

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Herzchirurgie
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. Hendrik Treede)

**Analyse der biologischen Aktivität
von Komponenten Advanced Glycation Endproducts-reicher
Lebensmittelextrakte**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)
vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Anne Lattauschke, geb. Blankenhorn
geboren am 04.02.1990 in Dresden

Betreuer: Prof. Dr. Andreas Simm

Gutachter: Prof. Dr. Rüdiger Horstkorte
Prof. Dr. Veronika Somoza (Wien)
PD Dr. Anne Navarrete Santos
08.11.2016
15.11.2017

Für meine Eltern

Referat

Zielsetzung: Diese Arbeit untersucht, ob Brotkrustenextrakt (BCE) den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren kann. Es sollten zusätzlich einzelne Fraktionen aus dem Brotkrustenextrakt identifiziert werden, die hierfür verantwortlich sein könnten. Dazu sollte geprüft werden, ob die Aktivierung von der Expression von Rezeptoren abhängt, die für die Bindung von Advanced Glycation Endproducts (AGEs) verantwortlich gemacht werden.

Methoden: Das BCE und drei von fünfzehn Fraktionen, die mit Hilfe einer HPLC aus dem BCE isoliert wurden, wurden als Stimulans genutzt. Als Zellsysteme wurden eine kardiale Mausfibroblastenzelllinie und 3 NF- κ B Reporterzelllinien (HEK, Jurkat, RAW) verwendet. Bei allen vier Zelllinien wurde mittels Western-Blot die aktive/phosphorylierte p44/42 MAP-Kinase untersucht. Die HEK und Jurkat-Zellen produzieren bei Stimulation des NF- κ B-Signalweges GFP, welches bei den HEK Zellen im Lysat und bei den Jurkat Zellen mittels FACS quantifiziert wurde. Die RAW-Zellen produzieren bei Aktivierung des NF- κ B-Signalweges eine alkalische Phosphatase, die im Überstand gemessen werden konnte. Des Weiteren wurde der AGE-Rezeptorbesatz der Zelllinien untersucht. Zum einen wurde mit dem Western-Blot nach den Proteinen der Rezeptoren gesucht und zum anderen wurde die RNA der unstimulierten Zellen nach der mRNA Expression der Genen der Rezeptoren untersucht.

Wesentliche Ergebnisse: Die RAW-Zelllinie zeigt sowohl bei Stimulierung mit BCE als auch mit der Fraktion dreizehn die höchste Aktivierung des NF- κ B-Signalweges im Vergleich zu den anderen Zelllinien. Die HEK-Zelllinie wurde ebenfalls durch beide Formen (BCE und Fraktion 12 und 13) zu geringeren Teilen angeregt. Die Jurkat-Zelllinie reagiert mit einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors zwar auf die Stimulation mit den Fraktionen 10 und 12, jedoch nicht auf das BCE. Die MFB-Zelllinie zeigt einen Trend der Stimulierung, jedoch keine statistische Signifikanz. Die RAW-Zelllinie exprimiert alle untersuchten Rezeptoren.

Schlussfolgerung: Der NF- κ B-Signalweg der HEK-, Jurkat- und RAW-Zelllinie wurden entweder durch BCE oder/und durch einzelne Fraktionen der Brotkruste aktiviert. Die Höhe der NF- κ B-Aktivierung durch BCE bzw. durch die verwendeten Fraktionen scheint abhängig von dem Rezeptorbesatz zu sein, ist jedoch nicht statistisch signifikant.

Lattauschke, Anne: Analyse der biologischen Aktivität von Komponenten Advanced Glycation Endproducts-reicher Lebensmittelextrakte, Halle (Saale), Univ., Med. Fak.; Diss., 74 Seiten, 2016

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Advanced Glycation Endproducts (AGE)..... | 1 |
| 1.1.1 | Entstehung von AGEs | 1 |
| 1.1.2 | AGEs in der Nahrung | 1 |
| 1.1.3 | Absorption, Metabolismus und Exkretion von AGEs | 3 |
| 1.1.4 | AGEs im Alter und in bestimmten Erkrankungen | 4 |
| 1.1.5 | AGE-Wirkungen | 5 |
| 1.2 | Rezeptoren der AGEs | 6 |
| 1.2.1 | RAGE | 6 |
| 1.2.2 | AGE-R1 | 7 |
| 1.2.3 | AGE-R2..... | 7 |
| 1.2.4 | AGE-R3..... | 7 |
| 1.2.5 | Scavenger Rezeptor IIa | 7 |
| 1.3 | NF- κ B-Signalweg..... | 7 |
| 1.4 | pERK p44/42 MAP-Kinase..... | 9 |
| 2 | Zielsetzung | 10 |
| 3 | Material und Methodik..... | 11 |
| 3.1 | Allgemeine Chemikalien..... | 11 |
| 3.2 | Spezielle Chemikalien und Kits | 11 |
| 3.2.1 | Primer | 13 |
| 3.3 | Puffer und Lösungen | 14 |
| 3.4 | Zellkulturchemikalien | 15 |
| 3.5 | Verwendete Zelllinien | 15 |
| 3.5.1 | NF- κ B/293/ GFP-Luciferase | 16 |
| 3.5.2 | NF- κ B/Jurkat/GFP..... | 16 |
| 3.5.3 | NF- κ B/SEAPorter TM RAW Cell Line | 16 |
| 3.5.4 | MFB | 16 |
| 3.6 | Materialien | 16 |
| 3.7 | Geräte | 17 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.8 | Auswert-Software..... | 19 |
| 3.9 | Brotkrustenverarbeitung..... | 19 |
| 3.9.1 | Herstellung Brotkrustenextrakt (BCE)..... | 19 |
| 3.9.2 | Herstellung Brotkrustenfraktionen..... | 19 |
| 3.9.3 | Fluoreszenzmessung der Fraktionen..... | 20 |
| 3.9.4 | Proteinbestimmung der Fraktionen..... | 21 |
| 3.10 | Zellkulturtechniken..... | 22 |
| 3.10.1 | Kultivierung und Passagieren der Zellen..... | 22 |
| 3.10.2 | Auftauen von Zellen..... | 23 |
| 3.10.3 | Aussaat der Zellen..... | 23 |
| 3.10.4 | Nachweis Mykoplasmen mittels PCR..... | 24 |
| 3.11 | Fluoreszenzmikroskop..... | 24 |
| 3.12 | Fluoreszenzbestimmung der HEK-Zelllinie..... | 25 |
| 3.13 | Durchflusszytometrie..... | 25 |
| 3.14 | SEAP-Assay..... | 26 |
| 3.15 | Protein-Analytik..... | 27 |
| 3.15.1 | Herstellung Zelllysats..... | 27 |
| 3.15.2 | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 27 |
| 3.15.3 | Western-Blot..... | 28 |
| 3.15.4 | Spot-Blot..... | 28 |
| 3.15.5 | Immunodetektion..... | 28 |
| 3.16 | RNA-Analytik..... | 29 |
| 3.16.1 | RNA-Isolation aus Zellen..... | 29 |
| 3.16.2 | Bestimmung RNA-Konzentration und Reinheit..... | 30 |
| 3.16.3 | Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)..... | 30 |
| 3.17 | statistische Auswertung..... | 31 |
| 4 | Ergebnisse..... | 33 |
| 4.1 | Proteinbestimmung der Fraktionen..... | 33 |
| 4.2 | Fluoreszenzbestimmung der Fraktionen..... | 34 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.3 | Wahl der Fraktionen..... | 34 |
| 4.4 | Spot-Blot Analysen der Fraktionen..... | 35 |
| 4.5 | NF- κ B/293/ GFP-Luciferase..... | 35 |
| 4.5.1 | Fluoreszenzmikroskop..... | 35 |
| 4.5.2 | FACS..... | 36 |
| 4.5.3 | GFP-Fluoreszenzbestimmung..... | 37 |
| 4.5.4 | Western-Blot..... | 38 |
| 4.6. | NF- κ B/Jurkat/GFP..... | 38 |
| 4.6.1 | FACS..... | 38 |
| 4.6.2 | Western Blot..... | 40 |
| 4.7 | NF- κ B/SEAPorter TM RAW Cell Line..... | 41 |
| 4.7.1 | SEAP-Assay..... | 41 |
| 4.7.2 | Western-Blot..... | 43 |
| 4.8 | MFB..... | 44 |
| 4.8.1 | Western-Blot..... | 44 |
| 4.9 | RNA-Analytik der Rezeptoren..... | 44 |
| 4.10 | Protein-Analytik der Zelllinien zum Rezeptorbesatz..... | 45 |
| 4.11 | Analyse der Beziehung zwischen AGE-Gehalt und NF- κ B-Aktivität..... | 46 |
| 4.12 | Abhängigkeit zwischen NF- κ B-Aktivität vom Rezeptor-RNA-Gehalt..... | 46 |
| 5 | Diskussion..... | 48 |
| 5.1 | Vergleich der Zelllinien..... | 48 |
| 5.2 | Aufnahme AGEs..... | 53 |
| 5.3 | Schaden oder Nutzen: was überwiegt?..... | 53 |
| 5.4 | Möglichkeit der AGE-Reduzierung..... | 54 |
| 5.5 | Ausblick..... | 58 |
| 5.6 | Limitation der Arbeit..... | 59 |
| 6 | Zusammenfassung..... | 60 |
| 7 | Literaturverzeichnis..... | 62 |
| 8 | Thesen..... | 72 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|---|
| ACN | Acetonitril |
| AGE | engl. advanced glycation endproducts |
| AGE-R | engl. advanced glycation endproducts receptor |
| ANA | antinukleäre Antikörper |
| ASS | Acetylsalicylsäure |
| BCA | Bicinchoninsäure |
| BCE | engl. bread crust extract, Brotkrustenextrakt |
| BSA | engl. bovine serumalbumin, Rinderalbuminserum |
| CML | carboxymethyllysin |
| CS | engl. calfserum, Kälberserum |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium, standartisiertes Nährmedium |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ERK | extrazellulär signal-regulierte Kinase |
| FACS | engl. Fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometrie |
| FCS | engl. fetal calf serum, fetales Kälberserum |
| Fr | Fraktionen |
| FSC | engl. Forward Scatter, Vorwärtsstreuung |
| GFP | grün fluoreszierendes Protein |
| GFR | glomeruläre Filtrationsrate |
| GSH | Gutathion |
| HEK | engl. humane embryonic kidney, menschliche embryonale Nierenzellen |
| HIV | humanes Immundefizienz-Virus |
| HPLC | engl. high-pressure liquid chromatography, Hochdruckflüssigkeitschromatografie |
| IRAk | Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase |
| JAK/Stat | Januskinase/Signal Transducers and Activators of Transcription |
| LPS | Lipopolysaccharid |

