lösungen, welche nicht autoklaviert werden konnten, wurden vor Verwendung mit Einmalfiltern steril gefiltert.

3.2.2 Allgemeine zellbiologische Methoden

Die durchgeführten Experimente mit humanen Neuroblastomzellen erfolgten stets unter sterilen Bedingungen in der Zellkulturbank des Labors. Für die Kultivierung der Zellen wurde ein Inkubator genutzt, der eine Atmosphäre mit 37°C bei einem CO₂-Anteil von 5 % erzeugt. Für das Zentrifugieren der Zellen wurde ein Zeitraum von 5 Minuten bei 1100 rpm gewählt.

3.2.3 Kultivieren und Passagieren von eukaryotischen Zellen

Die adhärent wachsenden Neuroblastomzellen wurden in unbeschichteten Kulturflaschen unterschiedlicher Größe mit dem Nährmedium RPMI 1640 kultiviert. Die Zelldichte und Vitalität wurde nach mikroskopischer Sicht eingeschätzt und alle zwei bis drei Tage im Verhältnis von 1:3 bis 1:4 verdünnt. Dabei konnte je nach Bedarf der Zellmenge die Größe der Zellkulturflaschen angepasst werden, um optimale Bedingungen zu gewährleisten. Dafür wurden die Zellen zunächst in PBS gewaschen und mit PBS/EDTA von der Zellkulturflasche gelöst. Es erfolgte die sterile Überführung in ein Falcon-Röhrchen sowie die Zentrifugation bei 1100 rpm für 5 Minuten. Nach Absaugen des Überstandes erfolgte die Resuspension der Zellpellets mit frischem Medium. Danach wurden die Neuroblastomzellen in ein neues Zellkulturgefäß mit frischem Medium überführt, in welchem sie für einen neuen Zyklus kultiviert wurden. Das Medium RPMI 1640 enthielt neben 10% FCS außerdem 1% Penicillin sowie Streptomycin, 1% L-Glutamin und 1% NEAA.

3.2.4 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Bei den verwendeten humanen Neuroblastomzellen besteht die Möglichkeit der dauerhaften Konservierung. Dazu waren einige Arbeitsschritte nötig, die hier im Folgenden beschrieben werden. Zunächst musste das Medium aus den Zellkulturflaschen aspiriert werden. Es folgte ein Waschvorgang mit PBS. Um die adhärenen Zellen zu lösen, wurde PBS/EDTA verwendet und anschließend wurde die Suspension bei 1100rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in FCS mit 10% DMSO in speziellen Kryoröhrchen aufgenommen und langsam bei -20°C eingefroren. Danach konnte die dauerhafte Lagerung bei -80°C im Gefrierschrank erfolgen. Wahlweise kann die Lagerung auch in flüssigem Stickstoff vollzogen werden. Eine weitere Methode für die Konservierung stellt das sofortige Einfrieren in Isopropanol bei -80°C dar, wobei die dauerhafte Lagerung in flüssigem Stickstoff erfolgt. Um die eingelagerten Zellen für eine neue Kultivierung zu nutzen, musste ein rasches Auftauen bei 37°C im Wasserbad erfolgen. Kurz vor dem kompletten Auftauen wurde die Suspension in vorgewärmtem Medium in ein Zellkulturröhrchen aufgenommen. Im Anschluss wurde zur Entfernung des DMSO eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 1100 rpm durchgeführt. Das Pellet konnte dann in frischem Medium in Zellkulturflaschen neu kultiviert werden. Im Anschluss an die hier beschriebenen Experimente erfolgte die Konservierung der Neuroblastomzellen in den Kühlanlagen des Labors für eventuell weiterführende Arbeiten.

3.2.5 Mikroskopie der Zellen

Vor den durchgeführten Versuchsreihen wurde die Zelldichte und die Vitalität der Neuroblastomzellen mit dem Mikroskop Axiovert 100 der Firma Carl Zeiss beurteilt. Über einen entsprechenden Aufsatz konnte die Kamera AxioCam ICc1 der genannten Firma genutzt und die Beobachtungen bei Bedarf festgehalten werden. Sowohl bei der Kultivierung in Zellkulturflaschen als auch bei den Experimenten mit dem xCELLigence RTCA DB System auf *CIM*- und *E-Plates* wurde der Zustand der Neuroblastomzellen regelmäßig mikroskopisch überprüft.

3.2.6 Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Zellzahl mussten die adhärenen Neuroblastomzellen via PBS/EDTA aus den Zellkulturflaschen gelöst werden. Nach der Zentrifugation bei 1100 rpm für 5 Minuten wurde das Zellpellet in 5 mL frischem Medium resuspendiert. In einer Eppendorf-Tube erfolgte

anschließend die Vermischung von 10 µL des Mediums mit Zellen mit 10 µL Trypanblau sowie der Transfer auf eine Neubauer-Zählkammer. Es folgte eine Doppelbestimmung der Zellzahl in dem *Countess automated cell counter*. Unter Berücksichtigung der Verdünnung konnten so die exakten Zellzahlen für die Experimente bestimmt werden.

3.2.7 Glykierung

Für die Glykierung der Neuroblastomzellen und der Matrixproteine wurde MGO in einer Konzentration von 1 mM über einen Zeitraum von 4 Stunden genutzt. Nach lichtmikroskopischer Untersuchung wurde ab einer Konfluenz der Zellen von circa 80 % mit den Untersuchungen begonnen. Zunächst soll hier auf die Glykierung der Neuroblastomzellen eingegangen werden. Vor der eigentlichen Reaktion wurden die Zellen zweifach mit serumfreiem Medium gewaschen, um Reste des FCS zu entfernen. MGO wurde dann dem Zellkulturmedium RPMI 1640 beigesetzt. Die Reaktion lief unter serumfreien Bedingungen, also in Abwesenheit von FCS, ab. Der Zeitraum der Reaktion betrug stets 4 Stunden und fand im Inkubator statt. Im Anschluss wurde der Überstand an Medium entfernt. Durch Zugabe von serumhaltigem Medium über einen Zeitraum von 5 Minuten wurde die Reaktion gestoppt. Für die Kontrollen wurde anstatt MGO nur serumfreies Medium in die Zellkulturflaschen pipettiert. MGO wurde ebenfalls in gleicher Konzentration für die Glykierung der Matrixproteine genutzt, ebenfalls für einen Zeitraum von 4 Stunden. Das Reagenz wurde hierfür in DPBS gelöst. Im Anschluss wurde Glycin-Ethyl-Ester-Hydrochlorid für eine Stunde hinzugefügt. Es folgten zwei Waschvorgänge mit DPBS und das Blocken mit 0,5 % Rinderalbumin in DPBS für 20 Minuten bei 37°C.

3.2.8 MTT-Test

Der MTT-Test dient der Viabilitätsprüfung der Zellen. Bei diesem Experiment wurden glykierte mit nicht-glykierten Zellen verglichen, um den Effekt des MGO auf die Lebendzellzahl zu untersuchen. Dazu wurden 96-well Platten genutzt, in welche nach Zellzählung pro Kammer 1×10^4 Kelly-Zellen in 100 µL Medium zur Inkubation über Nacht pipettiert wurden. In die Hälfte der Wells wurden glykierte Zellen hinzugefügt. Die restlichen Wells enthielten unbehandelte Zellen. Die Glykierung der Zellen erfolgte durch 1 mM MGO über 4 Stunden. So wurden die Voraussetzungen für einen Vergleich von behandelten und unbehandelten Zellen geschaffen. Am Folgetag wurde das Medium entfernt und durch 20 µL der MTT-Lösung ersetzt. Diese hatte eine Konzentration von 5 mg 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazoliumbromid pro 1

mL PBS. Es folgte eine Inkubation von 4 Stunden bei 37°C. Das restliche Medium wurde per Multichannel-Pipette abgesaugt und 150 µL DMSO in die Wells gegeben. Die 96-well Platten wurden danach für 15 Minuten auf einem Schüttler gelagert. Direkt im Anschluss erfolgte die Messung bei einer Wellenlänge von 560 nm im ELISA-Reader Multiskan EX. Grundlage dieses Tests ist die Reduktion des gelben, wasserlöslichen 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazoliumbromid in blau-violettes, wasserunlösliches Formazan. Diese Reduktion des Farbstoffes geschieht hauptsächlich durch die Reduktionsäquivalente NADH sowie NADPH und ist somit abhängig von Enzymen des Endoplasmatischen Retikulums. Ein kleinerer Teil der Reduktion in Formazan erfolgt durch die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase. Da die Reaktion funktionsfähige Enzyme voraussetzt, welche nur in vitalen Zellen vorkommen, kann aus der Messung des Formazan zweier unterschiedlicher Proben auf die Beeinflussung der Zellviabilität geschlossen werden (Mosmann 1983).

3.2.9 Durchflusszytometrie

Für die Durchflusszytometrie wurde das Modell Accuri C6 der Firma BD Biosciences genutzt. Dabei handelt es sich um spezielle Unterform des FACS (*Fluorescence activated cell sorting*). Der Begriff FACS ist urheberrechtlich geschützt und Eigentum von Becton, Dickinson and Company. Lan Herzenberg entwickelte diese Methode (Hulett et al. 1969) und gewann dafür im Jahr 2006 den Kyoto-Preis. Die Untersuchung basiert auf Emission von optischen Signalen der Zellen. Dabei wird durch Vibration jede Zelle einzeln in einer schmalen Küvette an einem Laserstrahl vorbeigeführt und die Strahlung von einem Detektor registriert. Durch Registrierung von einer hohen Zellzahl (> 1000 Zellen / Sekunde) erhält man schnell repräsentative Ergebnisse zur untersuchten Zellpopulation. Durch fluoreszenzmarkierte Antikörper kann eine Sortierung anhand der gesuchten Merkmale erfolgen (Hulett et al. 1969). Für dieses Experiment wurden $0,3 \times 10^6$ Kelly-Zellen in eine Zellkulturflasche gesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach einem Waschvorgang mit serumfreiem Medium erfolgte bei der Hälfte der Proben die Glykierung mit 1 mM MGO über 4 Stunden. Mit serumfreiem Medium behandelte Proben dienten als Negativ-Kontrolle. Die Glykierung wurde durch einen Wechsel auf serumhaltiges Medium beendet. Im Anschluss erfolgte durch PBS/EDTA die Ablösung der Zellen sowie die Überführung in Eppendorf-Tubes. Bei 4°C erfolgte die Zentrifugation bei 2000 rpm für 5 Minuten. Danach wurden 100 µL RPMI 1640 mit 5% FCS sowie die primären Antikörper in einer Konzentration von 1:100 hinzu pipettiert. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten folgten 2

Waschschritte mit PBS und erneut eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 2000 rpm. Anschließend wurde der fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper DyLight 488 in einer Verdünnung von 1:250 für 45 Minuten hinzugefügt. Für diese Reaktion wurden die *Tubes* auf Eis gelagert. Es folgten 2 weitere Waschvorgänge mit jeweils 1 mL eiskaltem PBS. Für das Experiment wurden zwei interne Kontrollen angefertigt. Zum einen wurden glykierte Zellen jeweils mit dem entsprechenden IgG-Antikörper inkubiert, was als Isotopenkontrolle dienen sollte. Zum anderen wurden glykierte Zellen nur mit dem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper inkubiert, um einen Wert für die Hintergrundaktivität dieses Antikörpers zu haben. Zum Schluss wurden die Messungen der in 600 μ L eiskaltem PBS gelösten Proben durchgeführt. Durch den Laser gelangten die Proben in einen angeregten Zustand und emittierten Licht mit einer Wellenlänge von 518 nm. Diese Emission war Gegenstand der vorliegenden Messung.

3.2.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Ulrich K. Laemmli, Professor und Lehrstuhlinhaber für Biochemie und Molekulare Biologie an der Universität Genf, entwickelte im Jahre 1970 die SDS-PAGE. Dabei steht die Abkürzung für *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis*. Da SDS als anionisches Tensid die Eigenladungen der Proteine überdeckt, können selbige in einem elektrischen Feld nach Molekulargewicht aufgetrennt werden. Unter SDS-Beladung herrscht eine konstante Negativladung. Positive Ladungen sind im basischen Bereich des Trenngels zu vernachlässigen, sodass die Objekte zur Anode wandern. Durch vorhergehendes Erhitzen auf 95°C werden Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine durch Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen und die Moleküle linealisiert. Große Proteine können durch die Poren des Trenngels langsamer zur Anode wandern als kleinere, wobei die Porengröße durch den Acrylamidanteil bestimmt wird (Laemmli 1970).

Für die Experimente dieser Arbeit wurden für die Elektrophorese Gelapparaturen der Firma C.B.S. Scientific Company verwendet. Es fanden 10%-ige Acrylamid-Gele Verwendung, welche eigenständig hergestellt wurden. Diese wurden bis circa 15 mm unterhalb der oberen Glasplattenkante gegossen und zur Polymerisierung mit Isopropanol überschichtet. Anschließend wurde das Sammelgel angefertigt. Für die SDS-PAGE wurden jeweils 5×10^6 Zellen in eine Zellkulturflasche gesät und für 24 Stunden inkubiert. Am Folgetag wurde ein Teil der Flaschen nach lichtmikroskopischer Kontrolle der Konfluenz mit MGO bzw. serumfreiem

Medium behandelt. Die Kelly-Zellen wurden nach der Behandlung mit 1 mM MGO über 4 Stunden mit PBS/EDTA von den Zellkulturflaschen gelöst und das Pellet mit 250 µL RIPA-Puffer sowie 0,5 µL Protease-Inhibitor-Cocktail versehen, um 20 Minuten in einer Eppendorf-Tube auf Eis zu reagieren. Es folgte die Zentrifugation bei 10.000 rpm für 10 Minuten bei 4°C. Das entstandene Zellpellet wurde in 300 µL PBS aufgenommen. Pellet und Lysat konnten auch für weiterführende Untersuchungen bei -80°C gelagert werden. Die Proben wurden dann mit reduzierendem SDS-Probenpuffer für 5 Minuten bei 95°C behandelt. Das Einlaufen der Proben in das Sammelgel fand unter konstanter Spannung von 100 V statt. Nach Erreichen des Trenngels wurden die Proben bei 140 V aufgetrennt. Als Größenmarker für spätere analytische Zwecke fand die *Page ruler prestained protein ladder* der Firma Fermentas Verwendung.

3.2.11 Western Blot

Der Western Blot wurde im Jahre 1979 von Robert Nowinski im Fred Hutchinson Cancer Research Center Seattle und von Professor George R. Stark an der Universität Stanford unabhängig voneinander entwickelt. Diese Methode erlaubt die Übertragung der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran. Es schließt sich die Reaktion der Epitope der übertragenen Proteine über nicht-kovalente Bindung mit spezifischen Antikörpern. An die F_c-Region des primären Antikörpers kann ein sekundärer peroxidasegekoppelter Antikörper binden, welcher eine Detektion ermöglicht (Renart et al. 1979).

Für die durchgeführten Experimente wurde die Blotapparatur der Firma C.B.S. Scientific Company für das Tank-Blot-Verfahren genutzt. Es wurden zunächst die Nitrocellulosemembran und das Whatmanpapier im Transferpuffer äquilibriert und danach der Sandwichblot luftblasenfrei zusammengesetzt. Beim Blotten war die Nitrocellulosemembran stets der Anode zugewandt. Der folgende Proteintransfer erfolgte bei 300 mA Stromstärke für 90 Minuten bei einer Temperatur von 4°C. Für die Darstellung der transferierten Proteine wurde die reversible Anfärbung mit Hilfe der Ponceaurot-Färbelösung genutzt. Die Membranen wurden dazu circa 60 Sekunden in der Lösung geschwenkt und anschließend mit *Aqua bidestillata* gespült, wodurch die Proteinbanden sichtbar wurden. Für die Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die Blots durch einen Waschvorgang mit TBST vollständig entfärbt. Zuvor erfolgte das Blocken mit 3% Gelatine (CML) bzw. 5% Milchpulver (RAGE) für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach einem weiteren Waschvorgang mit TBST wurde der primäre Antikörper

hinzufügt, welcher über Nacht bei 4°C binden konnte. Am Folgetag wurde die Lösung mit dem primären Antikörper entfernt und die Membran dreifach für jeweils 10 Minuten mit TBST gewaschen. Danach konnte der peroxidase-gekoppelte sekundäre Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubieren. Anschließend wurde die Membran wieder dreifach für jeweils 10 Minuten mit TBST gewaschen. Da der sekundäre Antikörper mit dem Enzym *Horseradish peroxidase* (Merrettichperoxidase) gekoppelt war, konnte eine Chemilumineszenz-Reaktion stattfinden. Die transferierten Proteine konnten mit der Chemilumineszenzlösung Luminata Forte reagieren und anschließend optisch dargestellt werden. Dazu wurden die Nitrocellulosemembranen auf eine passend zugeschnittene Kopierfolie gelegt und im Anschluss mit circa 2 mL der Lösung behandelt. Die Analyse gelang mit Hilfe des *Molecular Imager ChemiDoc XRS* der Firma BIO RAD.

3.2.12 Das xCELLigence RTCA DP System

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag bei den Experimenten zur Adhäsion und Migration der Neuroblastomzellen mit dem *Real-time cell analyser* (RTCA). Dieses Gerät wurde von der Firma ACEA Biosciences Inc. entworfen und erfuhr eine Weiterentwicklung durch die Firma Roche. Grundlage dieses Systems ist das *Electric Cell-substrate impedance sensing* (ECIS), was in der Wissenschaft weit verbreitet ist, um eukaryotische Zellen *in vitro* zu untersuchen. Die Zellen wachsen dabei auf Goldfilm-Elektroden einer Petrischale, welche die Impedanz über die Zeit registrieren können. Es lassen sich somit Informationen über Adhäsion, Invasion, Migration, Proliferation sowie Funktionsfähigkeit und Vitalität der Zellen in Echtzeit erfassen (Xiao et al. 2002).

Die Plasmamembran jeder Zelle hat isolierende Eigenschaften, wodurch sich die Zellen wie dielektrische Elemente verhalten. Mit zunehmender Adhäsion und steigendem Bewuchs der Goldfilm-Elektroden wird sich also der Wechselstromwiderstand, auch Impedanz genannt, erhöhen. Das RTCA-Gerät kann diese Impedanz als Funktion der Zeit mit einer oder mehreren Frequenzen aufzeichnen. Der Zellindex ist die entsprechende Einheit dieser relativen Veränderung der elektrischen Impedanz in Echtzeitstatus. Beeinflussende Faktoren für den Zellindex sind die Entwicklung der Gesamtzellzahl, die Stärke der Adhäsion sowie die Zellmorphologie (Giaever und Keese 1993). Durch die kontinuierliche Aufzeichnung des

Zellindex auf dem integrierten Laptop kann dieser auch für bioanalytische Zwecke genutzt werden (ACEA Biosciences Inc. 2014).

Die in den Experimenten verwendeten *CIM*- und *E-Plates* sind mit einer 80%-Gold-beschichteten Mikroelektrode ausgestattet und mit einer biokompatiblen Oberfläche versehen, was adhärentes Wachstum der Neuroblastomzellen erlaubt. Um optimale und vor allem identische Bedingungen zu gewährleisten, wurden alle der 16-Wellen vor den Versuchen speziell vorbereitet. Für die Untersuchungen zur Adhäsion wurden die Wells zunächst 1 Stunde mit Laminin, Fibronectin und Kollagen IV bei einer Konzentration von 20 µg/mL in PBS bei 37°C inkubiert. Es folgten zwei Waschvorgänge mit 150 µL PBS. Anschließend wurde in 6 der 16 Wells 1 mM MGO für 4 Stunden bei 37°C zur Glykierung beigefügt. Die Kontroll-Wells (6 Wells) wurden mit PBS gefüllt. Für die Negativ-Kontrolle (4 Wells) wurden keine Adhäsionsproteine in die Wells eingefügt. Glycin-Ethyl-Ester wurde danach in die Wells für 1 Stunde bei 37°C hinzugefügt. Es folgten 3 Waschvorgänge mit 150 µL PBS. Außerdem wurden 150 µL PBS über Nacht in den Wells belassen, um Reste der Reagenzien zu entfernen. Am Folgetage geschah ein weiterer Waschvorgang mit 150 µL PBS und das Blocken mit 0,5% BSA (Bovines Serumalbumin) für 20 Minuten bei 37°C. Nach der Zählung der Zellen wurden 5×10^3 Zellen in jedes Well pipettiert. Danach wurde das xCELLigence RTCA Gerät für 10 Stunden gestartet, dabei Betrug das Messintervall 5 Minuten. Bei der Messung herrschten konstant 37°C bei steter Begasung mit 5% CO₂.

Die *CIM-Plates* für das Migration-Assay bestehen aus einer oberen und einer unteren Kammer, welche durch eine poröse Membran getrennt sind. Diese erlaubt gerichtete Migration der Zellen zu einem präferierten Medium. In die untere Kammer wurden 160 µL serumhaltiges Medium (12 Wells) sowie auch serumfreies Medium (4 Wells) für die Negativ-Kontrolle pipettiert. In die obere Kammer wurden 50 µL serumfreies Medium eingefügt und die *CIM-Plate* für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Zählung wurden 5×10^5 Kelly-Zellen in 100 µL serumfreies Medium in die obere Kammer pipettiert. Dabei erfolgte die Zugabe von glykierten Zellen in 6 der 16 Wells sowie die Zugabe unbehandelter Zellen die in restlichen 10 Wells, wobei 4 Wells als Negativ-Kontrolle dienen. Die *CIM-Plate* wurde zunächst für den Zeitraum von 30 Minuten bei 37°C inkubiert bevor die Messung für 48 Stunden bei einem Messintervall von 15 Minuten begann. Somit konnte das Migrationsverhalten glykiertter Zellen mit Kontrollproben gegen serumhaltiges Medium untersucht werden. Auch dieser Versuch fand bei 37°C mit 5% CO₂-Begasung statt.

4 Ergebnisse

4.1 Zellviabilität

Als Grundlage für die Untersuchungen an den Neuroblastomzellen wurde zunächst der Einfluss von MGO auf die Zellviabilität der ausgewählten Kelly-Zellen geprüft. Dies erfolgte mittels MTT-Test. Dafür wurde eine Zellpopulation gesplittet. Für dieses Experiment wurde eine Zellreihe für vier Stunden mit 1 mM MGO glykiert und mit einer unbehandelten Kontrolle verglichen. Beides geschah in serumfreiem Medium. Im Anschluss an die Waschschriffe erfolgte die Analyse. Der Versuch wurde in doppelter Ausführung angefertigt und es wurde jeweils mit Mehrfachbestimmungen (n=96) gearbeitet. In der graphischen Darstellung sind jeweils die Mittelwerte aller Proben inklusive deren Standardabweichungen abgebildet, siehe Abbildung 9.

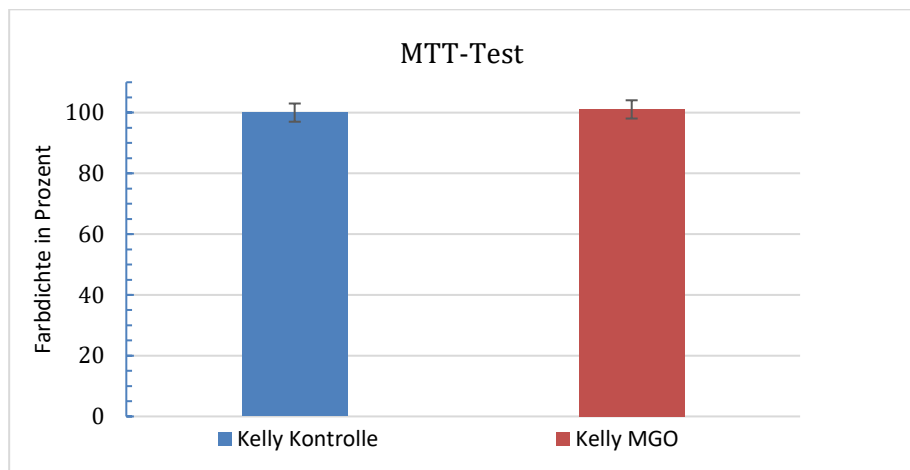


Abb. 9: Darstellung Farbdichtemessung im MTT-Test

Abbildung 9 zeigt die gemessene Farbdichte von Formazan bei 560nm im *ELISA-Reader* nach erfolgtem MTT-Test. Gegenübergestellt sind die Kontrollprobe (blauer Balken) und die glykierte Probe nach 4-stündiger Behandlung mit 1 mM MGO (roter Balken). Die Messwerte werden als Prozentwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen abgebildet.

Grundlage dieses Versuches ist die Umwandlung von Dimethylthiazol-diphenyltetrazoliumbromid durch Enzyme des endoplasmatischen Retikulums in wasserunlösliches Formazan, welches nur in intakten Zellen möglich ist. Gemessen wurde die Intensität des Farbstoffes bei 560nm im *ELISA-Reader Multiskan Ex*. Diese gemessene Intensität gilt als Maß für die Reduktion des Farbstoffes und gibt somit Auskunft über den Anteil der lebenden Zellen. Die entsprechenden Werte der Intensitätsmessung wurden zur besseren Anschaulichkeit in Prozentwerten abgebildet. Abbildung 9 zeigt diese prozentualen Werte der

Messung der Farbdichte für unbehandelte Kelly-Zellen (blauer Balken), welche hier als Referenz mit 100% gesetzt wurde sowie für glykierte Kelly-Zellen (roter Balken), die einen Wert von 101,06% erreichten. Der absolute Unterschied zwischen beiden Proben beträgt 1,06%. Überprüfungen der Werte durch den t-Test zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen glykierten und nicht glykierten Zellen, sodass keine Beeinträchtigung der Viabilität durch die Glykierung mit MGO ersichtlich wurde.

4.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient zur Detektion von Signalen lebender Zellen auf der Zelloberfläche. In der hier durchgeführten Durchflusszytometrie sollte untersucht werden, ob bei mit MGO behandelten Neuroblastomzellen eine Bindung der spezifischen Antikörper für CML und RAGE möglich ist und diese sich als Fluoreszenz messen lässt. Dieser Versuch wurde in doppelter Ausführung durchgeführt. Die Abbildungen stellen ein repräsentatives Ergebnis der Untersuchungen dar.

Für diesen Versuch wurden jeweils $0,3 \times 10^6$ Zellen des Typs Kelly in Kulturflaschen gesät. Die Glykierung erfolgte für vier Stunden unter serumfreien Bedingungen mit 1 mM MGO. Nach den Waschsritten folgte die Inkubation mit dem primären und einem speziellen fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper. Als interne Kontrolle wurden die glykierten Zellen einmal nur mit dem sekundären Antikörper und einmal nur mit einem entsprechenden IgG-Antikörper versehen. Die Reaktion mit dem sekundären Antikörper soll als Anhalt für die Grundaktivität der Fluoreszenz bei der Messung dienen. Die Zugabe des IgG-Antikörpers soll ebenfalls der Kontrolle dienen, da dieser an keines der Antigene binden soll. Diese Isotopenkontrolle soll als Maß für die Grundaktivität durch unspezifische Bindung des Primärantikörpers dienen. Die Messwerte für unbehandelte Zellen ohne Zugabe von Antikörpern dient als Negativ-Kontrolle und wird nicht abgebildet. Im Anschluss an die Reaktionen mit den beschriebenen Antikörpern wurde die Fluoreszenz bei 518 nm gemessen.

4.2.1 Nachweis von CML

Für den Nachweis von CML in dem durchgeführten FACS fanden polyklonale Ziege-anti-Maus-Antikörper des Typs DyLight 488 der Firma Abcam Verwendung. Dieser fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper zeigt seine Emission bei 518nm und bindet an die IgG-Domäne. Die

Fluoreszenzwerte in logarithmischer Darstellung mit der Anzahl der Detektion für die Versuchsreihe mit den oben genannten Antikörpern zeigt Abbildung 10.

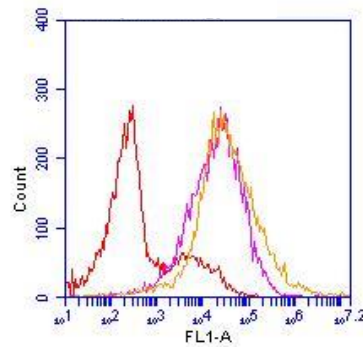


Abb. 10 : Darstellung Durchflusszytometrie für CML

Die Abbildung zeigt die logarithmische Darstellung der Fluoreszenzmessung glykierter Kelly-Zellen bei 518 nm für CML. Der rote Graph steht für die Probe mit sekundärem Antikörper. Der Graph der Farbe Magenta steht für die Probe mit dem IgG-Kontrollantikörper. Der gelbe Graph zeigt die Messwerte für die Probe mit Primär- und Sekundärantikörper für CML.

In der Abbildung 10 zeigt der rote Graph die Fluoreszenzwerte für glykierte Zellen mit Sekundärantikörper, welche die niedrigsten Werte dieser Messung erreichen. Die Probe mit dem IgG-Antikörper wird durch den Graphen der Farbe Magenta dargestellt. Die Werte für die Messung mit primärem und sekundärem Antikörper zeigt der gelbe Graph, welcher hier die höchsten Werte dieser Fluoreszenzmessung erreichte. Da die Fluoreszenzwerte hier in logarithmischer Darstellung abgebildet sind, wurde zur besseren Gegenüberstellung eine weitere Graphik mit prozentualen Werten gewählt. Die Werte für die Probe mit primärem und sekundärem Antikörper wurde als Referenzwert errechnet und entspricht 100%. Abbildung 11 soll den Vergleich der Fluoreszenzwerte für die einzelnen Proben darstellen.

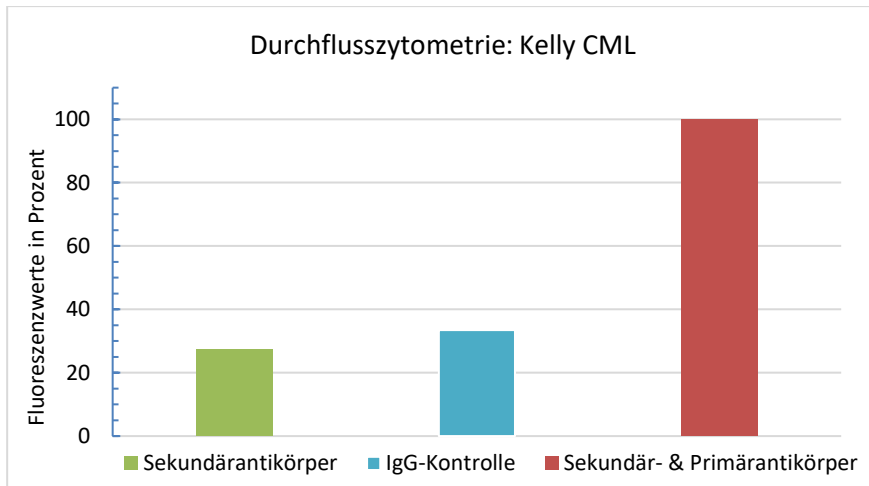


Abb. 11: Darstellung der Fluoreszenzmessung für CML

Abbildung 11 zeigt die prozentuale Darstellung der Fluoreszenzmessung glykierter Kelly-Zellen bei 518 nm für CML. Referenzwert ist die Probe mit Primär- und Sekundärantikörper mit 100%, dargestellt als roter Balken. Der grüne Balken steht für die Probe mit Sekundärantikörper. Der blaue Balken zeigt die Messwerte der Probe mit IgG-Kontrollantikörper.

Die Hintergrundaktivität der Fluoreszenz soll durch die Probe mit Sekundär- und ohne Primärantikörper dargestellt werden. Diese Probe wird durch den grünen Balken verkörpert und hat einen Wert von 27,35% im Vergleich zur Referenz. Der blaue Balken steht für die Fluoreszenzwerte des IgG-Antikörpers als Isotopenkontrolle mit einem Wert von 33,46% im Vergleich zum Referenzwert. Wie oben bereits erwähnt dient die Probe mit Sekundär- und Primärantikörper hier als Referenz mit 100% und wird durch den roten Balken dargestellt. Nach Behandlung der Zellen mit MGO sind deutliche Fluoreszenzsignale in der Durchflusszytometrie für den ausgewählten CML-Antikörper zu sehen. Die interne Kontrolle durch den IgG-Antikörper verdeutlicht die spezifische Bindung des Primärantikörpers.

4.2.2 Nachweis von RAGE

Unter gleichen Bedingungen erfolgte die Durchflusszytometrie für den Nachweis von RAGE mit polyklonalen Ziege-anti-Kaninchen-Antikörpern, welche ebenfalls fluoreszenzmarkiert sind. Die Messung erfolgte bei 518 nm. Abbildung 12 zeigt die logarithmische Darstellung der Fluoreszenzwerte in der Durchflusszytometrie mit der zugehörigen Anzahl der Detektionen.

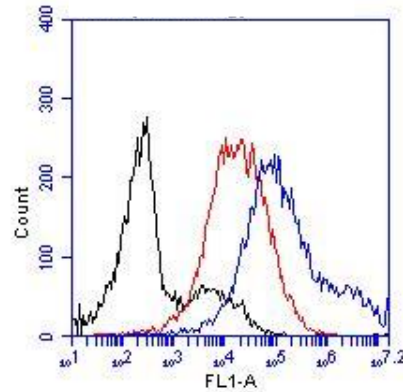


Abb. 12:

Darstellung Durchflusszytometrie für RAGE

Die Abbildung zeigt die logarithmische Darstellung der Fluoreszenzmessung glykierter Kelly-Zellen bei 518 nm für RAGE. Der schwarze Graph steht für die Probe mit Sekundärantikörper. Der rote Graph steht für die Probe mit dem IgG-Kontrollantikörper. Der blaue Graph zeigt die Messwerte für die Probe mit Primär- und Sekundärantikörper für RAGE.

Die Werte für die IgG-Kontrolle sind durch den schwarzen Graphen dargestellt, welche hier die niedrigsten Werte der Fluoreszenzmessung aufweisen. Die Fluoreszenzhintergrundaktivität soll durch die Probe mit sekundärem und ohne primären Antikörper verdeutlicht werden. Diese wird durch den roten Graphen dargestellt. Die Probe mit beiden Antikörpern entspricht in der Abbildung dem blauen Graphen und erreicht die höchsten Werte dieser Messreihe. Zur besseren Gegenüberstellung der Fluoreszenzwerte wurde auch hier eine Graphik mit prozentualen Werten entworfen. Als Referenz wurde auch hier die Probe mit primärem und sekundärem Antikörper gewählt und mit 100% bewertet.