| | |
|----------------|--|
| MAPK | mitogen-aktivierte Proteinkinase |
| MFB | Myofibroblasten |
| NAPDH | Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat |
| NF- κ B | engl. Nuclear factor kappa B, Zellkernfaktor kappa B |
| NOD-Maus | engl. Non-Obese Diabetic, hohe Inzidenz spontan auftretender Diabetes mellitus |
| pERK | phosphorylierte extrazellulär signal-regulierte Kinase |
| PCR | engl. polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion |
| PBS | engl. phosphat buffered saline, Phosphat gepufferte Salzlösung |
| PI | Propidiumiodid |
| PVDF | polyvinyliden difluorid |
| RAGE | engl. Receptor of advanced glycation end products |
| ROS | engl. reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies |
| RT | reverse Transkription |
| SEAP | engl. secreted alkaline phosphatase, sezernierte alkalische Phosphatase |
| SEM | engl. standard error of the mean, Standardfehler |
| sRAGE | engl. soluble Receptor of advanced glycation end products |
| SSC | engl. Side Scatter, Seitwärtsstreuung |
| TBS | engl. Tris-buffered saline |
| TBS-T | engl. Tris-buffered saline and Tween 20 |
| TFA | engl. Trifluoracid, Trifluoressigsäure |
| TLR | Toll-like-Rezeptor |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor- α |
| TNFR | Tumornekrosefaktor-Rezeptor |
| TRAF | Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiertes Protein |

1 Einleitung

1.1 Advanced Glycation Endproducts (AGE)

1.1.1 Entstehung von AGEs

Louis-Camille Maillard inkubierte 1912 Glucose mit Aminosäuren und entdeckte damit die später nach ihm benannte nicht-enzymatische Maillard-Reaktion. Für diese ist ein reduzierter Zucker, eine Aminogruppe (an Proteinen, Lipiden oder Nukleinsäuren) (Uribarri et al. 2010), Zeit und Hitze nötig. In der Maillard-Reaktion sind Arginin und Lysin die am häufigsten modifizierten Aminosäuren (Poulsen et al. 2013). Diese gehören zu den basischen, geladenen Aminosäuren. Als erstes Produkt entsteht eine Schiff'sche-Base (Reaktion eines Aldehyds mit einem primären Amin). Dieser Prozess vollzieht sich sehr schnell und ist reversibel. Mit einer weiteren Umlagerung, die deutlich länger braucht, kann aus der Schiff'schen Base ein Amadori-Produkt entstehen, welches stabiler ist (siehe Abb.1). Das bekannteste Amadori-Produkt ist HbA_{1c}, eine Glykierung des Hämoglobins im menschlichen Körper, welches vor allem bei der Diagnosestellung und als Verlaufskontrolle der Hyperglykämie bei Diabetikern genutzt wird. In der späten Reaktionsphase können daraus Advanced Glycation Endproducts (AGEs) entstehen. Dieser Schritt ist irreversibel. Die Bildung der AGEs kann sowohl endogen als auch exogen von statten gehen.

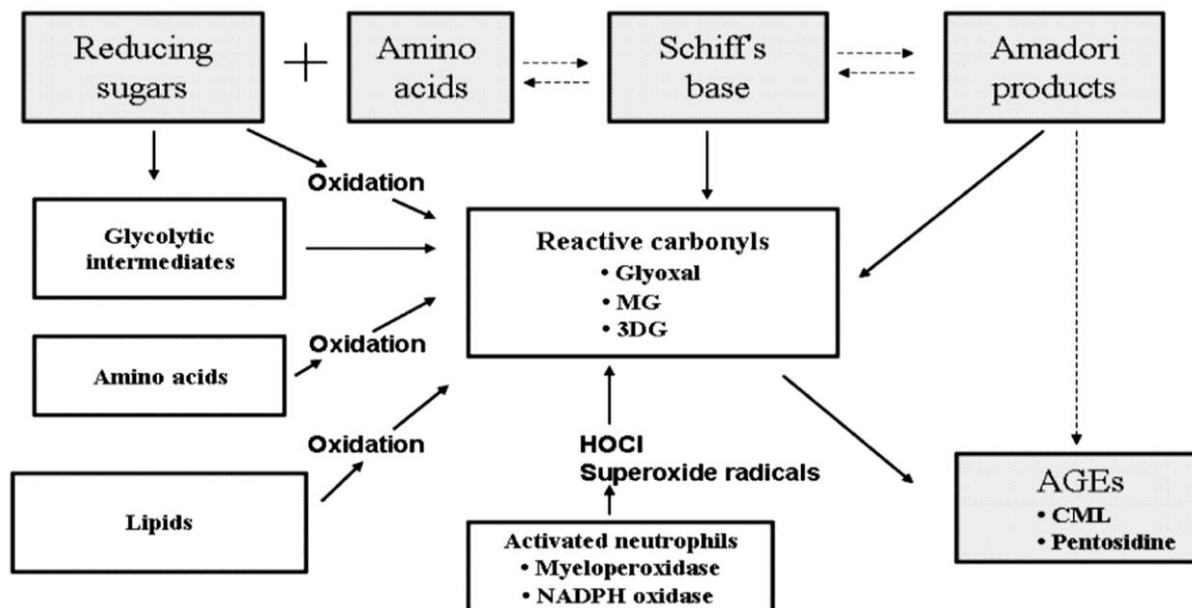


Abbildung 1: Entstehung von AGEs entnommen aus (Uribarri, Tuttle 2006)

1.1.2 AGEs in der Nahrung

AGEs, die exogen geformt werden, kann man auch Maillardreaktionsprodukte (MRPs) nennen. AGEs finden sich sowohl in unbehandelten Nahrungsmitteln als auch in erhitzten, die speziell bei dem Prozess des Bratens, Grillens oder Röstens gebildet werden (Uribarri et al. 2010). Die charakteristische Braunfärbung und ein spezifischer Geschmack entstehen durch die Maillard-

Reaktion, genauer gesagt, werden die Färbung und der Geschmack durch die sogenannten Melanoidine dargestellt (Uribarri et al. 2010). Melanoidine gehören ebenfalls zu den MRPs, sind jedoch sehr große Moleküle mit hochkondensierten, polymeren Stickstoffatomen. Lebensmittel mit einer hohen Konzentration an Proteinen und Lipiden besitzen die größten Mengen an AGEs (Vlassara et al. 2002). Somit gehört Fleisch zu den Nahrungsprodukten mit einem höheren AGE-Level, da der Muskel zum einen hoch-reaktive Amino-Lipide und zum anderen auch reduzierte Zucker besitzt, die das Organ versorgen sollte. Brot ist ebenfalls bekannt als ein AGE-reiches Produkt (Somoza et al. 2005b).