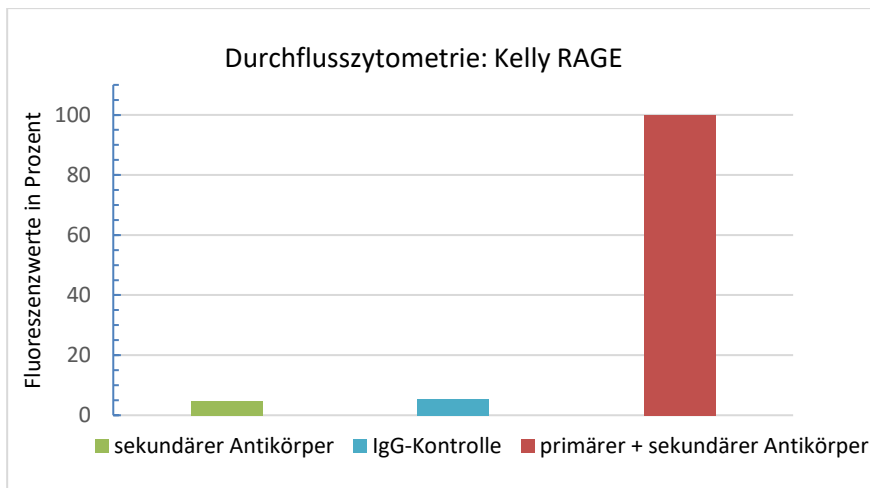


Abb. 13: Darstellung der Fluoreszenzmessung für RAGE

Abbildung 13 zeigt die prozentuale Darstellung der Fluoreszenzmessung glykierter Kelly-Zellen bei 518 nm für RAGE. Referenzwert ist die Probe mit Primär- und Sekundäantikörper mit 100%, dargestellt als roter Balken. Der grüne Balken steht für die Probe mit Sekundäantikörper. Der blaue Balken zeigt die Messwerte der Probe mit IgG-Kontrollantikörper.

Abbildung 13 zeigt den Vergleich der drei untersuchten Proben. Der grüne Balken steht für die Probe mit Sekundär- und ohne Primäantikörper mit einem Wert von 4,76% im Vergleich zum Referenzwert. Der blaue Balken steht für die Probe mit dem IgG-Antikörper als Isotopenkontrolle. Diese erreicht einen Wert von 5,33%. Die Referenz stellt die Probe mit Primär- und Sekundäantikörpern dar und wird durch den roten Balken mit einem Wert von 100% verkörpert. Als Ergebnis zeigt sich ein deutliches Fluoreszenzsignal der Neuroblastomzellen nach Behandlung mit MGO in der Durchflusszytometrie unter Verwendung von RAGE-Antikörpern. Die Spezifität des Primäantikörpers wird durch die interne Kontrolle mit einem IgG-Antikörper verdeutlicht.

4.3 Western Blot

Im weiteren Verlauf wurde der Einfluss der Glykierung auf die Expression von RAGE und Bildung von CML im Vergleich zu unbehandelten Zellen untersucht. Als Methode wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blot gewählt, um sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre Veränderungen zu detektieren. Die Versuche dafür wurden in 3-facher Ausführung angefertigt, um die Aussagekraft der Einzelversuche zu validieren. Für die Ergebnispräsentation wurde ein repräsentatives Beispiel ausgewählt. Für dieses Experiment wurden jeweils 5×10^6 in Kulturflaschen gesät. Eine Zellreihe wurde unbehandelt belassen und

mit einer Probe nach Behandlung mit MGO verglichen. Die Dauer der Glykierung der Proben betrug abermals vier Stunden bei einer Konzentration von 1 mM, danach wurde die Reaktion durch Zugabe von Blockierungslösungen gestoppt. Im Anschluss an den Western Blot wurde eine Chemilumineszenzlösung hinzugefügt und das Ergebnis optisch im *Molecular Imager ChemiDoc XRS* ausgewertet.

4.3.1 Nachweis von CML

Zunächst soll hier der Vergleich unbehandelter Zellen mit glykierten Zellen hinsichtlich des Nachweises von CML dargestellt werden.

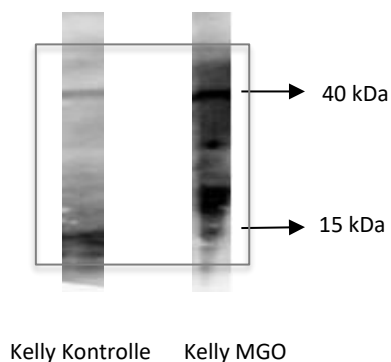


Abb. 14:

Western Blot zum Nachweis von CML im Bereich von 10-50 kDa

Die Abbildung zeigt auf der linken Seite den einen Ausschnitt des Western Blots der unbehandelten Kelly-Zellen. Auf der rechten Seite der Abbildung befindet sich der Ausschnitt des Western Blots der Kelly-Zellen nach 4-stündiger Behandlung mit 1mM MGO. Markiert ist der Bereich von 10-50 kDa.

Abbildung 14 zeigt die Western Blot-Analyse zur Untersuchung der CML-Expression. Im Bild stellt die linke Spur die unbehandelten Zellen dar, die rechte Spur steht für die glykierten Zellen. Deutlich erkennbar zeigt sich eine erhöhte Farbdichte der glykierten Probe im Vergleich zur Kontrolle, welche sich über einen breiten Bandenbereich von 10-50 kDa vollzieht. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Farbdichte der Banden elektronisch gemessen und in der kommenden Abbildung die Werte der beiden Proben gegenübergestellt.

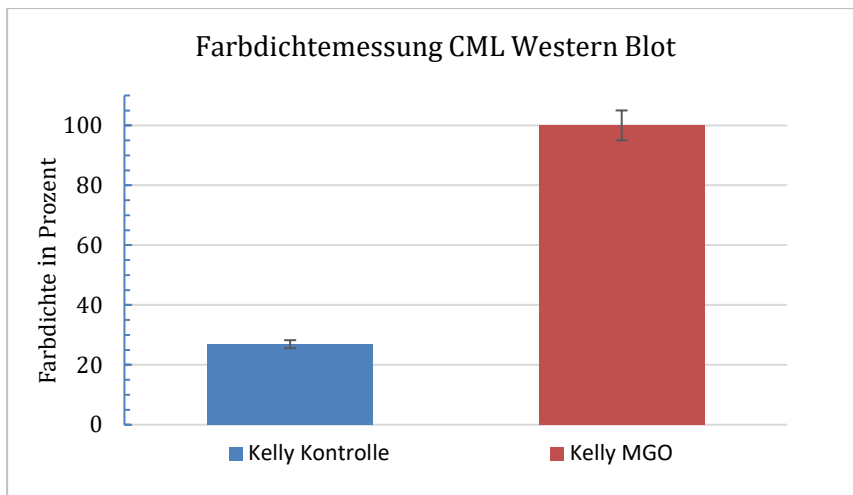


Abb. 15: Darstellung der densitometrischen Messung des Western Blot von 10-50 kDa

Abbildung 15 zeigt die densitometrische Messung zur Analyse der Western Blots ($n=3$) über einen Bereich von 10-50 kDa als Prozentwerte inklusive deren Standardabweichung. Der rote Balken repräsentiert die Messwerte für die Western Blots der Kelly-Zellen nach Behandlung mit MGO und stellt den Referenzwert dar. Der blaue Balken stellt die Messwerte für die Western Blots der unbehandelten Kelly-Zellen dar.

Abbildung 15 zeigt die densitometrische Messung der Banden im Western Blot zur Quantifizierung der Farbdichte als Maß für die Menge an gebildetem CML als Prozentwerte inklusive der dazugehörigen Standardabweichung. Balken 1 (blau) zeigt den Wert der Kontrollprobe, Balken 2 (rot) den Wert für die MGO-behandelten Zellen. Die Messung fand in einem Bereich von 10-50kDa statt. Die Dichtewerte der Proben wurde in Prozent umgerechnet, wobei der Wert der glykierten Probe als Referenz mit 100% gewertet wurde. Die unbehandelte Probe hat demnach im Messbereich einen Farbdichtewert von 26,90% im Vergleich zur Referenz erreicht. Somit ist eine deutliche Zunahme der Farbdichte durch Behandlung der Zellen mit MGO ersichtlich, was für eine gesteigerte Bildung von CML spricht.

4.3.2 Nachweis von RAGE

Im Folgenden soll der Einfluss einer Behandlung der Neuroblastomzellen mit 1 mM MGO über einen Zeitraum von vier Stunden hinsichtlich der Expression von RAGE im Western Blot im Vergleich zu unbehandelten Zellen dargestellt werden.

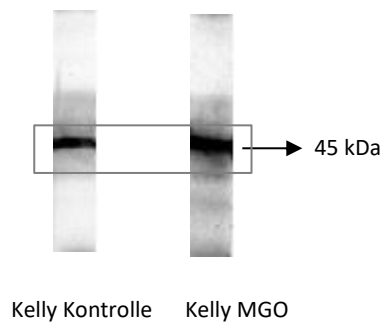


Abb. 16 Western Blot zur Expression von RAGE

Abbildung 16 zeigt im linken Bildabschnitt einen Ausschnitt des Western Blots zur Expression von RAGE von unbehandelten Kelly-Zellen. Im rechten Abschnitt befindet sich der Ausschnitt des Western Blots der Kelly-Zellen nach 4-stündiger Behandlung mit 1 mM MGO. Markiert ist die Bande bei 45 kDa, welches der Hauptbande des verwendeten RAGE-Antikörpers entspricht.

Abbildung 16 zeigt die Gegenüberstellung der Ausschnitte des Western Blots der beiden Proben. In der linken Spur ist die unbehandelte Kontrollprobe und in der rechten Spur die glykierte Probe dargestellt. Hier ist eine deutliche Dichtezunahme der Bande bei 45 kDa zu sehen, was der Hauptbande des verwendeten RAGE-Antikörpers entspricht. Zur Verdeutlichung wurde die Farbdichte dieser Bande elektronisch gemessen und in der kommenden Abbildung die Werte der beiden Proben gegenübergestellt.

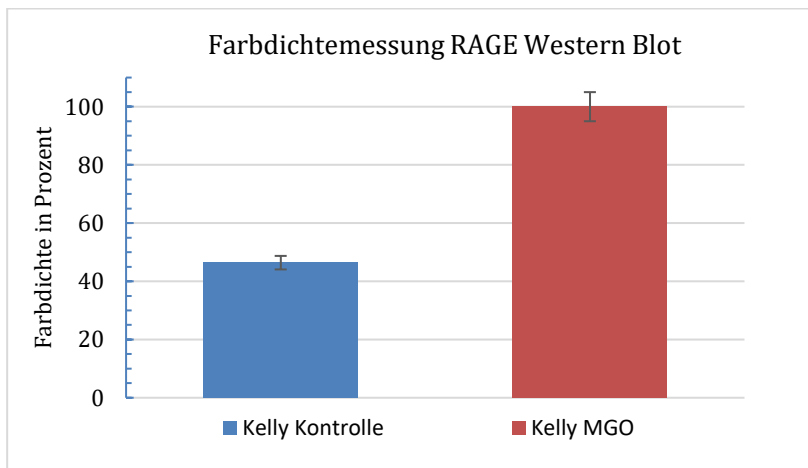


Abb. 17 Densitometrische Messung der Western Blots zur RAGE-Expression

Abbildung 17 zeigt die Messwerte der Farbdichtemessung der Western Blots (n=3) bei 45 kDa zur Expression von RAGE als Prozentwerte inklusive deren Standardabweichung. Der rote Balken repräsentiert die Western Blots der Kelly-Zellen nach Behandlung mit MGO und stellt den Referenzwert dar. Der blaue Balken stellt die Messwerte für die Western Blots der unbehandelten Kelly-Zellen dar.

Abbildung 17 zeigt die densitometrische Messung für die Bande bei 45 kDa. Die Werte der Western Blots sind hier als Prozentwerte abgebildet inklusive der dazugehörigen Standardabweichung. Die glykierte Probe, repräsentiert durch den roten Balken, wurde als Referenz ausgewählt und als 100% gewertet. Im Balkendiagramm entspricht der blaue Balken der unbehandelten Probe, welche einen Wert von 46,41% erreicht. Es zeigte sich eine deutliche Steigerung der Farbdichte im Messbereich. Somit ist eine deutliche Zunahme der Expression von RAGE durch Behandlung der Zellen mit 1 mM MGO nach vier Stunden ersichtlich.

4.4 Adhäsions-Assay

Die Analyse des Adhäsionsverhaltens der Zellen wurde in dem *Real-time-Cell-Analyzer* durchgeführt, welches auf einer Änderung der Impedanz nach Zellkontakt beruht. Die folgenden Experimente wurden in mehrfacher Ausführung angefertigt (n=18), um eine ausreichende Aussagekraft der Ergebnisse zu erreichen. Für die graphische Darstellung erfolgte die Errechnung der Mittelwerte der Daten inklusive deren Standardabweichung. Für die Untersuchung wurden die Substrate Laminin, Fibronectin und Kollagen IV ausgewählt, welche repräsentative Bestandteile der Basalmembran sind.

Die verwendeten *E-Plates* wurden zunächst eine Stunde mit dem jeweiligen Substrat inkubiert. Danach wurden sechs der 16 Wells vier Stunden mit MGO behandelt, die restlichen sechs Wells wurden mit PBS gefüllt. Nach den Waschschritten wurde in jede Kammer 5×10^3 Kelly-Zellen hinzugefügt. Eine Negativ-Kontrolle (vier Wells), welche kein Substrat enthielt, wurde als Leerwert ebenfalls gemessen. Die Messung der Adhäsion erfolgte im RTCA-Gerät für zehn Stunden mit einem Messintervall von fünf Minuten.

In den folgenden Abbildungen soll zunächst ein Vergleich einer unbehandelten mit der entsprechenden behandelten Probe erfolgen. Im Anschluss soll ein Vergleich der glykierten Substrate untereinander im Diagramm zur Darstellung kommen. Die graphischen Darstellungen basieren auf dem Zellindex (CI), welcher als Prozentwert abgebildet wird.

4.4.1 Adhäsion auf Laminin

Zunächst wurde die Adhäsion von Kelly-Zellen auf glykiertem Laminin nach 4-stündiger Behandlung mit 1 mM MGO untersucht und mit der Adhäsion auf unbehandeltem Laminin

verglichen. Als interne Kontrolle wurde die Adhäsion der Zellen auf den *E-Plates* ohne Substratzusatz untersucht.

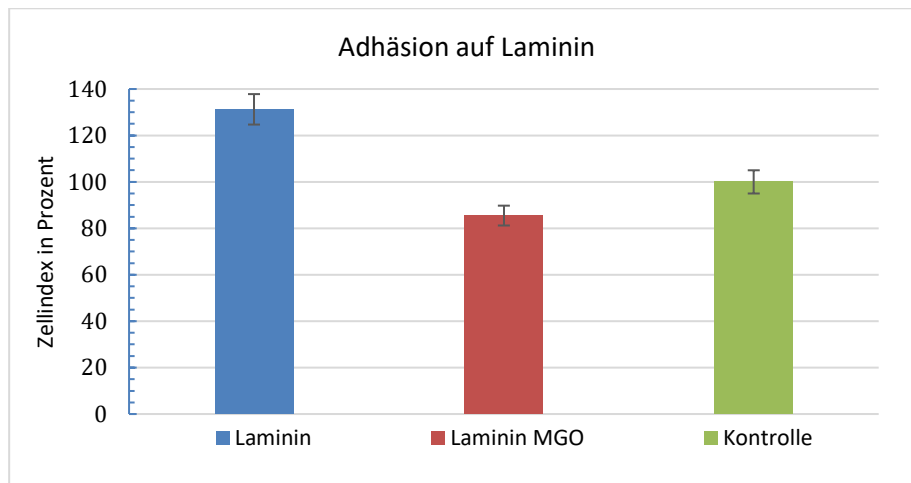


Abb. 18: Darstellung des Laminin-Adhäsions-Assays

Abbildung 18 zeigt die Zellindizes der Untersuchungen zur Adhäsion auf Laminin (n=18) im RTCA-Gerät als Prozentwerte inklusive der Standardabweichung. Der blaue Balken steht für die Adhäsion der Kelly-Zellen auf unbehandeltem Laminin. Der rote Balken zeigt die Adhäsion der Kelly-Zellen auf glykiertem Laminin. Die interne Kontrolle ist durch den grünen Balken dargestellt, welcher die Adhäsion ohne Zugabe eines Substrates zeigt.

Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse zur Untersuchung der Adhäsion auf Laminin (n=18) über einen Zeitraum von zehn Stunden bei einem Messintervall von fünf Minuten als Prozentwerte inklusive der dazugehörigen Standardabweichung. Der grüne Balken steht für die interne Kontrolle, welche die Adhäsion der Kelly-Zellen auf den *E-Plates* ohne Zusatz eines Substrates darstellt. Diese Kontrolle soll als Leerwert dienen und erreicht einen Wert von $CI = 0,479$. Für das Balkendiagramm wurde dieser Wert als Referenz mit 100% gewählt. Im Diagramm repräsentiert der blaue Balken die Adhäsion der Kelly-Zellen auf unbehandeltem Laminin und erreicht einen Zellindex von $CI = 0,623$. Dieser Wert entspricht 131,25% im Vergleich zur Kontrolle. Der rote Balken steht für die Probe nach 4-stündiger Behandlung des Substrates mit 1 mM MGO mit einem Wert von $CI = 0,406$, was 85,49% im Vergleich zur Kontrolle bedeutet. Durch Behandlung mit MGO zeigt sich eine reduzierte Adhäsion der verwendeten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Probe mit geringerem Zellindex als bei der Kontrollprobe. Daraus lässt sich schließen, dass glykiertes Laminin antiadhäsiv wirkt.

4.4.2 Adhäsion auf Fibronektin

Im Folgenden sind die Ergebnisse zur Untersuchung der Adhäsion der Kelly-Zellen auf Fibronektin nach 4-stündiger Behandlung mit 1 mM MGO sowie als Vergleich auf unbehandeltem Fibronektin dargestellt. Als interne Kontrolle wurde die Adhäsion der Zellen auf den *E-Plates* ohne Substratzusatz untersucht.

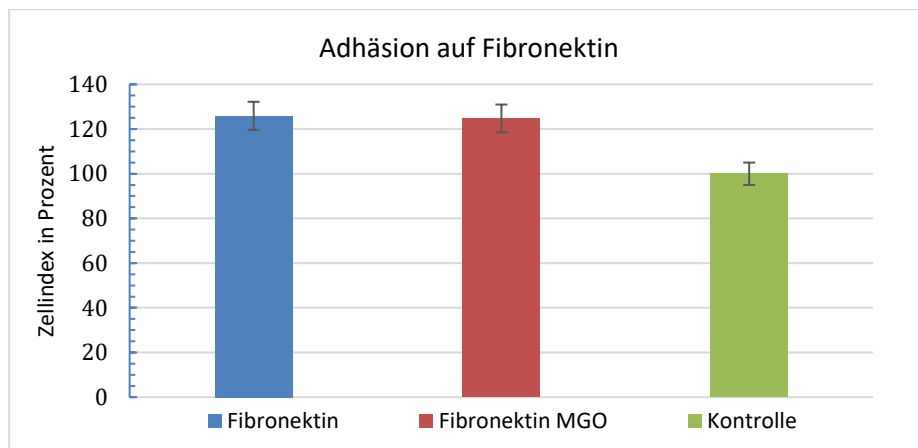


Abb. 19: Darstellung des Fibronektin-Adhäsions-Assays

Abbildung 19 zeigt die Zellindizes der Untersuchungen zur Adhäsion auf Fibronektin (n=18) im RTCA-Gerät als Prozentwerte inklusive Standardabweichung. Der blaue Balken steht für die Adhäsion der Kelly-Zellen auf unbehandeltem Fibronektin. Der rote Balken zeigt die Adhäsion der Kelly-Zellen auf glykiertem Fibronektin. Die interne Kontrolle ist durch den grünen Balken dargestellt, welche die Adhäsion ohne Zugabe eines Substrates zeigt.

Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse zur Untersuchung der Adhäsion der Proben auf Fibronektin (n=18) über einen Beobachtungszeitraum von zehn Stunden bei einem Messintervall von fünf Minuten als Prozentwerte inklusive der dazugehörigen Standardabweichung. Der grüne Balken steht für die interne Kontrolle und zeigt die Adhäsion der Zellen auf den *E-Plates* ohne Zugabe eines Substrates mit einem Zellindex von $CI = 0,479$. Dieser Wert wird hier als Referenz mit 100% gewertet und soll als Leerwert dienen. Der blaue Balken repräsentiert die Werte für die Adhäsion auf unbehandeltem Fibronektin mit einem Wert von $CI = 0,602$ und erreicht einen Wert von 125,92% im Vergleich zur Kontrolle. Der rote Balken mit einem Wert von $CI = 0,592$ steht für die glykierte Probe nach 4-stündiger Behandlung des Substrates mit 1 mM MGO. Dieser Wert entspricht 124,74% im Vergleich zur Kontrolle. Es zeigten sich nur geringfügige Abweichungen während des Beobachtungszeitraums von zehn Stunden durch die Glykierung des Substrates im Vergleich zur Probe mit unbehandeltem

Substrat. Insgesamt liegt der Zellindex auf dem gleichen Niveau wie bei den Untersuchungen auf unbehandeltem Laminin.

4.4.3 Adhäsion auf Kollagen IV

Im Folgenden sind die Ergebnisse zur Untersuchung der Adhäsion der Kelly-Zellen auf Kollagen IV nach 4-stündiger Behandlung mit 1 mM MGO sowie als Vergleich auf unbehandeltem Kollagen IV dargestellt. Als interne Kontrolle wurde die Adhäsion der Zellen auf den *E-Plates* ohne Substratzusatz untersucht.

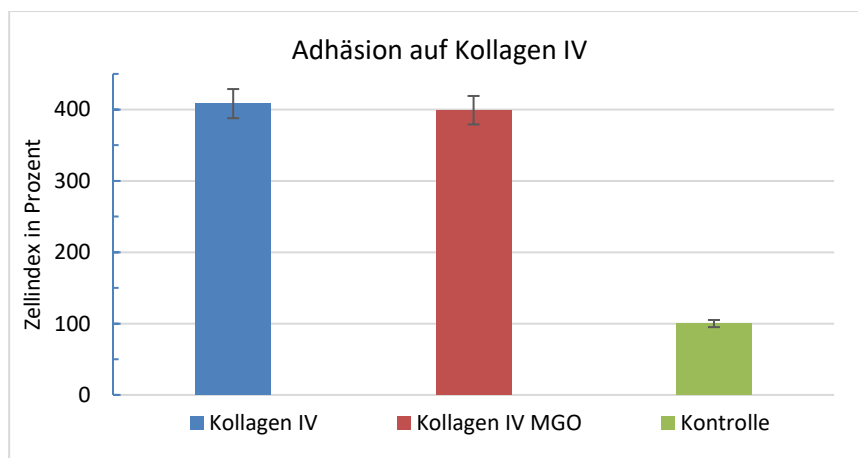


Abb. 20: Darstellung des Kollagen IV - Adhäsions-Assays

Abbildung 20 zeigt die Zellindizes der Untersuchungen zur Adhäsion auf Kollagen IV (n=18) im RTCA-Gerät als Prozentwerte inklusive Standardabweichung. Der blaue Balken steht für die Adhäsion der Kelly-Zellen auf unbehandeltem Kollagen IV. Der rote Balken zeigt die Adhäsion der Kelly-Zellen auf glykiertem Kollagen IV. Die interne Kontrolle ist durch den grünen Balken dargestellt, welche die Adhäsion ohne Zugabe eines Substrates zeigt.

Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse zur Untersuchung der Adhäsion der Proben auf Kollagen IV (n=18) über einen Beobachtungszeitraum von zehn Stunden bei einem Messintervall von fünf Minuten als Prozentwerte inklusive deren Standardabweichung. Der grüne Balken steht für die interne Kontrolle und zeigt die Adhäsion der Zellen auf den *E-Plates* ohne Zugabe eines Substrates mit einem Zellindex von $CI = 0,479$. Dieser Wert wird hier als Referenz mit 100% gewertet und soll als Leerwert dienen. Der blaue Balken repräsentiert die unbehandelte Probe mit einem Wert von $CI = 1,957$ und erreicht einen Wert von 408,32% im Vergleich zur Kontrolle. Der rote Balken repräsentiert die glykierte Probe nach 4-stündiger Behandlung des Substrates mit 1 mM MGO mit einem Wert von $CI = 1,913$. Dieser Wert entspricht 399,10% des

Kontrollwertes. Wie in der Darstellung zu erkennen ist, liegt der Zellindex der beiden Proben mit Substratzusatz auf annähernd gleichem Niveau.

Der Zellindex erreicht deutlich höhere Werte im Vergleich zu den beiden vorherigen Versuchen mit Laminin und Fibronektin. Dieser Sachverhalt soll in der Abbildung 21 verdeutlicht werden.

4.4.4 Vergleich der Substrate

Im Folgenden werden die Ergebnisse zur Untersuchung der Adhäsion der Kelly-Zellen auf glykiertem Laminin, Fibronektin und Kollagen IV gegenübergestellt, um die Unterschiede beim Zellindex zu verdeutlichen.

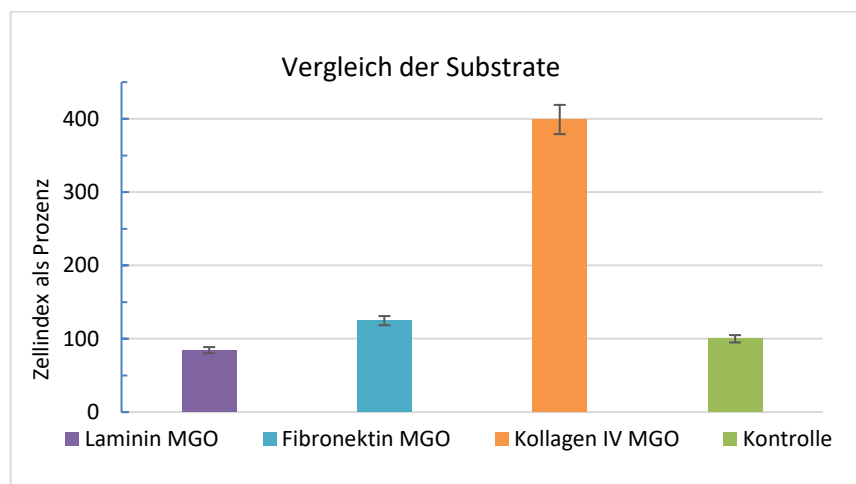


Abb. 21: Gegenüberstellung der glykierten Substrate beim Adhäsions-Assay

Abbildung 21 zeigt die Gegenüberstellung der Zellindizes zur Adhäsion der Kelly-Zellen auf glykiertem Substrat als Prozentwerte inklusive Standardabweichung ($n=18$). Der lila Balken zeigt die Adhäsion auf glykiertem Laminin. Die Adhäsion auf glykiertem Fibronektin wird durch den blauen Balken dargestellt. Der orange Balken zeigt die Adhäsion der Zellen auf glykiertem Kollagen IV.

Abbildung 21 zeigt den Vergleich der Zellindizes der verwendeten Kelly-Zellen auf den Substraten nach 4-stündiger Behandlung mit 1mM MGO über einen Zeitraum von zehn Stunden bei einem Messintervall von fünf Minuten als Prozentwerte inklusive der dazugehörigen Standardabweichung ($n=18$). Der grüne Balken steht für die interne Kontrolle und zeigt die Adhäsion der Zellen auf den *E-Plates* ohne Zugabe eines Substrates mit einem Zellindex von $CI = 0,479$. Dieser Wert wird hier als Referenz mit 100% gewertet und soll als Leerwert dienen. Der lila Balken verdeutlicht die Adhäsion der Kelly-Zellen auf glykiertem Laminin mit einem Zellindex von $CI = 0,406$, was 85,49% des Referenzwertes entspricht. Der blaue Balken steht für

die Adhäsion der Kelly-Zellen auf glykiertem Fibronectin mit einem Zellindex von $CI = 0,603$. Dieser Wert entspricht 124,74% des Referenzwertes. Der orange Balken zeigt den Wert für Kollagen IV. Der Zellindex lag bei dieser Probe bei $CI = 1,913$, was 399,10% im Vergleich zur Kontrolle entspricht.

Bei der Gegenüberstellung der MGO-behandelten Substrate zeigen sich deutliche Unterschiede, was den Zellindex betrifft. Der Zellindex auf glykiertem Kollagen IV erreicht mit Abstand die höchsten Werte, daher ist im Vergleich dort die Adhäsion am stärksten ausgeprägt. Die Werte auf Fibronectin liegen zwischen den beiden anderen Proben. Tendenziell ist die Adhäsion im Vergleich zur Kollagen IV deutlich schwächer ausgeprägt. Der Zellindex auf glykiertem Laminin erreicht bei dieser Untersuchung die geringsten Werte beim Zellindex, was auf eine antiadhäsive Wirkung durch Glykierung schließen lässt.

4.5 Migrations-Assay

Um die Invasivität der Neuroblastomzellen zu beurteilen wurden weitere Tests mithilfe des RTCA-Geräts durchgeführt. Diese Versuche zur Migration wurden ebenfalls in dreifacher Ausführung angefertigt und es wurde mit Mehrfachbestimmungen ($n=18$) gearbeitet, um eine möglichst hohe Aussagekraft zu erreichen. In den Darstellungen handelt es sich um die Mittelwerte des Zellindex sowie deren Standardabweichungen abzüglich des Leerwertes.

Für die Untersuchungen wurden *CIM-Plates* verwendet, die über eine obere und eine untere Kammer verfügen, welche durch eine poröse Membran getrennt sind. Die Zugabe der unbehandelten sowie behandelten Zellen erfolgte in die obere Kammer unter serumfreien Bedingungen, welche dann entlang des Konzentrationsgefälles in die untere Kammer mit serumhaltigen Medium migrieren.

Die Negativ-Kontrolle steht für die Messwerte der Migration der Neuroblastomzellen ohne Konzentrationsgefälle. Durch Zugabe von serumfreiem Medium in beide Kammern konnte dieses erreicht werden. Untersucht werden sollte der Einfluss der Glykierung auf das Migrationsverhalten der Neuroblastomzellen. Dafür wurden pro Well 5×10^5 Zellen hinzugefügt und sechs der 16 Wells für vier Stunden mit 1mM MGO behandelt und weitere sechs Wells wurden unbehandelt gelassen. Die restlichen vier Wells dienten als Kontrolle. Der Beobachtungszeitraum im RTCA-Gerät betrug 48 Stunden bei einem Messintervall von 15 Minuten.

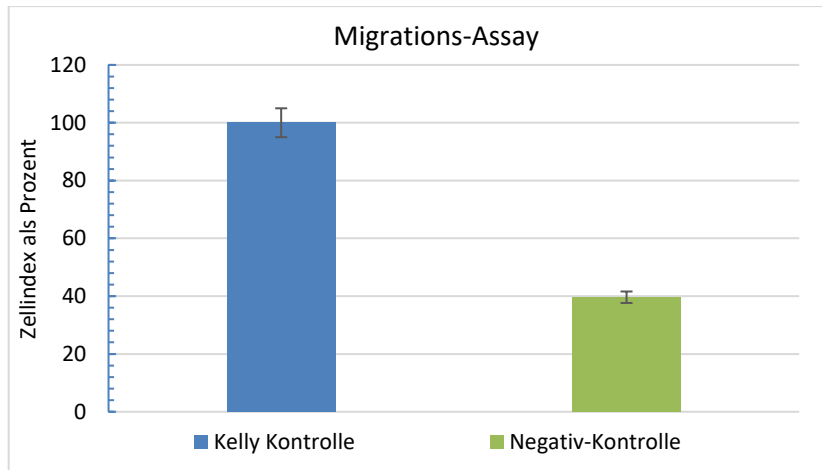


Abb. 22: Darstellung der Migration von unbehandelten Kelly-Zellen

Abbildung 22 zeigt die Darstellung der Ergebnisse zur Untersuchung der Migration ($n=18$) der Kelly-Zellen als Prozentwerte inklusive Standardabweichung. Der blaue Balken zeigt die Migration unbehandelter Kelly-Zellen durch die *CIM-Plates* zum präferierten Medium und ist hier der Referenzwert. Der grüne Balken steht für die Kontrolle und zeigt die Migration der Kelly-Zellen durch die *CIM-Plates* ohne Konzentrationsunterschied.

Abbildung 22 zeigt die Darstellung der Zellindizes zur Untersuchung der Migration der Kelly-Zellen unter Verwendung von *CIM-Plates* über einen Zeitraum von 48 Stunden bei einem Messintervall von 15 Minuten als Prozentwerte inklusive der jeweiligen Standardabweichung ($n=18$). Die Migration der unbehandelten Kelly-Zellen wird von dem blauen Balken repräsentiert und erreicht einen Zellindex von $CI = 0,057$. Dieser soll hier den Referenzwert mit 100% darstellen. Der grüne Balken steht für die Negativ-Kontrolle, welche die Migration unbehandelter Kelly-Zellen durch die Poren der *CIM-Plates* zeigt, wobei in der oberen und unteren Kammer serumfreies Medium vorlag und somit kein Konzentrationsunterschied herrschte. Diese Kontrolle erreichte einen Wert von $CI = 0,022$. Dieser Wert entspricht 39,63% des Referenzwertes.

Durch diesen Versuch wird gezeigt, dass es auch ohne Konzentrationsunterschied zu einer gewissen Migration durch die poröse Membran kommt und die Kelly-Zellen verstärkt in Richtung eines chemischen Attraktanz wandern.

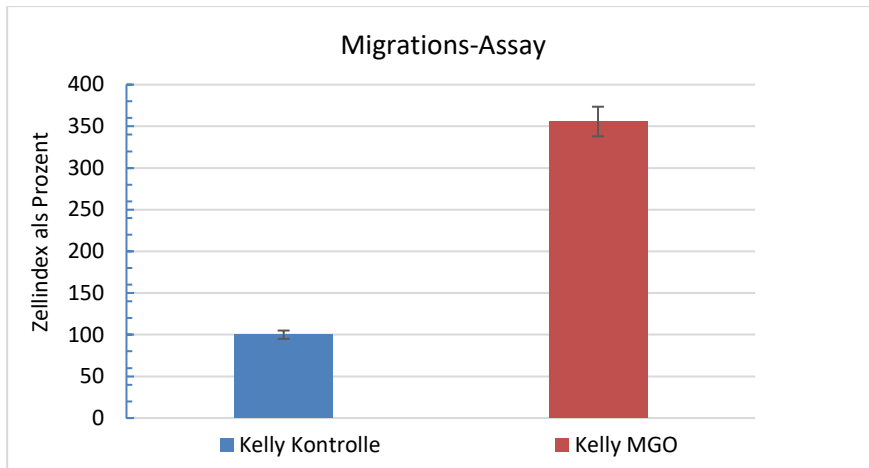


Abb. 23: Darstellung der Migration von glykierten und unbehandelten Kelly-Zellen

Abbildung 23 zeigt die Darstellung der Ergebnisse zur Untersuchung der Migration (n=18) der Kelly-Zellen als Prozentwerte inklusive Standardabweichung. Der blaue Balken zeigt die Migration unbehandelter Kelly-Zellen durch die *CIM-Plates* zum präferierten Medium und ist hier der Referenzwert. Der rote Balken steht für die Migration der glykierten Probe nach 4-stündiger Behandlung mit 1 mM MGO.

Abbildung 23 zeigt die Darstellung der Zellindizes zur Untersuchung der Migration der Kelly-Zellen unter Verwendung von *CIM-Plates* über einen Zeitraum von 48 Stunden bei einem Messintervall von 15 Minuten als Prozentwerte inklusive deren Standardabweichung (n=18). Die Migration der unbehandelten Kelly-Zellen wird von dem blauen Balken repräsentiert und erreicht einen Zellindex von $CI = 0,057$. Dieser soll hier den Referenzwert mit 100% darstellen. Der rote Balken zeigt die Migration der Kelly-Zellen nach 4-stündiger Behandlung mit 1 mM MGO. Der erreichte Zellindex von $CI = 0,2031$ entspricht 355,74% im Vergleich zur Referenz. Durch Glykierung ist hier eine deutliche Zunahme der Migration der verwendeten Kelly-Zellen um den Faktor 3,55 ersichtlich.