Die Kochmethode hat einen großen Einfluss auf den finalen AGE-Gehalt. Dabei gelten als bestimmende Faktoren: die Höhe der Kochtemperatur, die Länge der Reaktionszeit, Konzentration der Reaktionsprodukte, Vorhandensein von Wasser und der pH-Wert. Dies sieht man z. B. an einer Erhöhung der Temperatur um 10°C. Dabei verdoppelt sich die Rate der Maillard-Reaktion (Ledl, Schleicher 1990).

Vor dem Hintergrund, dass bei Nicht-Vegetariern die Kochtemperatur niedriger und die Kochzeit geringer ist, postulierten Sebekova et al. 2001, dass diese Ernährungsweise einen niedrigeren AGE-Gehalt im Plasma nach sich zieht. Jedoch war der AGE-Gehalt bei Probanden, die sich karnivor ernähren, niedriger als bei den anderen Formen der Ernährung (vegan, vegetarisch oder vegetarisch mit Essen von Fisch), wobei die höchste Konzentration von AGEs und CML bei der vegetarischen Diät gefunden wurde. Es spielt dem folgend nicht nur die Kochtemperatur bzw. -zeit die entscheidende Rolle, sondern die vermehrte Aufnahme von Fruktose und vermehrte Nutzung von Vollkornprodukten bei allen vegetarischen Ernährungsformen, die einen höheren CML-Gehalt besitzen. (Sebeková et al. 2001) Die Kochmethode ist zwar, wie oben geschildert, ebenfalls bei der Entstehung der AGEs von Bedeutung, doch in der zuvor genannten Publikation wurde nicht der AGE-Gehalt der Nahrung gemessen, was wahrscheinlich Rückschlüsse auf den AGE-Gehalt im Blut gegeben hätte.

Dieser Untersuchungsfokus wurde bei Cai et al. 2007 näher betrachtet. Diese Forschungsarbeit kommt zu dem Ergebnis, dass Mäuse, die mit regulären Futter ernährt wurden, im Gegensatz zu denen, die mit dem gleichen Futter nur mit geringerem AGE-Gehalt gefüttert wurden, ein zweifach höheres AGE-Level im Blut (CML-Konzentration im Serum gemessen) aufweisen (Cai et al. 2007). Im Umkehrschluss wurde ein Jahr später gezeigt, dass Mäuse, die auf kalorische Restriktion gesetzt wurden, ebenfalls ein niedriges AGE-Level aufweisen. Bedeutend ist in jedem Fall der AGE-Gehalt der Nahrung. Selbst Mäuse, die zwar einen niedrigeren Kalorien-, aber gleich hohen AGE-Gehalt (MG wurde genutzt) wie regulär gefütterte Mäuse täglich aufgenommen haben, besitzen ein hohes Level an AGEs und daraus schlussfolgernd größeren oxidativen Stress. Der Effekt der kalorischen Restriktion beruht zum Teil auf der reduzierten Aufnahme von AGEs. (Cai et al. 2008).

In dieser Arbeit wird Brotkruste als AGE-reiches Lebensmittelextrakt verwendet. Wie oben beschrieben, ist in der Literatur allgemein anerkannt, dass die bräunlich verfärbten Komponenten, die während des Backvorganges von Brot entstehen, zu der Gruppe der Maillard-Reaktionsprodukte gehören (Somoza et al. 2005; Poulsen et al. 2013).

In den ersten Versuchen von Lindenmeier et al. 2002 wurde die antioxidative Kapazität zum Vergleich in der Brotkruste, im Brotlaib und im unbehandelten Mehl bestimmt. Dabei wurde festgestellt, dass AGEs vermehrt in der Brotkruste, weniger im Brotlaib und nicht im Mehl gefunden wurden. Das Hauptaugenmerk lag auf der der Stimulierung der Glutathione-S-Transferase, welche in Caco2-Zellen nur durch Brotkruste aktiviert wurde, sodass Brotkruste vorerst als protektiver funktioneller Parameter der antioxidativen Aktivität *in vitro* gesehen wurde. Ebenso bestätigte die Arbeitsgruppe, dass durch den Backvorgang Veränderungen in der chemischen Komposition des Mehls induziert werden (Lindenmeier et al. 2002). Unter anderem kann gezeigt werden, dass D-Ribose oder L-Lysin bzw. auch das unerhitzte Gemisch dieser beiden Reagenzien zu keiner vermehrten NF- κ B-Aktivität in Caco-2-Zellen führt. Aus dem erhitzten Gemisch entsteht ein Maillard-Reaktionsprodukt, welches in Makrophagen zu einer erhöhten Translokation von NF- κ B führt (Muscat et al. 2007). Während der ersten Schritte des Backvorganges wird das Amdori-Produkt N- ϵ -Fructoselysine (FL) gebildet, welches in einem späteren Schritt zu N- ϵ -Carboxymethyllysine (CML) umgewandelt wird. Zusätzlich räumt die Autorin aber ein, dass eine endogene Transformation von FL zu CML auch möglich sei (Somoza et al. 2006). Des Weiteren ist anzunehmen, dass auch andere AGEs als das nachgewiesene CML während des Backvorgangs gebildet werden.

1.1.3 Absorption, Metabolismus und Exkretion von AGEs

Bei dem Vergleich der Konzentration der endogenen (im Körper produziert) und exogenen AGEs (in Nahrungsmittel entstanden) fiel auf, dass sie sich in unterschiedlichen Messbereichen befinden. Messungen zufolge sind exogene AGEs im mg-Bereich und endogene AGEs im pg-Bereich vorhanden (van Nguyen, Chuyen 2006). Dem folgend wird eine deutlich größere Menge durch die Nahrung angeboten, als vom Körper selbstständig gebildet. Im Vergleich zu den beschriebenen Prozessen der Bildung exogener AGEs zum Beispiel beim Braten von Fleisch entstehen endogene AGEs durch dieselben Prozesse bei niedrigeren Temperaturen. Dass der Körper AGEs über die Nahrungsmittel aufnimmt, zeigen mehrere Forschungsarbeiten.

Eine Studie von Somoza et al. 2006 zeigte, dass bei der Ergänzung von CML im Futter dieses vermehrt im Plasma zu finden ist und dass bei Ratten eine CML-reiche Ernährung zu einem vierfachen Anstieg der Urin- bzw. dreifachen Anstieg der Fäkalausscheidung führt. (Somoza et al. 2006). Außerdem zeigt sich eine höhere CML -Konzentration im Serum der Portalvene nach einer AGE-reichen Ernährung (Zhong et al. 2015).

In anderen Experimenten mit Diabetikern und Nicht-Diabetikern wurde zwei Stunden nach Aufnahme AGE-reicher Kost ein Anstieg des Serum-AGE-Levels festgestellt, ein Peak befand sich vier bis sechs Stunden postprandial (Theodore Koschinsky 1997). Abhängig von der Schwere der Nierenerkrankung sank die Konzentration wieder auf ihren Ausgangswert, bei Nichtdiabetikern nach ca. 18-20 h bis hin zu weit über 48 h bei schweren Nierenfunktionsstörungen. Koschinsky konstatiert daraus folgend eine direkte Proportionalität zwischen dem Serum-AGE-Gehalt und der AGE-Aufnahme. Diese Erhöhung ist nur durch die gastrointestinale Aufnahme von exogenen AGEs zu erklären. Es wurde in dieser Studie gezeigt, dass ca 10% der oral angebotenen AGEs über den Magen-Darm-Trakt aufgenommen werden. (Theodore Koschinsky 1997)

Solche Studien lassen den Rückschluss zu, dass kleine Moleküle über die Darmwand aufgenommen werden und über den Blutkreislauf in den gesamten Körper gelangen, wobei der genaue Transportmechanismus noch nicht in Gänze erforscht ist. CML wird nur als Dipeptid, nicht als freie Säure über den Di- und Tripeptid-Transporter PEPT1(aktiv) in Epithelzellen des Darms transportiert (Hellwig et al. 2011; Hellwig et al. 2014).