5 Diskussion

5.1 AGEs haben keinen Einfluss auf Zellviabilität

MGO ist ein zytotoxisches Nebenprodukt der Glykolyse und führt bei erhöhter Glukosezufuhr durch Bildung von AGEs zu Zellschäden (Chang und Wu 2006). Im Rahmen des Diabetes mellitus, bei welchem dauerhaft hohe Glukoselevel herrschen können, kommt es unter anderem deswegen zu verschiedenen pathologischen Effekten wie Neurodegeneration (Kuhla et al. 2005) oder vaskulären Komplikationen (Singh et al. 2014). Der Einfluss von MGO bei einer Konzentration von 1 mM über einen Zeitraum von vier Stunden auf die Viabilität der Zellen sollte hier zunächst untersucht werden.

In dem durchgeführten MTT-Test erfolgte die Gegenüberstellung von Neuroblastomzellen nach einer Behandlung mit 1 mM MGO für vier Stunden im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle. Die Farbdichtemessung ergab im Vergleich der behandelten Probe mit der Kontrolle lediglich eine Abweichung von 1,06%, siehe Abbildung 9. Gemessen wurde die Intensität des Farbstoffes Formazan bei 560nm im *ELISA-Reader Multiskan Ex*. Die Umwandlung von Dimethylthiazol-diphenyltetrazoliumbromid in wasserunlösliches Formazan erfolgt durch Enzyme des endoplasmatischen Retikulums. Da diese Umwandlung nur durch intakte Zellen geschehen kann, lässt sich ableiten, dass MGO in der verwendeten Konzentration von 1mM noch keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen hat. Die verwendete Konzentration ist deutlich über den Werten, die z.B. in einer Konzentration von rund 20 µM in menschlichem Liquor nachgewiesen wurden (Kuhla et al. 2005). Allerdings ist der Zeitraum, in dem dieses Reagenz auf die Zellen einwirken konnte, mit vier Stunden vergleichsweise gering.

Vergleichbare Ergebnisse konnten auch mit PC12-Zellen gewonnen werden, welche ebenfalls für vier Stunden mit 1 mM MGO behandelt wurden. Diese Behandlung hatte keinen Einfluss auf die Zellviabilität. Dabei kamen verschiedene Konzentrationen von 0,1 bis 1mM bei der Glykierung zur Anwendung (Bennmann et al. 2014).

Der zytotoxische Effekt von MGO konnte in weiteren Versuchsreihen als konzentrationsabhängig dargestellt werden. Bei steigender Konzentration von MGO kam es zu einer Beeinträchtigung der Zellviabilität und zu einer gesteigerten Apoptoserate. Eine signifikante Reduktion der Vitalität konnte ab einer Konzentration von 40 µM verzeichnet werden, wobei hier die Behandlung mit MGO über einen Zeitraum von 24 Stunden erfolgte (Hsieh und Chan 2009).

Interessanterweise variiert der Einfluss von MGO auf die Zellviabilität je nach untersuchter Zelllinie. Hussain et al. konnten humane zerebrale Endothelzellen für 24 Stunden mit 1 mM MGO behandeln, ohne dass eine signifikante Reduktion der Zellviabilität festgestellt wurde (Hussain et al. 2016).

Ein anderer Aspekt ist die Veränderung von Stoffwechselfvorgängen bei entarteten Zellen, bei denen es zur Induktion oder Suppression einzelner Reaktionswege kommen kann. Eine Änderung des Stoffwechsels im Sinne einer gesteigerten Glykolyserate ist hierbei typisch für maligne Tumoren und wird als Warburg-Effekt bezeichnet (Kroemer und Pouyssegur 2008). Durch den vermehrten Abbau von Monosacchariden würden auch erhöhte Mengen an MGO freigesetzt werden, was potentiell pathologische Effekte mit sich bringt. Bei Patienten mit Diabetes mellitus konnten im Vergleich mit Nicht-Diabetikern 6-fach erhöhte MGO-Level nachgewiesen werden. Als Gegenregulation konnte eine Induktion der Glyoxylase festgestellt werden, welche zum beschleunigten Abbau von MGO führt (McLellan et al. 1994). Eine ähnliche Beeinflussung des Abbaus von MGO wäre auch für Tumorzellen bei gesteigerter Glykolyse denkbar. Dies könnte das Mikromilieu der Zellen verändern und so auch die zytotoxischen Effekte von MGO beeinflussen. Eine genaue Aussage, ob eine Induktion oder Suppression entsprechender Enzyme der Glykolyse oder eine Beeinflussung der Glyoxylase stattfindet, lässt sich aus diesen Versuchsreihen nicht ableiten.

Insgesamt scheint der fehlende Einfluss auf die Zellviabilität bei einer Konzentration von 1mM auf die untersuchten Kelly-Zellen in Anbetracht anderer Untersuchung hinsichtlich Dauer und Konzentration sowie der physiologischen Konzentration im menschlichen Körper durchaus schlüssig. Ein längerer Inkubationszeitraum wäre mit toxischen Effekten verbunden.

5.2 Verstärkte Bildung von CML als Nachweis der Glykierung durch MGO

MGO gilt als der potenteste Präkursor für die Bildung von AGEs (Thornalley 1996). Als Nachweis einer abgelaufenen Glykierung sollte der Nachweis von CML nach Behandlung der Kelly-Zellen mit MGO via Western Blot gemessen werden. CML ist der meistgenutzte Marker für die Bildung von AGEs (Semba et al. 2010).

Als Referenz für diese Untersuchung wurden unbehandelte Zellkulturen verwendet. Weitere Kulturen wurden für vier Stunden mit 1mM MGO inkubiert. Im Anschluss erfolgte die SDS-PAGE sowie der Western Blot. Die Farbdichte der Banden des Western Blots wurde maschinell gemessen und die Werte prozentual in der Abbildung 15 dargestellt.

Hier zeigte sich ein breiter Bereich mit erhöhter Farbdichte der Banden im Vergleich zur unbehandelten Probe von 10-50 kDa für CML. Dieser gesteigerte Nachweis von CML spricht für eine abgelaufene Glykierung durch die Behandlung mit MGO. Hinsichtlich der Farbdichte der untersuchten Western Blots von CML und RAGE zeigte sich eine deutliche Verstärkung des Signals für CML nach Glykierung im Western Blot verglichen mit den Messwerten zur Expression von RAGE. Durch Glykierung mit MGO zeigte sich eine 3,7-fach erhöhte Farbdichte der Banden. Dieser hohe Wert lässt sich unter anderem durch den breiten Messbereich von 10-50 kDa erläutern. Bei RAGE erfolgte die Messung nur für die Hauptbande bei 45 kDa. Die Hauptbande des verwendeten CML-Antikörpers liegt bei 10-12kDa. Durch posttranslationale Modifikation sowie Bildung von Quervernetzungen zwischen Proteinen kann es zu einer Größenänderung kommen (Thornalley 2005). Daraus folgt eine Verbreiterung des Bandenbereichs für CML im Western Blot.

Für die Durchflusszytometrie wurden die verwendeten Neuroblastomzellen des Typs Kelly für vier Stunden mit 1 mM MGO behandelt und anschließend mit den entsprechenden Antikörpern für CML inkubiert. Bei der Durchflusszytometrie für CML zeigt sich in Abbildung 10 und 11 ein deutliches Signal für die Proben mit primärem und sekundärem Antikörper im Vergleich zur Aktivität der Isotopenkontrolle und der Fluoreszenzhintgrundaktivität. Im Vergleich der durchflusszytometrischen Messung der Signale für RAGE und CML fällt der Messwert für CML deutlich geringer aus. Mögliche Ursache könnte sein, dass Modifikationen in Form von AGE-Bildung vorwiegend intrazellulär erfolgen, sodass das fluoreszenzbasierte Signal von CML an der Zelloberfläche nicht so stark wie für einen membranständigen Rezeptor wie RAGE ausfällt.

Eine verstärkte Bildung von CML durch Behandlung mit MGO konnte ebenfalls bei humanen dermalen Fibroblasten gezeigt werden. Diese Bildung geschah abhängig von der verwendeten MGO-Konzentration. Außerdem kam es hier zu einer Akkumulation von Vimentin, als ein präferiertes Substrat der Glykierung (Kueper et al. 2008). Kasper et al. lieferten vergleichbare Ergebnisse. Es konnte gezeigt werden, dass es bei humanen embryonischen Lungenzellen nach Behandlung mit Glyoxal konzentrationsabhängig zu einer vermehrten Bildung von CML kommt. Dieser Nachweis erfolgte ebenfalls per Western Blot und per FACS. Weiterhin zeigten behandelte Zellen konzentrationsabhängig erhöhte Apoptoseraten durch die zytotoxischen Effekte des Glyoxals (Kasper et al. 2000).

In den durchgeführten Versuchsreihen konnte festgestellt werden, dass behandelte Zellen ein deutliches und spezifisches Signal für CML in der Durchflusszytometrie haben. Außerdem konnte

eine signifikante Steigerung der Farbdichte im Western Blot nach Behandlung mit MGO gezeigt werden, was für eine abgelaufene Glykierung mit Bildung von AGEs spricht.

5.3. Glykierung führt zu gesteigerter Expression von RAGE

Nach Behandlung der Kelly-Zellen mit MGO erfolgte die Quantifizierung der Expression von RAGE via Western Blot. Bei RAGE kommt es durch Bindung von AGEs über eine positive Rückkopplung zu einer vermehrten Expression (Bierhaus et al. 2005). Ob dieser Sachverhalt nach Glykierung mit MGO eintritt, sollte untersucht werden.

Als Referenz für diese Untersuchung wurden unbehandelte Neuroblastomzellen verwendet. Eine zweite Zellkultur wurde für vier Stunden mit 1mM MGO inkubiert. Im Anschluss erfolgte die SDS-PAGE sowie der Western Blot. Die Farbdichte der Banden wurde quantifiziert und die Werte prozentual in der Abbildung 17 dargestellt. Im Western Blot zeigt sich eine deutliche Steigerung der Farbdichte im Bereich von 45 kDa von mehr als 100% im Vergleich zur unbehandelten Probe, was der Hauptbande des verwendeten Antikörpers sowie in etwa dem molekularen Gewicht von RAGE entspricht (Ott et al. 2014). Da RAGE durch AGEs eine positive Rückkopplung erfährt (Chuah et al. 2013), scheint hier eine Induktion der Expression durch Glykierung via MGO plausibel.

Die primären Antikörper fanden auch in der Durchflusszytometrie Verwendung. Hier sollte untersucht werden, ob bei den Kelly-Zellen nach MGO-Behandlung ein spezifisches Signal erhältlich ist. Bei der durchgeführten Durchflusszytometrie zeigte sich ein starkes Signal der glykierten Zellen mit Primär- und Sekundärantikörper im Vergleich zu den beiden durchgeführten internen Kontrollversuchen, welche in den Abbildungen 12 und 13 verdeutlicht werden. Diese Messwerte lassen auf eine hohe Dichte von RAGE an der Zelloberfläche schließen. Beim Vergleich der Ergebnisse von Western Blot und Durchflusszytometrie fällt auf, dass bei der densitometrischen Messung der Banden des Western Blots das Signal für RAGE verglichen mit den Messwerten der Durchflusszytometrie weniger deutlich ausfällt. Diese Beobachtung lässt sich durch den Aufbau des Experiments erklären. Beim Western Blot erfolgte die Gegenüberstellung von glykierter Probe und unbehandelter Probe, was den Grad der Steigerung der Expression durch Behandlung mit MGO darstellt. Es zeigte sich eine Steigerung um mehr als 100% für RAGE. In der Durchflusszytometrie wurden glykierte Proben untersucht. Es erfolgten interne Kontrollen mit einer Isotopenkontrolle und einer Hintergrundmessung der Fluoreszenz, sodass hier keine Aussage zu einer Steigerung der Expression möglich ist.

RAGE scheint neben seiner Rolle bei degenerativen Erkrankungen auch in verschiedenen Tumoren eine Funktion zu erfüllen. Eine RAGE-Expression konnte in vielen humanen Tumorarten wie z.B. Lymphomen, Melanomen, Mammakarzinom, Kolonkarzinom und Prostatakarzinom festgestellt werden (Logsdon et al. 2007). Allerdings ist die RAGE-Expression beim Adenokarzinom der Lunge vermindert, wobei Lungengewebe ansonsten eine hohe Expression an RAGE aufweist (Stav et al. 2007). Untersuchungen durch Ghavami et al. haben gezeigt, dass durch Aktivierung von RAGE eine Proliferation von Tumorzellen verschiedener Zellreihen bewirkt wird. RAGE wurde bei diesen Untersuchungen durch Bindung von S100 aktiviert. Eine Proliferation durch RAGE-Aktivierung konnte unter anderem bei den verwendeten Neuroblastomzellen des Typs Kelly festgestellt werden. Weiterhin kam es bei der humanen Brustkrebszelllinien MCF-7 (Östrogenrezeptor positiv) und MDA-MB231 (Östrogenrezeptor negativ), bei der humanen T-Zell-Leukämie Zelllinie Jurkat, der murinen B-Zell-Leukämie Zellreihe BJAB, dem murinen Fibrosarkom L929, den humanen embryonischen Nierenzellen HEK-293 und SHEP zu einer Proliferation nach Stimulation von RAGE durch Aktivierung der MAPK (Ghavami et al. 2008). Weiterhin konnte ein Zusammenhang von Kolitis-assoziiertem Kolonkarzinom sowie RAGE-Aktivierung an menschlichem Gewebe und im Maus-Modell gezeigt werden. Durch Aktivierung von RAGE über S100 kam es via NF- κ B zu proinflammatorischen Prozessen sowie zur Tumorphiliferation, wohingegen bei RAGE-Blockade keine Entartung der Zellen ersichtlich wurde (Turovskaya et al. 2008).

Foster et al. konnten eine erhöhte Expression von RAGE bei Patienten mit Prostata-Karzinom feststellen, wobei eine höhere Expression bei low-grade Karzinomen im Vergleich zu high-grade Karzinomen beobachtet wurde (Foster et al. 2014). Kang et al. konnten zeigen, dass RAGE wichtig für die Viabilität von Tumoren sein kann. Ein Knockout von RAGE bei Pankreaskarzinomzellen führte zu einer erhöhten Apoptoserate und einer verminderten Überlebensrate der Zellen (Kang et al. 2009).

Eine Glykierung kann auch bei weiteren Tumorentitäten die Expression von RAGE beeinflussen. Durch Behandlung mit MGO konnte bei der humanen Brustkrebszellreihe MDA-MB231 eine gesteigerte Expression von RAGE beobachtet werden (Sharaf et al. 2015).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Behandlung mit MGO zu einer deutlichen Steigerung der RAGE-Expression führt. Eine hohe Expression von RAGE zeigte sich in anderen Versuchsreihen als malignitätssteigernd und führte unter anderem zu einer gesteigerten Proliferation. Der Grad der RAGE-Expression könnte bei einigen Tumoren als prognostischer

Marker genutzt werden. Außerdem könnte eine Blockade von RAGE in Zukunft als Therapieoption interessant werden.

5.4 Reduzierte Adhäsion auf glykiertem Laminin

Ein entscheidender Schritt in der Entartung von Tumorzellen ist der Durchbruch der Basalmembran und die Streuung in verschiedene Gewebe, was benigne von malignen Entitäten unterscheidet (Lüllmann-Rauch 2012). Ob eine Glykierung und die damit hervorgerufenen Veränderungen im Sinne von Alterungsprozessen einen Einfluss auf die Adhäsion der Kelly-Zellen haben, sollte hier untersucht werden.

Grundlage der Untersuchungen zur Zelladhäsion war die Echtzeitanalyse durch Impedanzmessung durch das RTCA-Gerät. Abhängig von der Menge der adhärenen Zellen ändert sich die Impedanz der goldbeschichteten Elektrode, da die Zellen einen elektrischen Widerstand darstellen. Bei den Untersuchungen zu Laminin zeigte sich durch Glykierung eine deutliche Reduktion der gemessenen Adhäsion im Vergleich zur unglykierten Kontrolle. Mit Werten von $CI = 0,623$ der Kontrolle sowie $CI = 0,406$ der glykierten Probe zeigte sich die Adhäsion durch Glykierung um den Faktor 1,58 verringert. Die Werte der glykierten Probe waren geringer als die Werte der Negativ-Kontrolle, siehe Abbildung 14.

Untersuchungen von Bennmann et al. konnten in Analogie zu den hier gezeigten Untersuchungen eine reduzierte Adhäsion von PC12-Zellen auf Laminin nach Behandlung mit 1 mM MGO im Vergleich zur Kontrolle zeigen (Bennmann et al. 2014). Die Glykierung von Laminin reduziert demnach bei verschiedenen Zellreihen die Adhäsion.

Die Untersuchungen zur Adhäsion der Neuroblastomzellen auf Fibronectin ergaben keine signifikante Änderung der glykierten Probe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Es zeigte sich, dass der Zell-Index mit einem Wert von $CI = 0,602$ der unbehandelten Probe sowie einem $CI = 0,592$ der glykierten Probe auf dem gleichen Niveau wie auf unbehandeltem Laminin mit einem $CI = 0,623$ liegt.