Der Hauptteil der in der Nahrung befindlichen AGEs wird jedoch nicht aufgenommen. Durch das mikrobielle Milieu im Kot des Darms wird ein Großteil abgebaut. Man kann zwischen Schnell- und Langsam-„Metabolisierer“ unterscheiden. Bei der ersten Gruppe vermindert sich der CML-Gehalt auf unter 15% der Ausgangskonzentration, bei der zweiten auf 53-59% (Hellwig et al. 2015).

Für die Initiierung des Abbaus von AGE-haltigen Proteinen im menschlichen Gewebe sind die spezifischen Rezeptoren (siehe unten) zuständig. Die AGE-haltigen Proteine werden über diese aufgenommen, die Proteine abgebaut und die daraus entstandenen modifizierten Aminosäuren können über die Niere ausgeschieden werden. Diese Ausscheidung ist abhängig von der Kreatinin-Clearance. Bei gestörter Nierenfunktion akkumulieren AGEs im Körper (Singh et al. 2001).

1.1.4 AGEs im Alter und in bestimmten Erkrankungen

Mit dem Alter steigt, auch bei gesunden Menschen, die Konzentration von AGEs in verschiedenen Geweben an, jedoch ist der Anstieg bei Patienten mit chronischen Krankheiten signifikant höher, wobei zu bedenken ist, dass auch junge Patienten mit chronischen Erkrankungen eine erhöhte Konzentration haben können. Die AGEs akkumulieren vor allem in langlebigen Geweben in Proteinen wie z.B. Kollagen oder Myelin, wodurch die damit verbundene Steifigkeit dieser Gewebe (z.B. Linse oder Gefäßwände) zu Krankheiten führen kann (Gil, Bengmark 2007).

In diesem Forschungsgebiet wurden Diabetes mellitus und kardiovaskuläre Erkrankungen, wie Arteriosklerose, vermehrt untersucht. Bei Diabetikern wird die Maillard-Reaktion durch verschiedene Faktoren vermehrt getriggert:

- Die Patienten haben, hervorgerufen durch ihre Erkrankung, eine erhöhte Zuckerkonzentration in ihrem Blut.
- Sie nehmen vermehrt Fructose als Glucose-Ersatz auf, welches jedoch reaktiver ist
- Bei fortgeschrittener Erkrankung mit einer zusätzlichen Nephropathie werden weniger AGEs über die Niere ausgeschieden.

AGEs bringt man mit den zum Diabetes mellitus gehörenden Komplikationen in Verbindung, wie die diabetische Nephropathie, Neuropathie, Vaskulopathie und Retinopathie (Miyahara et al. 2002). Wenn man in diesem Krankheitsbild intensive Glucose-Kontrolle betreibt, ist das Risiko geringer mikrovasculäre Schäden zu bekommen (Fullerton 2014).

Auch andere Krankheitsbilder assoziiert man mit einem erhöhten AGE-Gehalt: Kalousová et al. 2005 zeigen eine signifikante Erhöhung von CML und der AGE-Fluoreszenz bei Patienten mit Arteriosklerose (Kalousová M 2005). Bei Patienten mit Alzheimer wurde ein dreifach höherer AGE-Gehalt im Gehirn im Vergleich zu gesunden Menschen gefunden (Moreira et al. 2005). Außerdem wurde beschrieben, dass AGEs mit ihrer Crosslinking-Funktion die Bildung von senilen Plaques fördern (Moreira et al. 2005). Wie oben erwähnt, gehört die Linse zu den langlebigen Geweben, sodass AGEs gerade dort akkumulieren und zum Katarakt beitragen. Jedoch findet man sie in allen Teilen des Auges (z.B. auch in der Tränendrüse), vermehrt bei Diabetikern (Stitt 2005).

1.1.5 AGE-Wirkungen

AGEs führen auf struktureller Ebene zu Gewebsschäden durch folgende Prozesse:

(Nass et al. 2007)

- Veränderung der Proteinfunktion
- Crosslinking der Proteine führt zu vermehrter Steifheit der Gewebe
- Induktion von Radikalen (ROS)
- Induktion einer Entzündungsreaktion

Zum Anderen wird ihnen auch eine positive Reaktion bei der Immunantwort (Leukozytenrekrutierung) nachgesprochen. (Chavakis et al. 2004)

Zur aktuellen Diskussion steht, ob AGE ebenfalls einen Benefit zeigen oder eher schädlich für den menschlichen Körper sind. Dies kann man bisher noch nicht mit Sicherheit sagen. Wenn man von der Gesamtheit der Menschen unabhängig von speziellen Erkrankungen ausgeht, zeigten Semba et al 2009, dass Erwachsenen (über 65 Jahre alt), die im Zeitraum des Follow-ups (sechs Jahre) verstorben sind, ein höheren Plasmagehalt an CML als diejenigen, die überlebt haben, aufwiesen (Semba et al. 2009). In dieser Publikation wird CML sogar als ein Vorhersagewert für die Mortalität beschrieben. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass eine AGE-reiche Ernährungsweise zu einer geringeren Lebenserwartung führt (Cai et al. 2007). Einer der größten Nachteile einer erhöhten Zufuhr an AGEs kommt der vergrößerten Gewichtszunahme und damit verbunden der mit Adipositas verbundenen

Herzerkrankung, Gefäßverkalkung, Gelenkverschleiß und vielem mehr zu (Somoza et al. 2005a). Wobei nicht nur der erhöhte AGE-Gehalt, sondern auch andere Faktoren wie die Hyperlipidämie in dieses Konstrukt hineinspielen.

Es sind nicht nur langfristige sondern auch kurzzeitig eintretende Veränderungen zu sehen. Bei Diabetikern, die eine AGE-reiche Nahrung zu sich nehmen, kommt es zu kurzfristigen Beeinträchtigungen in der mikro- und makrovasculären Endothelfunktion, im Vergleich zu Diabetikern, die eine AGE-arme Mahlzeit zu sich nehmen (Negrean et al. 2007).

1.2 Rezeptoren der AGEs

Es wurden verschiedene Rezeptoren für AGEs entdeckt, die zum Teil verschiedene Funktionen haben. Für den Receptor of Advanced Glycation Endproducts (RAGE) findet man die meisten Forschungsbeiträge auf Pubmed, in absteigender Reihenfolge gefolgt von: AGE-R3 und AGE-R1, AGE-R2 und Scavenger-Rezeptor IIa.

1.2.1 RAGE

Die Arbeitsgruppe um Schmidt et al. entdeckte 1992 einen Zelloberflächen-Rezeptor für AGEs (Schmidt et al. 1992), später RAGE genannt. Seither wird intensiv an diesem geforscht und es wurden weitere Bindungspartner gefunden, wie etwa HMG-a, S100 Protein oder Amyloid- β -Peptid. RAGE ist bekannt als ein 42 kDa großes Polypeptid der Immunoglobulin-Superfamilie, welches jedoch als 35 kD Protein entdeckt wurde (Neeper et al. 1992). In der Elektrophorese läuft es allerdings aufgrund von Glykosylierungen oft als 56 kD Protein. Das RAGE-Protein besteht aus drei Immunoglobulin-ähnlichen Regionen, eine V-Domäne und zwei C-Domänen. AGEs binden an die V-Domäne (Matsumoto et al. 2008).

RAGE beschleunigt nicht die Clearance oder den Abbau von AGEs (Bierhaus et al. 2005), er induziert bei Bindung eines Reaktionspartners mehrere intrazelluläre Signalkaskaden: Anstieg der Phosphorylierung von ERK (p44/42) und p38 MAP-Kinase, z.B. in Monozyten (Shanmugam 2003), ebenso wie JAK/STAT (Huang et al. 1999), Induktion von ROS sowie Aktivierung der NADPH-Oxidase (Wautier et al. 2001) und weitere. Viele dieser Signalkaskaden führen zur Aktivierung des NF- κ B-Signalweges. Die Studie von Chavakis et al. 2004 weist bei RAGE-Knock-out Maus im Vergleich zum wild-Typ eine signifikante Reduktion über 50 Prozent der Makrophagen-Migration in das Peritoneum nach. Dies zeigt, dass eine Aktivierung von RAGE die Makrophagen-Migration unterstützt (Chavakis et al. 2004).

Außer der Membran-gebundenen Form gibt es noch lösliche Rezeptoren (soluble RAGE, sRAGE), wobei die Funktion im Vergleich zu der erst genannten eine andere ist – antiinflammatorischer vs. proinflammatorischer Effekt. In diabetischen Mäusen wurde ein höherer Prozentsatz der Leukozytenrekrutierung durch sRAGE inhibiert (Chavakis et al. 2004).

1.2.2 AGE-R1

Der AGE-R1 wurde schon vor der Interaktion mit AGEs als Oligosaccharid Transferase OST48 entdeckt. Er gehört zu einem Typ-A Integral-Membranprotein mit einer Größe von 50 kDa. Dieser Rezeptor fungiert als Clearance-Rezeptor mit einer hohen Affinität zu AGEs. Bei Bindung kommt es zu einem erhöhten Abbau von AGEs und ebenso wie bei Überexpression von AGE-R1 zu einer Inhibition der AGE-induzierten Phosphorylierung der p44/42 MAP-Kinase und des NF- κ B-Signalweges (CAI et al. 2006).

1.2.3 AGE-R2

Der AGE-R2 wurde als 80K-H Protein beschrieben, welches durch die Proteinkinase C im GLUT4-Vesikel-Transport involviert ist (Hodgkinson et al. 2005). Es ist ein 90 kDa großes Tyrosin-Phosphorylierungs-Protein und induziert eine Entzündungssignalkaskade.

1.2.4 AGE-R3

1995 entdeckte Vlassara et al. ein AGE-Rezeptor-Komplex und dieser stimmte mit dem bekannten Galectin-3 überein (Vlassara et al. 1995). AGE-R3 kann sowohl sezerniert werden, als auch an verschiedenen Integrine gebunden sein (Fukushi 2004). AGE-R3 funktioniert ebenfalls als Clearance-Rezeptor.

1.2.5 Scavenger Rezeptor IIa

Der Scavenger Rezeptor wird von Leber-Sinusoidalzellen, Kupferschen und Endothelialzellen exprimiert. Er spielt eine bedeutende Rolle bei der endozytischen Aufnahme und damit bei dem Abbau der AGEs aus dem Plasma (Smedsrød et al. 1997).

1.3 NF- κ B-Signalweg

Wie oben bereits erwähnt, führen viele Wege zur Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs (siehe Abb. 2). CML bindet an RAGE und aktiviert somit NF- κ B in glatten Muskelzellen und Monophagen (Kislinger et al. 1999). Die Aktivierung des NF- κ B durch Stimulierung von RAGE wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen (Bierhaus et al. 2001). RAGE produziert über die NADPH-Oxidase ROS und induziert damit den NF- κ B-Signalweg. Hierbei ist die NADPH-Oxidase der Hauptlieferant der AGE-induzierten ROS-Produktion (Zhang 2006). Des Weiteren führt eine spontane Reaktion von Sauerstoff-Radikalen oder durch die Superoxid Dismutase auch zur die Bildung von ROS.

AGEs (und unter anderem auch Interferon- γ) aktivieren jedoch auch den JAK/STAT-Signalweg (Grimm et al. 2012). Dieser führt nicht direkt zur Aktivierung von NF- κ B. Die AGE vermittelte Aktivierung von JAK/STAT induziert die Expression proteasomale Untereinheiten und greift in den Splice-Vorgang von RAGE ein (Ott et al. 2014).

Des Weiteren binden Lipopolysaccharide (LPS) an TLR4 (Toll-like-receptor), wodurch TLR4 an IRAK gebunden wird und TRAF6 die NF- κ B Aktivierung vermittelt. Ebenso aktiviert der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), der über den TNFR1-Rezeptor eine Signalkaskade in Gang setzt, den NF- κ B-Signalweg (Gloire et al. 2006).

In ruhenden Zellen findet man im Cytoplasma NF- κ B in einer starken Verbindung zu einem Protein namens I κ B stehend, welches den Komplex daran hindert in den Nukleus zu gelangen (Ghosh, Hayden 2012). Bei Stimulation wird I κ B phosphoryliert und der Komplex zerfällt in seine Bestandteile. Nun kann NF- κ B in den Nukleus translozieren und an die entsprechende Promotorregion der DNA binden (Gloire et al. 2006), um die Expression von mehreren Genen zu induzieren (Hayden, Ghosh 2004). Dazu gehören Cytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α), Adhäsionsmoleküle (VCAM-1), prokoagulatorische (Thrombomodulin, Tissuefactor) und vasokonstriktorische Proteine (Endothelin-1) (Singh et al. 2001).

So lässt sich konstatieren, dass AGEs den oxidativen Stress in der Zelle erhöhen, die NF- κ B Transkription aktivieren und somit inflammatorische Mediatoren produzieren (Vlassara et al. 2002). Diese Effekte können durch Blockade von RAGE oder durch Antioxidantien (z.B. Probuco)l inhibiert werden (Wautier et al. 2001).

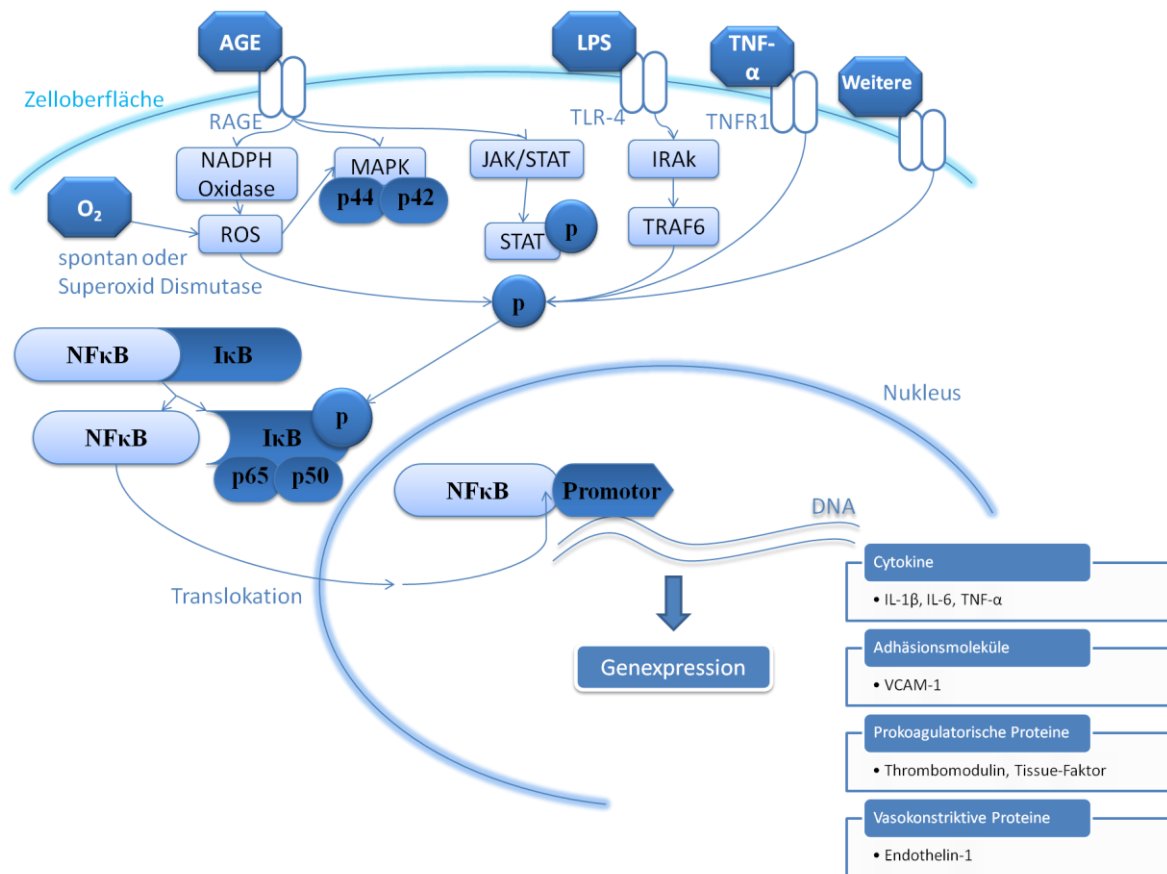


Abbildung 2: NF-κB Signalweg und zusätzliche RAGE-Signalkaskaden (Ausschnitt)