Im Gegensatz hierzu konnten andere Untersuchungen eine reduzierte Adhäsion von humanen gingivalen Fibroblasten auf glykiertem Fibronectin nach Behandlung mit MGO zeigen (Murillo et al. 2008). Außerdem konnte eine gesteigerte Proliferation von aortalen glatten Muskelzellen durch Behandlung mit IGF-1 (*insulin-like Growth Factor 1*) auf glykiertem Fibronectin im Vergleich zur Proliferation dieser Zellen auf unbehandeltem Fibronectin gezeigt werden (Corrêa-Giannella et al. 2012). Die Behandlung von MGO scheint in der hier gezeigten Untersuchung

keinen Einfluss auf die Adhäsion der Kelly-Zellen auf Fibronectin zu haben. Allerdings ist durch die Glykierung eine Beeinflussung anderer Prozesse nicht auszuschließen.

Bei der Untersuchung der Adhäsion der Neuroblastomzellen auf Kollagen IV zeigte sich kein signifikanter Unterschied beim Vergleich der glykierten und der unbehandelten Probe. Der Zell-Index erreichte mit Werten von CI = 1,913 der behandelten Probe und CI = 1,957 der unbehandelten Probe die höchsten Werte. Bennmann et al. konnten im Gegensatz hierzu eine reduzierte Adhäsion von PC12 auf Kollagen IV nach 4-stündiger Behandlung mit 1 mM MGO nachweisen (Bennmann et al. 2014).

Der Einfluss der Glykierung der Basalmembran scheint von Zelllinie zu Zelllinie zu variieren und Einfluss auf weitere Prozesse zu haben. Untersuchungen von Hussain et al. konnten eine erhöhte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke am Modell von humanen zerebralen Endothelzellen zeigen. Dabei erfolgte die Glykierung von Fibronectin und Kollagen IV mit 1 mM MGO und resultierte in einer circa 100-fach erhöhten Permeabilität (Hussain et al. 2016). Diese Störung der Blut-Hirn-Schranke steht im Einklang mit der gesteigerten Inzidenz von Morbus Alzheimer durch Aggregation von β -Amyloid bei Patienten mit Diabetes mellitus (Smolina et al. 2015). Bei Prostata-Karzinomzellen führte eine Glykierung der Basalmembran zu einer erhöhten Invasivität. Hier kam es durch Behandlung mit Glykoaldehyd über die Bildung von *Crosslinks* zu einem beschleunigten Alterungsprozess, insbesondere bei Laminin und Kollagen IV. Durch Zunahme von elastischen Fasern kam es zu einer erhöhten Starrheit und über Interaktion mit dem Kollagen-Rezeptor Endo 180 zu einer Induktion der Invasivität der Prostata-Karzinomzellen auf der AGE-modifizierten Basalmembran (Rodriguez-Teja et al. 2015).

Durch Glykierung wurde bei den verwendeten Neuroblastomzellen nur die Adhäsion auf Laminin beeinflusst, wobei es zu einer Reduktion der Adhäsion auf glykiertem Laminin kam. Weiterhin lässt sich sagen, dass die Adhäsion der untersuchten Substrate auf Kollagen IV am stärksten ausgeprägt war. Bei den Substraten Fibronectin und Kollagen IV zeigte sich, dass durch Behandlung mit MGO keine relevante Änderung im Adhäsionsverhalten der verwendeten Tumorzellen hervorgerufen wird. In der Zusammenschau der Ergebnisse kann die Glykierung von Proteinen der Basalmembran degenerative sowie maligne Prozesse begünstigen.

5.5 Erhöhte Migration durch Glykierung

Als abschließendes Experiment sollte der Einfluss von Glykierung auf das Migrationsverhalten der Neuroblastomzellen untersucht werden. Starke Migration im Sinne einer Metastasierung ist

ein entscheidendes Kriterium bei der Entartung von Zellen und geht mit einer schlechten Prognose einher (Hanahan und Weinberg 2000). Durch Behandlung der Zellen mit MGO kann eine diabetische Stoffwechsellage imitiert und ein künstlicher Alterungsprozess hervorgerufen werden. Der Zusammenhang von Karzinogenese und Alterungsprozessen ist ein therapeutisch wichtiger Aspekt und bisher noch unzureichend erforscht.

In Abbildung 22 wird gezeigt, dass unbehandelte Kelly-Zellen eine gewisse Migration auch ohne Konzentrationsunterschied der Medien aufweisen und verstärkt Richtung eines chemischen Attraktanz wandern. Die Gegenüberstellung der Zellindizes in Abbildung 23 zeigte eine deutliche Steigerung der Migration der glykierten Neuroblastomzellen um den Faktor 3,56 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Durch Behandlung mit MGO und der konsekutiven Steigerung der RAGE-Expression konnte so die Malignität der Zellen im Sinne einer gesteigerten Migrationsbereitschaft erhöht werden.

Glykierung als Malignitätsaspekt zeigt sich auch bei anderen Tumorentitäten. Eine gesteigerte RAGE-Expression durch Glykierung mit MGO konnte bei humanen Mammakarzinomzellen der Reihe MDA-MB-231 festgestellt werden. Die Glykierung erfolgte mit 0,1mM MGO über drei Tage und führte zu einer gesteigerten Expression von RAGE, welche per Western Blot und Durchflusszytometrie aufgezeigt werden konnte. Die glykierten Proben zeigten neben einer gesteigerten Zellproliferation eine gesteigerte Migrationsrate sowie eine erhöhte Invasivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Durch Blockierung von RAGE konnte gezeigt werden, dass diese Phänomene über RAGE-Stimulation geschehen (Sharaf et al. 2015). Durch Behandlung mit Glykoaldehyd kam es ebenfalls bei den humanen Lungenkarzinomzellen der Reihe A549 zu einer gesteigerten Migration sowie Invasion, ohne dass es zu einer Beeinflussung der Zellviabilität kam (Takino et al. 2010).

RAGE kann eine entscheidende Rolle bei dem Entartungspotential von Tumoren spielen. Durch Stimulation von RAGE via S100 konnte bei verschiedenen humanen Schilddrüsenkarzinomzellen (follikulär, papillär, medullär und anaplastisch) eine gesteigerte Migration beobachtet werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass normales Schilddrüsengewebe im Gegensatz zu den Karzinomzellen kein RAGE exprimiert (Medapati et al. 2015). Ein *Knockout* von RAGE führte beim Pankreaskarzinom zu erhöhter Apoptose und verringerte das Tumorwachstum. Eine RAGE-Überexpression wiederum erhöhte die Zellviabilität der Tumorzellen. Interessanterweise konnte das Ansprechen auf Chemotherapeutika durch *RAGE-Knockout* erhöht werden (Kang et al. 2009).

Die Expression von RAGE kann ebenfalls prognostische Werte haben. Bei Co-Expression von RAGE und seinem Liganden HMBG1 kam es bei Patienten mit Prostata-Karzinom zu einem schlechteren Outcome. Diese Co-Expression zeigte eine positive Korrelation mit höherem Tumorstadium, gesteigertem Lymphknotenbefall sowie mehr Fernmetastasen. Ein hohes Level an RAGE-Expression korrelierte ebenfalls mit der Höhe des PSA-Wertes (Zhao et al. 2014). Eine Co-Expression von RAGE und HMGB1 führte bei anderen Tumorentitäten wie dem kolorektalen Karzinom (Kuniyasu et al. 2003), dem Glioblastom (Bassi et al. 2008) und dem Magenkarzinom (Kuniyasu et al. 2002) zu einer stärkeren Proliferation sowie Metastasierung der Tumorzellen. RAGE kann durch das Hervorrufen von chronischen Inflammationsprozessen die Entartung von Zellen anregen. Untersuchungen konnten zeigen, dass Mäuse mit *RAGE-Knockout* resistent gegenüber den dermal applizierten Karzinogenen DMBA sowie TPA waren und es im Vergleich zum RAGE-Wildtyp zu keiner chronischen Inflammation und zu keiner Entwicklung eines Karzinoms kam (Gebhardt et al. 2008). Weiterhin konnte bei humanen Magenkarzinomzellen durch RAGE-Blockade eine Verringerung der Proliferation und Invasion sowie eine erhöhte Apoptoserate im Vergleich zu den RAGE-positiven Kontrollen festgestellt werden (Xu et al. 2013).

Die Untersuchungen zur Migration haben gezeigt, dass es durch Glykierung der Neuroblastomzellen zu einer gesteigerten Migration und somit zu einer Steigerung der Malignität gekommen ist. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass hohe Glukosespiegel neben degenerativen Prozessen auch bei malignen Prozessen eine Rolle spielen. Durch Glykierung von Proteinen kommt es zur Bildung von AGEs sowie zur gesteigerten Expression von RAGE. Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von RAGE neben einer chronischen Inflammation zur Steigerung der Proliferation, Invasion sowie Migration beitragen kann und dass die Blockade von RAGE eine therapeutische Option sein könnte.

Ziel der Arbeit war es, den Einfluss von Glykierung auf das Verhalten von Neuroblastomzellen zu untersuchen. Glykierung führt zur Bildung von AGEs, welche posttranslationale Modifikationen von Proteinen durch reduzierende Monosaccharide darstellen. AGEs spielen in vielen degenerativen sowie chronisch-entzündlichen Erkrankungen eine wichtige Rolle. AGEs können an verschiedene Rezeptoren binden. Ein Hauptvertreter dieser Rezeptoren ist RAGE, welcher als Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie in diversen Entzündungsprozessen involviert ist. Der Zusammenhang von Glykierung und Tumorprogression sollte hier genauer untersucht werden. Im ersten Schritt erfolgte die Überprüfung der Zellviabilität nach Glykierung der verwendeten Neuroblastomzellen des Typs Kelly. In den vorliegenden Untersuchungen zeigte sich keine Verringerung der Viabilität nach Glykierung der untersuchten Zellen.

Im nächsten Schritt erfolgte die Überprüfung der Signale von RAGE und CML nach 4-stündiger Behandlung mit 1 mM MGO via Durchflusszytometrie. Hier konnte für glykierte Zellen ein deutliches und spezifisches Signal sowohl für RAGE als auch für CML registriert werden. Um nach Behandlung der Zellen mit MGO eine Veränderung der Bildung von CML bzw. Expression von RAGE zu quantifizieren, erfolgte der Western Blot von unbehandelten und glykierten Zellen. Dieser zeigte eine Zunahme der Farbdichte von CML über einen breiten Bandenbereich von 10-50 kDa, da es hier durch Glykierung zu Quervernetzung und somit zu einem höheren Molekulargewicht kam. Für RAGE konnte ebenfalls eine deutliche Steigerung der Farbdichte für die Hauptbande des verwendeten Antikörpers bei 45 kDa festgestellt werden, was für eine gesteigerte RAGE-Expression spricht.

Ein weiterer Schritt war die Untersuchung der Adhäsion der Neuroblastomzellen via impedanzbasierter Echtzeitanalyse. Dafür wurden drei verschiedene Substrate, nämlich Laminin, Kollagen IV und Fibronectin ausgewählt. Diese stellen repräsentative Bestandteile der Basalmembran dar. Es erfolgte die Gegenüberstellung der Adhäsion der Kelly-Zellen auf unbehandeltem und glykiertem Substrat nach 4-stündiger Behandlung mit 1 mM MGO. Als Ergebnis zeigte sich eine deutlich reduzierte Adhäsion auf glykiertem Laminin, wohingegen MGO keinen Einfluss auf die Adhäsion von Kollagen IV und Fibronectin hatte.

Abschließend erfolgten die Untersuchungen zur Migration via impedanzbasierter Echtzeitanalyse. Hier konnte gezeigt werden, dass unbehandelte Zellen Richtung eines chemischen Attraktanz vermehrt migrieren. Der Vergleich der Migration von unbehandelten

Zellen mit glykierten Zellen nach Behandlung mit 1 mM MGO über vier Stunden zeigte eine deutliche Steigerung des Migrationsverhaltens um mehr als das 3-fache.

Die Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Untersuchungen und verdeutlichen die negativen Effekte von Glykierung hinsichtlich Metastasierung von Tumoren.

- ACEA Biosciences Inc., 2014:
xCELLigence RTCA DP Instrument. Flexible Real-Time Cell Monitoring.
San Diego, CA 92121. Online verfügbar unter
http://www.aceabio.com/UserFiles/doc/literature/product_info/RTCA_DP_Brochure_ACEA_LoRes.pdf, zuletzt geprüft am 10.01.2016.
- Akiyama, S. K.; Olden, K.; Yamada, K. M., 1995:
Fibronectin and integrins in invasion and metastasis.
In: *Cancer metastasis reviews* 14 (3), S. 173–189.
- Angeloni, C.; Zamboni, L.; Hrelia, S., 2014:
Role of Methylglyoxal in Alzheimer's disease.
In: *BioMed research international* 2014, S. 1–12. DOI: 10.1155/2014/238485.
- Ansari, N. A.; Moinuddin; Ali, R., 2011:
Glycated lysine residues: a marker for non-enzymatic protein glycation in age-related diseases.
In: *Disease markers* 30 (6), S. 317–324. DOI: 10.3233/DMA-2011-0791.
- Aronson, D.; Rayfield, E. J., 2002:
How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms.
In: *Cardiovasc Diabetol* 1 (1), S. 1. DOI: 10.1186/1475-2840-1-1.
- Attiyeh, E. F., 2005:
Chromosome 1p and 11q Deletions and Outcome in Neuroblastoma.
In: *New England Journal of Medicine* (353;21), S. 2243–2253.
- Aumailley, M.; Bruckner-Tuderman, L.; Carter, W. G.; Deutzmann, R.; Edgar, D.; Ekblom, P. et al., 2005:
A simplified laminin nomenclature.
In: *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology* 24 (5), S. 326–332. DOI: 10.1016/j.matbio.2005.05.006.
- Ayad, S., 1998:
The extracellular matrix factsbook. 2nd ed.
San Diego: Academic Press (Factsbook series).
- Barnes, P. J.; Karin, M., 1997:
Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases.
In: *The New England journal of medicine* 336 (15), S. 1066–1071. DOI: 10.1056/NEJM199704103361506.
- Bassi, R.; Giussani, P.; Anelli, V.; Colleoni, T.; Pedrazzi, M.; Patrone, M. et al., 2008:
HMGB1 as an autocrine stimulus in human T98G glioblastoma cells: role in cell growth and migration.
In: *Journal of neuro-oncology* 87 (1), S. 23–33. DOI: 10.1007/s11060-007-9488-y.
- Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P., 2009:
Food Chemistry. 4th rev. and extended ed.
Berlin: Springer-Verlag.

- Bennmann, D.; Horstkorte, R.; Hofmann, B.; Jacobs, K.; Navarrete-Santos, A.; Simm, A. et al., 2014:
Advanced glycation endproducts interfere with adhesion and neurite outgrowth.
 In: *PLoS one* 9 (11), S. e112115. DOI: 10.1371/journal.pone.0112115.
- Berthold, F., 2002:
Neuroblastomstudie NB 97.
 In: *Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie*, S. 1–148.
 Online verfügbar unter
http://www.kinderkrebsinfo.de/sites/kinderkrebsinfo/content/e1676/e9032/e68518/e5376/download5379/Protokoll_NB97_ger.pdf, zuletzt geprüft am 04.01.2016.
- Bierhaus, A.; Humpert, P. M.; Morcos, M.; Wendt, T.; Chavakis, T.; Arnold, B. et al., 2005:
Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products.
 In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 83 (11), S. 876–886.
 DOI: 10.1007/s00109-005-0688-7.
- Bohlender, J. M.; Franke, S.; Stein, G.; Wolf, G., 2005:
Advanced glycation end products and the kidney.
 In: *American journal of physiology. Renal physiology* 289 (4), S. F645-59.
 DOI: 10.1152/ajprenal.00398.2004.
- Brett, J.; Schmidt, A. M.; Yan, S. D.; Zou, Y. S.; Weidman, E.; Pinsky, D. et al., 1993:
Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues.
 In: *The American journal of pathology* 143 (6), S. 1699–1712.
- Brodeur, G.; Seeger, R.; Schwab, M.; Varmus, H.; Bishop, J., 1984:
Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage.
 In: *Science* 224 (4653), S. 1121–1124. DOI: 10.1126/science.6719137.
- Brodeur, G. M.; Seeger, R. C.; Barrett, A.; Berthold, F.; Castleberry, R. P.; D'Angio, G. et al., 1988:
International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma.
 In: *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 6 (12), S. 1874–1881.
- Brownlee, M., 1995:
Advanced Protein Glycosilation in Diabetes and Aging.
 In: *Annu. Rev. Med.* (46), S. 223–234.
- Cerami, C.; Founds, H.; Nicholl, L.; Mitsuhashi, T.; Giordano, D.; Vanpatten, S. et al., 1997:
Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products.
 In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, S. 13915–13920.
- Chang, T.; Wu, L., 2006:
Methylglyoxal, oxidative stress, and hypertension.
 In: *Canadian journal of physiology and pharmacology* 84 (12), S. 1229–1238.
 DOI: 10.1139/y06-077.