AGEs binden an RAGE und aktivieren intrazellulär die NADPH-Oxidase, die MAP-Kinase, den JAK/STAT-Signalweg uvm.. Andere Stimulanzen wie LPS, TNF- α und Weitere führen wie die AGEs über ihren Signalweg zur Phosphorylierung der I κ B- Untereinheit, wodurch diese sich von NF- κ B abspaltet. Dadurch kann NF- κ B in den Nukelus translozieren und an die passende Promoterregion binden, wodurch die Genexpression u.a. von Cytokinen, Adhäsionsmolekülen, prokoagulatorische und vasokonstriktive Proteine induziert wird.

1.4 pERK p44/42 MAP-Kinase

Zill et al. demonstrierten 2001 an Caco-2-Zellen, dass CML über RAGE die p44/42 MAP-Kinase-Aktivierung triggert. Diese Reaktion ist Zeit- (Peak bei 10-30min) und konzentrationsabhängig (Zill et al. 2001). In weiteren Studien wurde diese Aktivierung auch durch Brotkrustenextrakt (BCE) bewiesen. In Caco-2 Zellen weist BCE ebenfalls eine 1,98-fache Erhöhung der Phosphorylierung der p44/42 MAP-Kinase auf. Im Gegenzug nimmt die Aktivierung dieser Kinase beim Blocken von RAGE ab (Zill et al. 2003) (siehe Abb. 2). In einer anderen Publikation mit kardinalen Fibroblasten (CF) wurde aufgedeckt, dass BCE eine 5-fache Erhöhung der p44/42 MAP-Kinase nach 60 Minuten Inkubation im Vergleich zu unstimulierten Zellen aktiviert (Ruhs et al. 2007).

2 Zielsetzung

Es ist bereits bekannt, dass AGEs in der Brotkruste vorhanden sind und dass Brotkruste den NF- κ B-Signalweg induziert. Mehrere Publikationen zeigten jedoch, dass unterschiedliche Zelllinien verschieden auf Brotkruste reagieren. Diese Forschungsarbeit beschäftigt sich mit vier verschiedenen Zelllinien (jeweils zwei humanen und murinen) und deren NF- κ B-Reaktion bei der Stimulation mit BCE und Fraktionen. Der erste Schritt dieser Arbeit ist es, Methoden für die drei neuen Reporter-Zelllinien zu etablieren, mit denen man eine Aktivierung des NF- κ B-Signalweges nachweist. Des Weiteren soll der Rezeptorbesatz der Zelllinien für bekannte AGE-Rezeptoren wie RAGE, AGE-R1, AGE-R2 und AGE-R3 untersucht werden.

Folgende Fragen sollten in der Arbeit untersucht werden:

- 1) Aktiviert das Brotkrustenextrakt in allen Zelllinien den Transkriptionsfaktor NF- κ B?
- 2) Lassen sich einzelne aktive Fraktionen aus dem BCE isolieren und nachweisen?
- 3) Welche bekannten AGEs finden sich in BCE und in den aktiven Fraktionen?
- 4) Welche bekannten Rezeptoren finden sich in den verschiedenen Zelllinien?
- 5) Steht die Aktivierung der Signale im Zusammenhang zur Rezeptorexpression?

3 Material und Methodik

3.1 Allgemeine Chemikalien

Tabelle 1: alphabetische Auflistung der Hersteller der allgemeinen Chemikalien

| | |
|--|--|
| AppliChem GmbH (Darmstadt) Natrium-Chlorid TEMED Tris untrapure | Biochemika Vertriebs GmbH (Düsseldorf) Luminol |
| Bio-Rad Laboratories GmbH (München) Amidoschwarz Bromphenolblau Glycerin/H ₂ O | Biozym Scientific GmbH (Hessisches Oldendorf) Agarose |
| Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe) Acetonitril Essigsäure LB-Medium Trifluoressigsäure | Fluka Chemie (Buchs-CH) 6-amiono-n-carproic acid Mercaptoethanol |
| Merck KGaA (Darmstadt)/Calbiochem® Ocadainsäure EDTA 0,5 M Acridinoorange Zinkchlorid | Universitätsklinikum Halle/Saale (Halle) Wasserstoffperoxid |
| SIGMA-ALDRICH (München) Cumarsäure Glycerin Methanol 2-Propanol Tween 20 | SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg) Acrylamide/Bis Solution 40% Amoniumpersulfat Ethidiumbromid SDS |

3.2 Spezielle Chemikalien und Kits

Brotkruste bereitgestellt durch PD V. Somoza

Tabelle 2: alphabetische Auflistung der Hersteller der speziellen Chemikalien und Kits

| | |
|---|---|
| BIOLOGO Dr. Hartmut Schultheiß e.K. (Kronshagen) Antikörper gegen: Arg-Pyrimidin, Imidazol (Anti-3-DG-Imidazol (AGE) und Pentosidin) | biomers.net GmbH (Ulm) Primer für GAPDH, AGE-R1, RAGE (human & mouse), Scr II (mouse) |
|---|---|

| | |
|--|---|
| Biomol (Hamburg) /Imgenex (San Diego-USA) SEAPorter™ Assay Kit | BioVision (Milpitas-USA) BSA-AGE BSA |
| Cell Signaling Technology (Danvers) Antikörper gegen p44/p42 MAPK | Dianova GmbH (Hamburg) Anti-Rabbit Anti-Mouse |
| Fermentas GmbH (St. Leon-Rot-USA) GenRuler 100bp DNA Ladder PageRuler™ Prestained Protein Ladder PCR Mastermix (2x) #K0179 | J. Hoppe (physiologische Chemie Würzburg) PDGF |
| Life Technologies GmbH (Darmstadt)/ Invitrogen® dNTP Mix Primer für AGE-R2, AGE-R3 Reverse Transkriptase Trackit 1kb Plus DNA Ladder | Merck KGaA (Darmstadt)/ Novagen® Benzonase |
| Promega GmbH (Mannheim) M-MLV RT 5x Buffer PCR Mastermix Random Primer rRNasin®plus 40 u/µl Wasser für PCR | Qiagen (Hilden) RNase-free DNase Set RNeasy® Mini Kit /250 |
| Roche (Grenzach) Proteaseinhibitor Complete Mini | Rockland (Gilbertsville-USA) TNF-α humans recombinants Protein |
| Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg) GAPDH-Antikörper OST48-Antikörper Galectin-3-Antikörper | SIGMA-ALDRICH (München) LPS from E. coli 055:B5 Natriumvanadat PI 500 µg/ml Primer für Scr II (human) |
| Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham) Micro BCA™ Protein Assay Kit BCA™ Protein Assay Kit | Universitätsklinikum Halle/Saale (Halle) CML 2868 Interner Standard für Mykoplasmenkontrolle Standard-Probe für Spot-Blot |

3.2.1 Primer

Tabelle 3: Primerpaare mit DNA-Sequenzen, Genbanknummer, Basenpaaranzahl, Annealingtemperatur in °C und Anzahl der Zyklen

| | human | mouse | Primer | 5'-3' Sequenz | Genbank-Nummer | bp | Tm (°C) | Zyklen |
|-------------------|-------|-------|-----------|------------------------------|----------------|-----|---------|--------|
| AGE-R1 | x | x | sense | TGT TCA AGG AGG AGG GTG TC | NM 008725 | 300 | 58 | 28 |
| | x | x | antisense | AGC CTA GCC GGT TGT AAT CC | | | | |
| AGER2 | x | x | sense | ACA GAC GAG TAC AAC AGC GGCA | NM 008925 | 536 | 61 | 30 |
| | x | x | antisense | GCG GTA CTT GTC CCT GAT GGC | | | | |
| AGER3 | x | x | sense | TGA TGT TGC CTT CCA CTT TAA | NM 010705 | 152 | 55 | 29 |
| | x | x | antisense | CCA GGA CTT GTA TTT TGA ATG | | | | |
| RAGE | x | - | sense | TGA ACA CAG GCC GGA CAG AAG | NM 001136.3 | 326 | 56 | 37 |
| | x | - | antisense | CCC ATC CAA GTG CCA GCT AAG | | | | |
| | - | x | sense | CTG AAC TCA CAG CCA GTG TCC | NM 007425 | 298 | 55 | 42 |
| | - | x | antisense | CCC TGA CTC GGA GTT GGA TAG | | | | |
| Scavanger Rez. II | x | - | sense | TTA AGA TCA GGT GGG TTG GG | NM 002445.3 | 209 | 56 | 29 |
| | x | - | antisense | AGG TAT GAG CAT GGG AGC AG | | | | |
| SR-AII | - | x | sense | GAC ACG GAA CGC TTC CAG AA | NM 031195 | 713 | 50,5 | 26 |
| | - | x | antisense | GAT GAT AGT AGG GTG CTC TG | | | | |
| GAPDH | x | x | sense | GAC CAC AGT CCA TGC CAT CAC | NM 008084.2 | 453 | 60 | 22 |
| | x | x | antisense | TCC ACC ACC CTG TTG CTG TAG | | | | |
| Mykoplasmen | x | x | sense | YYC CTG RGT AGT AYR YWC GC | | 510 | 60 | 40 |
| | x | x | antisense | GCG GTG TGT ACA ARM CCC GA | | | | |

3.3 Puffer und Lösungen

Die folgenden Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit Reinstwasser hergestellt, welches unter Zuhilfenahme der MilliQ® Reinstwasseranlage aufbereitet wurde.

Tabelle 4: Rezepte der Puffer und Lösungen

| | |
|---|--|
| Mastermix (RT) 40% 5xPuffer 10% Oligo Primer 10% d NTP's 40% DEPC-Wasser | Lysepuffer (Western-Blott) 50 mM Tris/HCl, pH 6,7 2% SDS 100 µl β-Mercaptoethanol 100 µl Natriumvanadat (100 mM) 50µl Ocadainsäure ½ Tbl. Proteasemix |
| Laufmittel A der HPLC 0,01% TFA | Laufmittel B der HPLC ACN + 0,01% TFA |
| 10x PBS, pH 7,4 80 g/l NaCl 2 g/l KCl 14,41 g/l Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 2 g/l KH ₂ PO ₄ | 10x Laufpuffer für Elektrophorese (Proteine) 30g Tris 144g Gycin 15g SDS |
| 5%-iges Sammelgel 0,83ml Acrylamide mix (30%) 0,63 ml 1,0 M Tris/HCl pH 6,8 50 µl SDS (10%) 50 µl amonium persulfat (10%) 5 µl TEMED 3,4 ml Wasser | 10 %-iges Trenngel 3,3 ml Acrylamide mix (30%) 2,5 ml 1,5 M Tris/HCl pH 8,8 100 µl SDS (10%) 100 µl amonium persulfat (10%) 4 µl TEMED 4 ml Wasser |
| Transferpuffer I 1M Tris/HCl pH 10,4 10% Methanol | Transferpuffer II 1M Tris/HCl pH 10,4 Methanol |
| Transferpuffer III 1M Tris/HCl pH 9,4 6-amino-n-carproic acid Menathanol | Amidoschwarz 0,1% Amidoschwarz 25% 2-Propanol 10% Essigsäure |
| Comassie-Brillant-Blau-Färbelösung 80 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 3 % (v/v) HCl (37%) | Entfärbelösung für Gele 50 ml Methanol 100 ml Essigsäure |

| | |
|---|---|
| ad 1 l ddH ₂ O | Ad 1 l Wasser |
| 10x TBS-T 100 mM Tris/HCl, pH 7,6 1,5 M NaCl 1 % (v/v) Tween® 20 | 1%-iges BSA 1g BSA ad in 100ml TBS-T (1x) |
| Detektionslösung 2ml Luminol Cumarsäure 2ml 0,1M Tris/HCl pH8,5 1µl Wasserstoffperoxid | TAE-Puffer Tris/HCl Eisessig 0,5M EDTA Titriplex |
| Bromphenolblau 50% Glycerin einig Körner Bromphenolblau | |

3.4 Zellkulturchemikalien

Tabelle 5: alphabetische Auflistung der Hersteller der Zellkulturchemikalien

| | |
|--|---|
| Life Technologies GmbH (Darmstadt)/Gibco ® DMEM GlutaMAX™ (100x) PBS RPMI 1640 Trypsin-EDTA | HyClone and TC Tech products (Logan) FCS CS |
| Merck KGaA (Darmstadt)/Calbiochem® G418 Sulfate Penicillin/Streptomycin | PAA Laboratories GmbH (Pasching-Austria) Mycokill |

3.5 Verwendete Zelllinien

Tabelle 6: Hersteller der Zelllinien

| | |
|--|--|
| BioCat GmbH (Heidelberg) NF-κB/293/ GFP-Luciferase NF-κB/Jurkat/GFP | Biomol GmbH (Hamburg) NF-κB/SEAPorter™ RAW Cell Line |
| Universitätsklinikum Halle/Saale (Halle) MFB | |

3.5.1 *NF-κB/293/GFP-Luciferase*

Die NF-κB/293/GFP-Luciferase-Zelllinie leitet sich von humanen embryonalen Nierenzellen (human embryonal kidney cells, HEK) ab. Die Zellen wurden mit HIV-basierten pseudoviralen Partikeln mit einem Lentivektor transduziert, der cop-GFP und firefly Luciferase mit einem Cytomegalivirus-Promoter und vier Kopien des NF-κB Response Element coexprimiert. Somit wird durch Aktivierung des NF-κB-Signalweges die Expression des GFP- und Luciferase-Reporters gestartet. Die GFP-positiven Zellen, und damit auch die NF-κB Aktivität, werden durch ein Fluoreszenzmikroskop sichtbar dargestellt und quantitativ durch FACS nachgewiesen. In der Versuchsreihe wurde die Fluoreszenz des GFP gemessen.

3.5.2 *NF-κB/Jurkat/GFP*

Die NF-κB/Jurkat/GFP-Zelllinie, im Weiteren nur noch Jurkat genannt, leitet sich von humanen T-Lymphozyten ab und ist somit eine nicht adhärenz Zelle. Die Zellen wurden mit HIV-basierten pseudoviralen Partikeln mit einem Vektor des GFP-Reportergens, mit einem Cytomegalivirus-Promoter und vier Kopien des NF-κB Response Elements transduziert. Die Aktivierung des NF-κB-Signalweges führt gleichzeitig zur Expression des GFP. Die GFP-positiven Zellen werden quantitativ mittels FACS nachgewiesen.

3.5.3 *NF-κB/SEAPorter™ RAW Cell Line*

Die adhärenz NF-κB/SEAPorter™ RAW -Zelllinie leitet sich von Mausmakrophagen ab und wurde stabil mit dem SEAP-Reportergen (alkalische Phosphatase), welches unter transkriptionaler Kontrolle des NF-κB response Elements steht, transfiziert. SEAP ist ein ungebundenes Protein, welches gebildet wird, wenn es zur Aktivierung des NF-κB-Gens kommt. Unter Nutzung des IMGENEX SEAPorter™ Assay Kit wurde die Konzentration des SEAP im Überstand ermittelt, welche die NF-κB –Aktivität widerspiegelt.

3.5.4 *MFB*

Diese Zelllinie wurde aus der Laborarbeit von Frau Ruhs übernommen.

Es wurden männliche C57Bl/6 WT-Mäuse verwendet, aus deren Herzen die murinen kardialen Fibroblastenzelllinie generiert wurde (Ruhs et al. 2007).