- Chen, K.; Maley, J.; Yu, P. H., 2006:
Potential implications of endogenous aldehydes in beta-amyloid misfolding, oligomerization and fibrillogenesis.
In: *Journal of neurochemistry* 99 (5), S. 1413–1424. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2006.04181.x.
- Chuah, Y. K.; Basir, R.; Talib, H.; Tie, T. H.; Nordin, N., 2013:
Receptor for advanced glycation end products and its involvement in inflammatory diseases.
In: *International journal of inflammation* 2013, S. 1–15. DOI: 10.1155/2013/403460.
- Chung, E. Y.; Kim, B. H.; Hong, J.; Lee, C.; Ahn, B.; Nam, S. et al., 2011:
Resveratrol down-regulates interferon- γ -inducible inflammatory genes in macrophages: molecular mechanism via decreased STAT-1 activation.
In: *The Journal of nutritional biochemistry* 22 (10), S. 902–909.
DOI: 10.1016/j.jnutbio.2010.07.012.
- Cohn, S. L., 2009:
The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Classification System: An INRG Task Force Report.
In: *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (2), S. 289–297. DOI: 10.1200/JCO.2008.16.6785.
- Cooper, R. A.; Anderson, A., 1970:
The formation and catabolism of methylglyoxal during glycolysis in Escherichia coli.
In: *FEBS letters* 11 (4), S. 273–276.
- Corrêa-Giannella, M.; Azevedo, M. R.; LeRoith, D.; Giannella-Neto, D., 2012:
Fibronectin glycation increases IGF-I induced proliferation of human aortic smooth muscle cells.
In: *Diabetol Metab Syndr* 4 (1), S. 19. DOI: 10.1186/1758-5996-4-19.
- Desai, K. M.; Chang, T.; Wang, H.; Banigesh, A.; Dhar, A.; Liu, J. et al., 2010:
Oxidative stress and aging: is methylglyoxal the hidden enemy?
In: *Canadian journal of physiology and pharmacology* 88 (3), S. 273–284.
DOI: 10.1139/Y10-001.
- Dmitriev, L. F. ; Titov, V. N., 2010:
Lipid peroxidation in relation to ageing and the role of endogenous aldehydes in diabetes and other age-related diseases.
In: *Ageing research reviews* 9 (2), S. 200–210. DOI: 10.1016/j.arr.2009.09.004.
- Favreau, Amanda J.; Vary, Calvin P H; Brooks, Peter C.; Sathyanarayana, P., 2014:
Cryptic collagen IV promotes cell migration and adhesion in myeloid leukemia.
In: *Cancer medicine* (2), S. 265–272. DOI: 10.1002/cam4.203.
- Foster, D.; Spruill, L.; Walter, K. R.; Nogueira, L. M.; Fedarovich, H.; Turner, R. Y. et al., 2014:
AGE metabolites: a biomarker linked to cancer disparity?
In: *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 23 (10), S. 2186–2191. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0564.

- Freedberg, W. B.; Kistler, W. S.; Lin, E. C., 1971:
Lethal synthesis of methylglyoxal by Escherichia coli during unregulated glycerol metabolism.
 In: *Journal of bacteriology* 108 (1), S. 137–144.
- Fujioka, K.; Shibamoto, T., 2006:
Determination of toxic carbonyl compounds in cigarette smoke.
 In: *Environmental toxicology* 21 (1), S. 47–54. DOI: 10.1002/tox.20153.
- Gebhardt, C.; Riehl, A.; Durchdewald, M.; Németh, J.; Fürstenberger, G.; Müller-Decker, K. et al., 2008:
RAGE signaling sustains inflammation and promotes tumor development.
 In: *J Exp Med* 205 (2), S. 275–285. DOI: 10.1084/jem.20070679.
- Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie, 2011:
Leitlinie der Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie.
 Neuroblastom, S. 1–7.
- Ghavami, S.; Rashedi, I.; Dattilo, B. M.; E., Mehdi, C., Walter J.; Hashemi, M. et al., 2008:
S100A8/A9 at low concentration promotes tumor cell growth via RAGE ligation and MAP kinase-dependent pathway.
 In: *Journal of leukocyte biology* 83 (6), S. 1484–1492. DOI: 10.1189/jlb.0607397.
- Giaever, I.; Keese, C. R., 1993:
A morphological biosensor for mammalian cells.
 In: *Nature* 366 (6455), S. 591–592. DOI: 10.1038/366591a0.
- González, I.; Romero, J.; Rodríguez, B. L.; Pérez-Castro, R.; Rojas, A., 2013:
The immunobiology of the receptor of advanced glycation end-products: trends and challenges.
 In: *Immunobiology* 218 (5), S. 790–797. DOI: 10.1016/j.imbio.2012.09.005.
- Grimm, S.; Ott, C.; Hörlacher, M.; Weber, D.; Höhn, A.; Grune, T., 2012:
Advanced-glycation-end-product-induced formation of immunoproteasomes: involvement of RAGE and Jak2/STAT1.
 In: *The Biochemical journal* 448 (1), S. 127–139. DOI: 10.1042/BJ20120298.
- Gugliucci, A.; Bendayan, M., 1995:
Reaction of advanced glycation endproducts with renal tissue from normal and streptozotocin-induced diabetic rats: an ultrastructural study using colloidal gold cytochemistry.
 In: *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society* 43 (6), S. 591–600.
- Gugliucci, A.; Bendayan, M., 1996:
Renal fate of circulating advanced glycated end products (AGE): evidence for reabsorption and catabolism of AGE-peptides by renal proximal tubular cells.
 In: *Diabetologia* 39 (2), S. 149–160.
- Hammes, H.; Du, X.; Edelstein, D.; Taguchi, T.; Matsumura, T.; Ju, Q. et al., 2003:
Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy.
 In: *Nature medicine* 9 (3), S. 294–299. DOI: 10.1038/nm834.

- Hanahan, D.; Weinberg, R. A., 2000:
The hallmarks of cancer.
In: *Cell* 100 (1), S. 57–70.
- Hangaishi, M.; Taguchi, J.; Miyata, T.; Ikari, Y.; Togo, M.; Hashimoto, Y. et al., 1998:
Increased aggregation of human platelets produced by advanced glycation end products in vitro.
In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 248 (2), S. 285–292.
DOI: 10.1006/bbrc.1998.8945.
- Hori, O.; Brett, J.; Slattery, T.; Cao, R.; Zhang, J.; Chen, J. X. et al., 1995:
The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphotericin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphotericin in the developing nervous system.
In: *The Journal of biological chemistry* 270 (43), S. 25752–25761.
- Hsieh, M.; Chan, W., 2009:
Impact of methylglyoxal and high glucose co-treatment on human mononuclear cells.
In: *International journal of molecular sciences* 10 (4), S. 1445–1464.
DOI: 10.3390/ijms10041445.
- Hudson, B. I.; Carter, A. M.; Harja, E.; Kalea, A. Z.; Arriero, M.; Yang, H. et al., 2008:
Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants.
In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22 (5), S. 1572–1580. DOI: 10.1096/fj.07-9909com.
- Hulet, H. R.; Bonner, W. A.; Barrett, J.; Herzenberg, L. A., 1969:
Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence.
In: *Science (New York, N.Y.)* 166 (3906), S. 747–749.
- Hussain, M.; Bork, K.; Gnanapragassam, V. S.; Bennmann, D.; Jacobs, K.; Navarette-Santos, A. et al., 2016:
Novel insights in the dysfunction of human blood-brain barrier after glycation.
In: *Mechanisms of Ageing and Development* 155, S. 48–54. DOI: 10.1016/j.mad.2016.03.004.
- Jha, P., 2015:
Neuroblastoma. Coronal T2, TruFISP Coronal A well defined mass lesion in seen in right suprarenal region.
Hg. v. Radiopedia.org (rID: 8839). Online verfügbar unter Radiopaedia.org/articles/neuroblastoma.
- Kalapos, M. P., 2008:
Methylglyoxal and glucose metabolism: a historical perspective and future avenues for research.
In: *Drug metabolism and drug interactions* 23 (1-2), S. 69–91.
- Kang, R.; Tang, D.; Schapiro, N. E.; Livesey, K. M.; Farkas, A.; Loughran, P. et al., 2009:
The receptor for advanced glycation end products (RAGE) sustains autophagy and limits apoptosis, promoting pancreatic tumor cell survival.
In: *Cell Death Differ* 17 (4), S. 666–676. DOI: 10.1038/cdd.2009.149.

- Kasper, M.; Roehlecke, C.; Witt, M.; Fehrenbach, H.; Hofer, A.; Miyata, T. et al., 2000:
Induction of apoptosis by glyoxal in human embryonic lung epithelial cell line L132.
 In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 23 (4), S. 485–491.
 DOI: 10.1165/ajrcmb.23.4.4117.
- Kim, J.; Park, S.; Lee, M. J.; Song, Y. R.; Han, S. H.; Kim, S. G. et al., 2012:
Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and proinflammatory ligand for RAGE (EN-RAGE) are associated with carotid atherosclerosis in patients with peritoneal dialysis.
 In: *Atherosclerosis* 220 (1), S. 208–214. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.07.115.
- Kinumaki, H.; Takeuchi, H.; Ohmi, K., 1976:
Serum lactate dehydrogenase isoenzyme pattern in neuroblastoma.
 In: *European journal of pediatrics* 123 (2), S. 83–87.
- Koenig, R. J.; Peterson, C. M.; Jones, R. L.; Saudek, C.; Lehrman, M.; Cerami, A., 1976:
Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus.
 In: *The New England journal of medicine* 295 (8), S. 417–420.
 DOI: 10.1056/NEJM197608192950804.
- Koriyama, Y.; Furukawa, A.; Muramatsu, M.; Takino, J.; Takeuchi, M., 2015:
Glyceraldehyde caused Alzheimer's disease-like alterations in diagnostic marker levels in SH-SY5Y human neuroblastoma cells
 In: *Scientific reports* 5, S. 1–7. DOI: 10.1038/srep13313.
- Kroemer, G.; Pouyssegur, J., 2008:
Tumor Cell Metabolism. Cancer's Achilles' Heel.
 In: *Cancer Cell* 13 (6), S. 472–482. DOI: 10.1016/j.ccr.2008.05.005.
- Kueper, T.; Grune, T.; Muhr, G.; Lenz, H.; Wittern, K.; Wenck, H. et al., 2008:
Modification of vimentin: a general mechanism of nonenzymatic glycation in human skin.
 In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1126, S. 328–332.
 DOI: 10.1196/annals.1433.039.
- Kuhla, B.; Lüth, H.; Haferburg, D.; Boeck, K.; Arendt, T.; Münch, G., 2005:
Methylglyoxal, glyoxal, and their detoxification in Alzheimer's disease.
 In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1043, S. 211–216.
 DOI: 10.1196/annals.1333.026.
- Kuniyasu, H.; Chihara, Y.; Takahashi, T., 2003:
Co-expression of receptor for advanced glycation end products and the ligand amphotericin associates closely with metastasis of colorectal cancer.
 In: *Oncology reports* 10 (2), S. 445–448.
- Kuniyasu, H.; Oue, N.; Wakikawa, A.; Shigeishi, H.; Matsutani, N.; Kuraoka, K. et al., 2002:
Expression of receptors for advanced glycation end-products (RAGE) is closely associated with the invasive and metastatic activity of gastric cancer.
 In: *The Journal of pathology* 196 (2), S. 163–170. DOI: 10.1002/path.1031.
- Laemmli, U. K., 1970:
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
 In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685.

- Lan, K.; Chiu, C.; Kao, C.; Huang, K.; Wang, C.; Huang, K. et al., 2015:
Advanced glycation end-products induce apoptosis in pancreatic islet endothelial cells via NF- κ B-activated cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 up-regulation.
 In: *PLoS one* 10 (4), S. e0124418. DOI: 10.1371/journal.pone.0124418.
- Lee, E. J.; Park, J. H., 2013:
Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE), Its Ligands, and Soluble RAGE: Potential Biomarkers for Diagnosis and Therapeutic Targets for Human Renal Diseases.
 In: *Genomics & informatics* 11 (4), S. 224–229. DOI: 10.5808/GI.2013.11.4.224.
- Liotta, L. A.; Tryggvason, K.; Garbisa, S.; Hart, I.; Foltz, C. M.; Shafie, S., 1980:
Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen.
 In: *Nature* 284 (5751), S. 67–68.
- Logsdon, C.; Fuentes, M.; Huang, E.; Arumugam, T., 2007:
RAGE and RAGE Ligands in Cancer.
 In: *CMM* 7 (8), S. 777–789. DOI: 10.2174/156652407783220697.
- Lüllmann-Rauch, R., 2012:
Taschenlehrbuch Histologie.
 10 Tabellen. 4., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart, New York, NY: Thieme.
- Maillard-Lefebvre, H.; Boulanger, E.; Daroux, M.; Gaxatte, C.; Hudson, B. I.; Lambert, M., 2009:
Soluble receptor for advanced glycation end products: a new biomarker in diagnosis and prognosis of chronic inflammatory diseases.
 In: *Rheumatology (Oxford, England)* 48 (10), S. 1190–1196.
 DOI: 10.1093/rheumatology/kep199.
- Maris, J. M., 2010:
Recent Advances in Neuroblastoma.
 In: *New England Journal of Medicine* 362 (23), S. 2202–2211.
 DOI: 10.1056/NEJMra0804577.
- McLellan, A. C.; Thornalley, P. J.; Benn, J.; Sonksen, P. H., 1994:
Glyoxalase System in Clinical Diabetes Mellitus and Correlation with Diabetic Complications.
 In: *Clin. Sci.* 87 (1), S. 21–29. DOI: 10.1042/cs0870021.
- Medapati, M. R.; Dahlmann, M.; Ghavami, S.; Pathak, K. A.; Lucman, L.; Klonisch, T. et al., 2015:
RAGE Mediates the Pro-Migratory Response of Extracellular S100A4 in Human Thyroid Cancer Cells.
 In: *Thyroid* 25 (5), S. 514–527. DOI: 10.1089/thy.2014.0257.
- Meffert, M. K.; Chang, J. M.; Wiltgen, B. J.; Fanselow, M. S.; Baltimore, D., 2003:
NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior.
 In: *Nature neuroscience* 6 (10), S. 1072–1078. DOI: 10.1038/nn1110.
- Miyata, T.; Ueda, Y.; Horie, K.; Nangaku, M.; Tanaka, S.; van Ypersele de Strihou, C; Kurokawa, K., 1998:
Renal catabolism of advanced glycation end products: the fate of pentosidine.
 In: *Kidney international* 53 (2), S. 416–422. DOI: 10.1046/j.1523-1755.1998.00756.x.

- Miyata, T.; Ueda, Y.; Shinzato, T.; Iida, Y.; Tanaka, S.; Kurokawa, K. et al., 1996:
Accumulation of albumin-linked and free-form pentosidine in the circulation of uremic patients with end-stage renal failure: renal implications in the pathophysiology of pentosidine.
 In: *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 7 (8), S. 1198–1206.
- Monnier, V. M., 2003:
Intervention against the Maillard reaction in vivo.
 In: *Archives of biochemistry and biophysics* 419 (1), S. 1–15.
- Mosmann, T., 1983:
Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.
 In: *Journal of immunological methods* 65 (1-2), S. 55–63.
- Mossé, Y. P., 2008:
Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene.
 In: *Nature* 455 (7215), S. 930–935. DOI: 10.1038/nature07261.
- Mott, J. D.; Khalifah, R. G.; Nagase, H.; Shield, C. F.; Hudson, J. K.; Hudson, B. G., 1997:
Nonenzymatic glycation of type IV collagen and matrix metalloproteinase susceptibility.
 In: *Kidney international* 52 (5), S. 1302–1312.
- Murillo, J.; Wang, Y.; Xu, X.; Klebe, R. J.; Chen, Z.; Zardeneta, G. et al., 2008:
Advanced Glycation of Type I Collagen and Fibronectin Modifies Periodontal Cell Behavior.
 In: *Journal of Periodontology* 79 (11), S. 2190–2199. DOI: 10.1902/jop.2008.080210.
- Neeper, M.; Schmidt, A. M.; Brett, J.; Yan, S. D.; Wang, F.; Pan, Y. C. et al., 1992:
Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins.
 In: *The Journal of biological chemistry* 267 (21), S. 14998–15004.
- Nemet, I.; Varga-Defterdarović, L., 2007:
Methylglyoxal-derived beta-carbolines formed from tryptophan and its derivatives in the Maillard reaction.
 In: *Amino acids* 32 (2), S. 291–293. DOI: 10.1007/s00726-006-0337-7.
- Nemet, I.; Varga-Defterdarović, L.; Turk, Z., 2006:
Methylglyoxal in food and living organisms.
 In: *Molecular nutrition & food research* 50 (12), S. 1105–1117. DOI: 10.1002/mnfr.200600065.
- Oeffinger, K. C., 2006:
Chronic Health Conditions in Adult Survivors of Childhood Cancer.
 In: *New England Journal of Medicine* (335;15), S. 1572–1582.
- Ott, C.; Jacobs, K.; Haucke, E.; Navarrete Santos, A.; Grune, T.; Simm, A., 2014:
Role of advanced glycation end products in cellular signaling.
 In: *Redox biology* 2, S. 411–429. DOI: 10.1016/j.redox.2013.12.016.
- Paulsson, M., 1992:
Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions.
 In: *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 27 (1-2), S. 93–127.
 DOI: 10.3109/10409239209082560.

- Pfeifer, Y. V.; Haase, P. T.; Kroh, L. W., 2013:
Reactivity of thermally treated α -dicarbonyl compounds.
 In: *Journal of agricultural and food chemistry* 61 (12), S. 3090–3096.
 DOI: 10.1021/jf302959k.
- Rabbani, N.; Thornalley, P. J., 2012:
Methylglyoxal, glyoxalase 1 and the dicarbonyl proteome.
 In: *Amino acids* 42 (4), S. 1133–1142. DOI: 10.1007/s00726-010-0783-0.
- Rahbar, S.; Figarola, J. L., 2003:
Novel inhibitors of advanced glycation endproducts.
 In: *Archives of biochemistry and biophysics* 419 (1), S. 63–79.
- Ramasamy, R.; Yan, S. F.; Schmidt, A. M., 2012:
The diverse ligand repertoire of the receptor for advanced glycation endproducts and pathways to the complications of diabetes.
 In: *Vascular pharmacology* 57 (5-6), S. 160–167. DOI: 10.1016/j.vph.2012.06.004.
- Renart, J.; Reiser, J.; Stark, G. R., 1979:
Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure.
 In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (76), S. 3116–3120. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC383774/>, zuletzt geprüft am 03.01.2016.
- Rodriguez-Teja, M.; Gronau, J. H.; Breit, C.; Zhang, Y. Z.; Minamidate, A.; Caley, M. P. et al., 2015:
AGE-modified basement membrane cooperates with Endo180 to promote epithelial cell invasiveness and decrease prostate cancer survival.
 In: *The Journal of pathology* 235 (4), S. 581–592. DOI: 10.1002/path.4485.
- Rothenberg, A., 2009:
Neuroblastoma—remembering the three physicians who described it a century ago: James Homer Wright, William Pepper, and Robert Hutchison.
 Unter Mitarbeit von Walter Berdon, Darrell Yamashiro und Robert Cowles. Hg. v. *Pediatric Radiology*.
 Online verfügbar: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00247-008-1062-z>.
- Sachdev, P. S.; Zhuang, L.; Braid, N.; Wen, W., 2013:
Is Alzheimer's a disease of the white matter?
 In: *Current opinion in psychiatry* 26 (3), S. 244–251.
 DOI: 10.1097/YCO.0b013e32835ed6e8.
- Sakata, N.; Meng, J.; Jimi, S.; Takebayashi, S., 1995:
Nonenzymatic glycation and extractability of collagen in human atherosclerotic plaques.
 In: *Atherosclerosis* 116 (1), S. 63–75.
- Salahuddin, P.; Rabbani, G.; Khan, R. H., 2014:
The role of advanced glycation end products in various types of neurodegenerative disease: a therapeutic approach.
 In: *Cellular & molecular biology letters* 19 (3), S. 407–437. DOI: 10.2478/s11658-014-0205-5.

- Sanguineti, R.; Puddu, A.; Mach, F.; Montecucco, F.; Viviani, G. L., 2014:
Advanced glycation end products play adverse proinflammatory activities in osteoporosis.
 In: *Mediators of inflammation* 2014, S. 975872. DOI: 10.1155/2014/975872.
- Schleicher, E. D.; Wagner, E.; Nerlich, A. G. (1997):
Increased accumulation of the glyoxidation product N-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging.
 In: *The Journal of clinical investigation* 99 (3), S. 457–468. DOI: 10.1172/JCI119180.
- Schmidt, A. M.; Yan, S. D.; Yan, S. F.; Stern, D. M., 2000:
The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands.
 In: *Biochimica et biophysica acta* 1498 (2-3), S. 99–111.
- Seeger, R. C.; Brodeur, G. M.; Sather, H.; Dalton, A.; Siegel, S. E.; Wong, K. Y.; Hammond, D., 1985:
Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas.
 In: *The New England journal of medicine* 313 (18), S. 1111–1116.
 DOI: 10.1056/NEJM198510313131802.
- Semba, R. D.; Nicklett, E. J.; Ferrucci, L., 2010:
Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype? In: *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 65 (9), S. 963–975. DOI: 10.1093/gerona/gdq074.
- Sharaf, H.; Matou-Nasri, S.; Wang, Q.; Rabhan, Z.; Al-Eidi, H.; Al Abdulrahman, A.; Ahmed, N., 2015:
Advanced glycation endproducts increase proliferation, migration and invasion of the breast cancer cell line MDA-MB-231.
 In: *Biochimica et biophysica acta* 1852 (3), S. 429–441.
 DOI: 10.1016/j.bbadis.2014.12.009.
- Sheikh, M. Saeed; Huang, Y., 2014:
Death Receptor Activation Complexes. It Takes Two to Activate TNF Receptor 1.
 In: *Cell Cycle* 2 (6), S. 549–551. DOI: 10.4161/cc.2.6.566.
- Singh, V. P.; Bali, A.; Singh, N.; Jaggi, A. S., 2014:
Advanced glycation end products and diabetic complications.
 In: *The Korean journal of physiology & pharmacology: official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* 18 (1), S. 1–14.
 DOI: 10.4196/kjpp.2014.18.1.1.
- Smedsrød, B.; Melkko, J.; Araki, N.; Sano, H.; Horiuchi, S., 1997:
Advanced glycation end products are eliminated by scavenger-receptor-mediated endocytosis in hepatic sinusoidal Kupffer and endothelial cells.
 In: *The Biochemical journal* 322 (Pt 2), S. 567–573.
- Smolina, K.; Wotton, C. J.; Goldacre, M. J., 2015:
Risk of dementia in patients hospitalised with type 1 and type 2 diabetes in England, 1998–2011. A retrospective national record linkage cohort study.
 In: *Diabetologia* 58 (5), S. 942–950. DOI: 10.1007/s00125-015-3515-x.

- Sousa Silva, M.; Gomes, R. A.; Ferreira, A. E N; Ponces Freire, A.; Cordeiro, C., 2013:
The glyoxalase pathway: the first hundred years... and beyond.
 In: *The Biochemical journal* 453 (1), S. 1–15. DOI: 10.1042/BJ20121743.
- Sparvero, L. J.; Asafu-Adjei, D.; Kang, R.; Tang, D.; Amin, N.; Im, J. et al., 2009:
RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts), RAGE ligands, and their role in cancer and inflammation.
 In: *Journal of translational medicine* 7, S. 17. DOI: 10.1186/1479-5876-7-17.
- Srikanth, V.; Maczurek, A.; Phan, T.; Steele, M.; Westcott, B.; Juskiw, D.; Münch, G., 2011:
Advanced glycation endproducts and their receptor RAGE in Alzheimer's disease.
 In: *Neurobiology of aging* 32 (5), S. 763–777. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2009.04.016.
- Stadler, R. H.; Blank, Imre; V., Natalia; R., Fabien; Hau, J.; Guy, P. A. et al., 2002:
Acrylamide from Maillard reaction products.
 In: *Nature* 419 (6906), S. 449–450. DOI: 10.1038/419449a">.
- Stav, D.; Bar, I.; Sandbank, J., 2007:
Usefulness of CDK5RAP3, CCNB2, and RAGE genes for the diagnosis of lung adenocarcinoma.
 In: *The International journal of biological markers* 22 (2), S. 108–113.
- Steinberg, D.; Parthasarathy, S.; Carew, T. E.; Khoo, J. C.; Witztum, J. L., 1989:
Beyond Cholesterol.
 In: *New England Journal of Medicine* 320 (14), S. 915–924.
 DOI: 10.1056/NEJM198904063201407.
- Stirban, A.; Gawlowski, T.; Roden, M., 2014:
Vascular effects of advanced glycation endproducts: Clinical effects and molecular mechanisms.
 In: *Molecular metabolism* 3 (2), S. 94–108. DOI: 10.1016/j.molmet.2013.11.006.
- Strenger, V.; Kerbl, R.; Dornbusch, H. J.; Ladenstein, R.; Ambros, P. F.; Ambros, I. M.; Urban, C., 2007:
Diagnostic and Prognostic Impact of Urinary Catecholamines in Neuroblastoma Patients.
 In: *Pediatric blood & cancer* 48 (5), S. 504–509.
 DOI: 10.1002/pbc.20888?download=1&open=1".
- Sugaya, K.; Fukagawa, T.; Matsumoto, K.; Mita, K.; Takahashi, E.; Ando, A. et al., 1994:
Three genes in the human MHC class III region near the junction with the class II: gene for receptor of advanced glycosylation end products, PBX2 homeobox gene and a notch homolog, human counterpart of mouse mammary tumor gene int-3.
 In: *Genomics* 23 (2), S. 408–419.
- Takino, J.; Yamagishi, S.; Takeuchi, M., 2010:
Cancer malignancy is enhanced by glyceraldehyde-derived advanced glycation end-products.
 In: *Journal of oncology* 2010, S. 739852. DOI: 10.1155/2010/739852.
- Terranova, V. P.; Liotta, L. A.; Russo, R. G.; Martin, G. R., 1982:
Role of laminin in the attachment and metastasis of murine tumor cells.
 In: *CANCER RESEARCH* 42 (6), S. 2265–2269.

- Thornalley, P. J., 1996:
Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification--a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy.
 In: *General pharmacology* 27 (4), S. 565–573.
- Thornalley, P. J., 2005:
Dicarbonyl intermediates in the maillard reaction.
 In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1043, S. 111–117.
 DOI: 10.1196/annals.1333.014.
- Tomaschitz, P., 2009:
Das endokrine System des Foeten bei Diabetes
 Dissertation, S. 1–113.
- Tsokos, M.; Linnoila, R. I.; Chandra, R. S.; Triche, T. J., 1984:
Neuron-specific enolase in the diagnosis of neuroblastoma and other small, round-cell tumors in children.
 In: *Human pathology* 15 (6), S. 575–584.
- Tsokos, M., 1993:
A microscopic view of a typical neuroblastoma with rosette formation.
 Magnified x40. Hg. v. National Cancer Institute. Online verfügbar unter <https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=2593>, zuletzt aktualisiert am 2001.
- Turovskaya, O.; Foell, D.; Sinha, P.; Vogl, T.; Newlin, R.; Nayak, J. et al., 2008:
RAGE, carboxylated glycans and S100A8/A9 play essential roles in colitis-associated carcinogenesis.
 In: *Carcinogenesis* 29 (10), S. 2035–2043. DOI: 10.1093/carcin/bgn188.
- Uribarri, J.; Peppas, M.; Cai, W.; Goldberg, T.; Lu, M.; He, C.; Vlassara, H., 2003:
Restriction of dietary glycotoxins reduces excessive advanced glycation end products in renal failure patients.
 In: *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 14 (3), S. 728–731.
- Uribarri, J.; Woodruff, S.; Goodman, S.; Cai, W.; Chen, X.; Pyzik, R. et al., 2010:
Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet.
 In: *Journal of the American Dietetic Association* 110 (6), S. 911-16.e12.
 DOI: 10.1016/j.jada.2010.03.018.
- Vlassara, H.; Cai, W.; Crandall, J.; Goldberg, T.; Oberstein, R.; Dardaine, V. et al., 2002:
Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy.
 In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (24), S. 15596–15601. DOI: 10.1073/pnas.242407999.
- Westermann, F., 2008:
Distinct transcriptional MYCN/c-MYC activities are associated with spontaneous regression or malignant progression in neuroblastomas.
 In: *Genome Biology* 9, S. R150.1–14.

- Wong, A.; Dukic-Stefanovic, S.; Gasic-Milenkovic, J.; Schinzel, R.; Wiesinger, H.; Riederer, P.; Münch, G., 2001:
Anti-inflammatory antioxidants attenuate the expression of inducible nitric oxide synthase mediated by advanced glycation endproducts in murine microglia.
In: *The European journal of neuroscience* 14 (12), S. 1961–1967.
- Xiao, C.; Lachance, B.; Sunahara, G.; Luong, J. H. T., 2002:
An in-depth analysis of electric cell-substrate impedance sensing to study the attachment and spreading of mammalian cells.
In: *Analytical chemistry* 74 (6), S. 1333–1339.
- Xu, X. C.; Abuduhadeer, X.; Zhang, W. B.; Li, T.; Gao, H.; Wang, Y. H., 2013:
Knockdown of RAGE inhibits growth and invasion of gastric cancer cells.
In: *Eur J Histochem* 57 (4), S. 36. DOI: 10.4081/ejh.2013.e36.
- Yiallourous, M.; Berthold, F., 2014:
Neuroblastom.
Kompetenznetz Pädiatrische Onkologie und Hämatologie. www.kinderkrebsinfo.de.
Online verfügbar unter
http://www.kinderkrebsinfo.de/erkrankungen/weitere_solide_tumoren/pohneuroblp_atinfo120120611/index_ger.html, zuletzt aktualisiert am 31.10.2015, zuletzt geprüft am 04.01.2016.
- Zhang, L.; Bukulin, M.; Kojro, E.; Roth, A.; Metz, V. V.; Fahrenholz, F. et al., 2008:
Receptor for advanced glycation end products is subjected to protein ectodomain shedding by metalloproteinases.
In: *The Journal of biological chemistry* 283 (51), S. 35507–35516. DOI: 10.1074/jbc.M806948200.
- Zhao, C.; Bao, J.; Lu, Y.; Zhao, T.; Zhou, X.; Zheng, D.; Zhao, S., 2014:
Co-expression of RAGE and HMGB1 is associated with cancer progression and poor patient outcome of prostate cancer.
In: *American journal of cancer research* 4 (4), S. 369–377.

8 Thesen

1. MGO hat in der verwendeten Konzentration keinen Einfluss auf die Zellviabilität.
2. Glykierte Neuroblastomzellen zeigen deutliche Signale für CML und RAGE im FACS.
3. Glykierung der Neuroblastomzellen führt zur AGE-Bildung.
4. Glykierung der Neuroblastomzellen führt zur Steigerung der RAGE-Expression.
5. Glykierung von Laminin resultiert in einer Reduktion der Adhäsion.
6. Glykierung von Neuroblastomzellen führt zu einer Steigerung der Migration.

Curriculum vitae

Maximilian Scheer

Am Durchbruch 12

D – 17291 Prenzlau

T: 0174 / 189 39 70

E: maximilian_scheer@hotmail.de

Geburtsdatum: 18.06.1989

Geburtsort: Prenzlau

Staatsangehörigkeit: deutsch

Akademische Ausbildung

12/2016	Erlangung der Approbation Gesamtnote: Sehr gut
11/2016	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung Note: Sehr gut
10/2015	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung Note: Sehr gut
seit 11/2013	Promotion am Institut für Physiologische Chemie Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
09/2012	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung Note: Gut
seit 10/2010	Studium der Humanmedizin Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Berufserfahrung

2009 – 2010	Beginn einer Ausbildung zum Gesundheits- und Krankenpfleger
2008 – 2009	Freiwilliges soziales Jahr

Schulische Ausbildung

2001 – 2008	Christa-und-Peter-Scherpf-Gymnasium Prenzlau
1995 – 2001	Pestalozzi-Grundschule Prenzlau

Promotion

Der Einfluss von Glykierung auf Neuroblastomzellen

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Institut für Physiologische Chemie

Prof. Dr. Rüdiger Horstkorte

Studienaufenthalte

Praktisches Jahr

- | | |
|------|---|
| 2016 | Universitätsklinikum Halle/ Saale
Universitätsklinik und Poliklinik für Herzchirurgie,
Abteilung für Unfall-und Wiederherstellungschirurgie |
| 2016 | Spital Wil – Spitalregion Fürstenland Toggenburg, Schweiz
Innere Medizin |
| 2015 | Universitätsklinikum Halle/ Saale
Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie |

Hospitationen

- | | |
|------|---|
| 2015 | Martin Gropius Krankenhaus
Klinik für Neurologie / Stroke Unit |
| 2014 | Krankenhaus Angermünde
Klinik für Innere Medizin: Pulmologie |

Famulaturen

- | | |
|------|---|
| 2014 | Kreiskrankenhaus Prenzlau
Rettungsstelle / Notaufnahme |
| 2014 | Klinik Dr. Katrin Müller, Hannover
Plastische und Ästhetische Chirurgie, Handchirurgie |
| 2013 | Kreiskrankenhaus Prenzlau
Klinik für Innere Medizin: Kardiologie, Diabetologie, Gastroenterologie |
| 2013 | Gemeinschaftspraxis Dialyse Glorius/ Hofmann/ Märkel, Prenzlau
Nephrologie, Dialyse, Hypertensiologie, Apherese |
| 2013 | Kreiskrankenhaus Prenzlau
Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Klinik für Unfallchirurgie und Orthopädie |

Sprachkenntnisse

- Deutsch (Muttersprache)
- Englisch (Gute Kenntnisse in Wort und Schrift)
- Französisch (Grundkenntnisse)
- Latein (Grundkenntnisse)

Interessen

- Drachenboot (Verein sowie Nationalmannschaft: deutscher Meister, Europameister, Vize-Weltmeister)
- Sport (Kraftsport, Laufen, Radfahren)
- Automobiltechnik

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Es ist mir bekannt, dass ich den Dokortitel nicht führen kann, bevor mir die Promotionsurkunde bzw. eine vorläufige Bescheinigung gemäß § 16 der Promotionsordnung ausgehändigt wurde.

Frühere Promotionsversuche:

Ich bestätige, dass ich bisher keine Promotionsversuche durchgeführt habe.

Maximilian Scheer

Halle / Saale, den 01.06.2016

Danksagung

Ein großes Dankeschön geht in erster Linie an Herrn Professor Rüdiger Horstkorte für die Möglichkeit der Promovierung mit diesem interessanten Thema und die exzellente Betreuung während des gesamten Zeitraums. Durch seine uneingeschränkte Zugänglichkeit und schnelle Reaktionszeit empfand ich die Zusammenarbeit als sehr angenehm und hätte mir keinen besseren Betreuer vorstellen können.

Ein weiterer Dank gilt Dr. Gnanapragassam, der mich in vielen labortechnischen Abläufen sehr gut betreut hat und immer für Fragen zugänglich war. Weiterhin möchte ich der gesamten AG Horstkorte danken. Namentlich möchte ich hier Annett Thate erwähnen, welche stets sehr hilfsbereit war und ihre Unterstützung anbot. Ebenfalls ein großer Dank gilt Dorit Bennmann, welche mir viele Abläufe nähergebracht hat und mir wertvolle Tipps für die wissenschaftliche Arbeit mit auf den Weg gab. Dafür bin ich dir sehr dankbar.

Ich möchte auf diesem Weg auch Elke Schmidt und Julia Winzer danken, welche mir bei Fragen zur Rechtschreibung und Grammatik zur Seite standen und mich sehr unterstützt haben. Vielen Dank für euer Engagement.

Ein großer Dank gilt meiner Freundin Birte Schmidt. Du hattest immer ein offenes Ohr für meine Fragen und Probleme, hast mich nach vollen Kräften unterstützt und hast selbstlos in einigen Situationen auf mich verzichtet.

Abschließend möchte ich noch ein großes Dankeschön an meine Familie richten. Ohne die großartige Unterstützung meines Vaters und meiner Großeltern hätte ich es wohl nie so weit gebracht. Ihr wart immer für mich da und wir haben auch in schwierigen Zeiten immer an einem Strang gezogen. Ich verdanke euch sehr viel.