3.6 Materialien

Tabelle 7: alphabetische Auflistung der Hersteller der Materialien

| | |
|--|---|
| Alpha Laboratories (Eastleigh- UK) 0,5-10 µl Gel Tip Loose | American National Can (Chicago-USA) Parafilm |
| BD Biosciences (Heidelberg) FACS-Röhrchen | Bio-Rad Laboratories GmbH (München) Filterpapier: extra thick blot paper Criterion size |

| | |
|---|--|
| FACSCalibur Zentrifugenröhrchen 15ml, 50ml | Innere Platte Western-Blot: Mini Protean® System (Glaskets & Glass Plates) Spacer plates W /0,75mm |
| Eppendorf AG (Hamburg) 2 ml Safe-Lock Tube Pipetten: epT.I.P.S. | Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen) Cryo-Vial CRYO-S. |
| Mettler Toledo GmbH (Gießen) pipet lite SL1000, SL200, SL20, SL10, SL2 | Millipore GmbH (Schwalbach/Ts.) PVDF Transfer Membran 0,45 µm Pore |
| SARSTEDT AG & Co. (Nümbrecht) 0,5 ml Tube | Sartorius AG (Göttingen) Filter: Minisart ® 0,45 µm Pore |
| TPP Techno Plastic Products AG (Trasadingen-CH) Serologische Pipetten 2ml, 5ml, 10ml Zellkulturflaschen 25 cm ² , 75cm ² Zellkulturschale 60,1 cm ² Zellkulturtestplatten 12, 24, 96 Wells | Whatman GmbH (Dassel) Gel Blot Paper GB003 |

3.7 Geräte

Tabelle 8: alphabetische Auflistung der Hersteller der Geräte

| | |
|--|--|
| AEG (Nürnberg) Mikrowelle: Mikromat | Agilent-Technologies Deutschland GmbH (Böblingen) HPLC |
| Artisan Scientific Corporation (Champaign-IL) Magnetischer Rührer IKAMAG ® REO | BANDELIN electronic GmbH & Co. KG (Berlin) Ultraschallbad Sonovex digital 10P |
| B. Braun Biotech international GmbH (Melsungen) Schwenker: Certomat ®H | Biometra GmbH (Göttingen) Stromquelle: Power Pack P25 TRIO-Thermoblock UV-Bank |
| Bio-Rad Laboratories GmbH (München) Blotapparatur: Trans-Blot ®SD semi-dry transfer cell Elektrophorese: Miniprotean II TM MINI-SUB ®Cell GT Stromquelle: PowerPac 100 | BMG Labtechnologies (Ortenberg) FLUOstar OPTIMAreader |

| | |
|---|--|
| Brand GmbH & Co KG (<i>Wertheim</i>) Multipipette: HandyStrep® | Carl Zeiss AG (<i>Jena</i>) Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M |
| CONSORT nv (<i>Turnhout-B</i>) Stromquelle: E835 | Drummond Scientific Company (<i>Broomall-US</i>) Pipet-Aid XP |
| Eppendorf AG (<i>Hamburg</i>) PCR-Geträt: Mastercycler gradient Speed Vac Concentrator 5301 Thermomixer comfort Thermomixer 5436 | FUJIFILM Europe GmbH (<i>Düsseldorf</i>) LAS-3000 |
| Gesellschaft für Labortechnik mbH (<i>Burgwede</i>) Wasserbad | Heraeus Holding GmbH (<i>Hanau</i>) Bench: HERAsafe Brutschrank: HERAcell Funtion line Zentrifuge: Biofuge fresco |
| Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (<i>Schwabach</i>) Polymax 1040 | IKA®-Werke HmbH & Co. KG (<i>Staufen</i>) Magnetrührer: IKA®RH basic 2 |
| Liebherr (<i>Biberach an der Riss</i>) Kühlschrank: profline (4°C) Premium (-20°C) Comfort (-20°C) | NanoDrop products (<i>Wilmington</i>) ND-1000 Spectrophotometer |
| Nikon (<i>Düsseldorf</i>) Mikroskop: Eclipse TS100 | Philipp Kirsch GmbH (<i>Offenburg</i>) Kühlschrank 4°C |
| Sartorius AG (<i>Göttingen</i>) Waagen: BP210S, portable, TR1502S | Schärfe System (<i>Reutlingen</i>) Zellzähler: Casy |
| Scientific Industries (<i>New York-US</i>) Vortex genie ®2 | Tecan Group Ltd. (<i>Männedorf</i>) ELISA-Reader: Infinite ® M1000 |
| Universitätsklinikum Halle/Saale (<i>Halle</i>) Gießapparatur für Ethidiumbromidgele von Hr. Borofrsky | WTW GmbH (<i>Weilheim</i>) pH-Meter: Microprocessor |

3.8 Auswert-Software

Tabelle 9: Hersteller der Auswert-Software

| | |
|--|--|
| Microsoft Deutschland GmbH (Unterschleißheim) Microsoft Word 2010 Microsoft Excel 2010 | Raytest (Straubenhardt) AIDA Image Analyzer v.3.51 |
| Swiss Academic Software GmbH (Wädenswil-CH) Citavi 3.3.0 | IBM Deutschland GmbH (Ehningen) IBM SPSS Statistics 20 |

3.9 Brotkrustenverarbeitung

3.9.1 Herstellung Brotkrustenextrakt (BCE)

Damit die Inhalte der Brotkruste keinen großen Schwankungen unterliegen, wurde diese unter standardisierten Bedingungen hergestellt. Es wurde ein Brot aus einem Roggen und Weizen-Gemisch gebacken. Anschließend wurde die Kruste vom Brotlaib entfernt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einer Mühle gemahlen. Zu Entfettung wurde das erhaltene Pulver mit Chloroform verrührt und filtriert. Schlussendlich wurde das entfettete Pulver gefriergetrocknet. (Lindenmeier et al. 2002)

Die entstandene Brotkruste wurde in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. Veronika Somoza dem Forschungslabor der Klinik für Herzchirurgie des Universitätsklinikums Halle (Saale) zur Verfügung gestellt.

Von der bei -21°C gelagerten Brotkruste wurden 250 ± 1 mg eingewogen und in 1 ml PBS gelöst. Der Lösevorgang beinhaltete eine Behandlung im Ultraschallbad (real, 10*10%) für 3x 15 min. Nach dem Bad wurde die Lösung gevortext. Jedes Tube wurde anschließend 10 min lang bei Raumtemperatur mit 855 g (entsprechen 3000 rpm der Biofuge fresco Zentrifuge) zentrifugiert, der Überstand abgenommen und dieser 30 min lang bei 9503g erneut zentrifugiert. Der entstandene Überstand entspricht dem Brotkrustenextrakt, welches bis zur Verwendung bei -21°C eingefroren wurde.

3.9.2 Herstellung Brotkrustenfraktionen

Das BCE wurde unter Nutzung der HPLC mit folgendem Programm in 15 Fraktionen eingeteilt: Pro Durchlauf wurden 10 μl einer 1:2 Verdünnung des BCE mit dem Laufmittel A (Wasser und 0,01% TFA) injiziert. Bei einem Fluss von 0,2 ml/min, einer Temperatur von 50°C und einem Gradienten des Laufmittels B (ACN und 0,01% TFA), der sich innerhalb 40 min von 0% auf 40% aufbaute, wurde über 20 min die Absorptionsmessung bei der Wellenlänge $\lambda=280$ nm und in der zweiten

Darstellung der Fluoreszenz bei einer Anregung bei der Wellenlänge von 360nm und einer Extrinktion bei $\lambda=440$ nm geschrieben (siehe Abbildung 3). Die Absorption von 280 nm entspricht der Darstellung von Proteinen und die Fluoreszenz von 360 nm entspricht der Darstellung von AGEs. Um die verschiedenen Proteine möglichst voneinander zu trennen, wurden die 15 Fraktionen des BCE nach diesem Chromatogramm (Abb. 3, A) eingeteilt. Mit zehn Durchgängen wurden die jeweiligen Fraktionen in unterschiedlichen Tubes gesammelt. Das jeweilige Endprodukt besaß eine sehr geringe Proteinkonzentration, sodass das Wasser der Fraktionen bei 45°C im SpeedVac verdunstet und das Pellet in 50 μ l PBS resuspendiert wurde. Bis zur Nutzung wurden die Fraktionen bei -21°C eingefroren. Im ersten Diagramm sieht man die Darstellung von Proteinen (Abb. 3, A) und im zweiten Chromatogramm (Abb. 3, B) die Aufzeichnung nach 360 nm Absorption und 440 nm Fluoreszenz, die spezifisch für AGE-Modifikation sind.

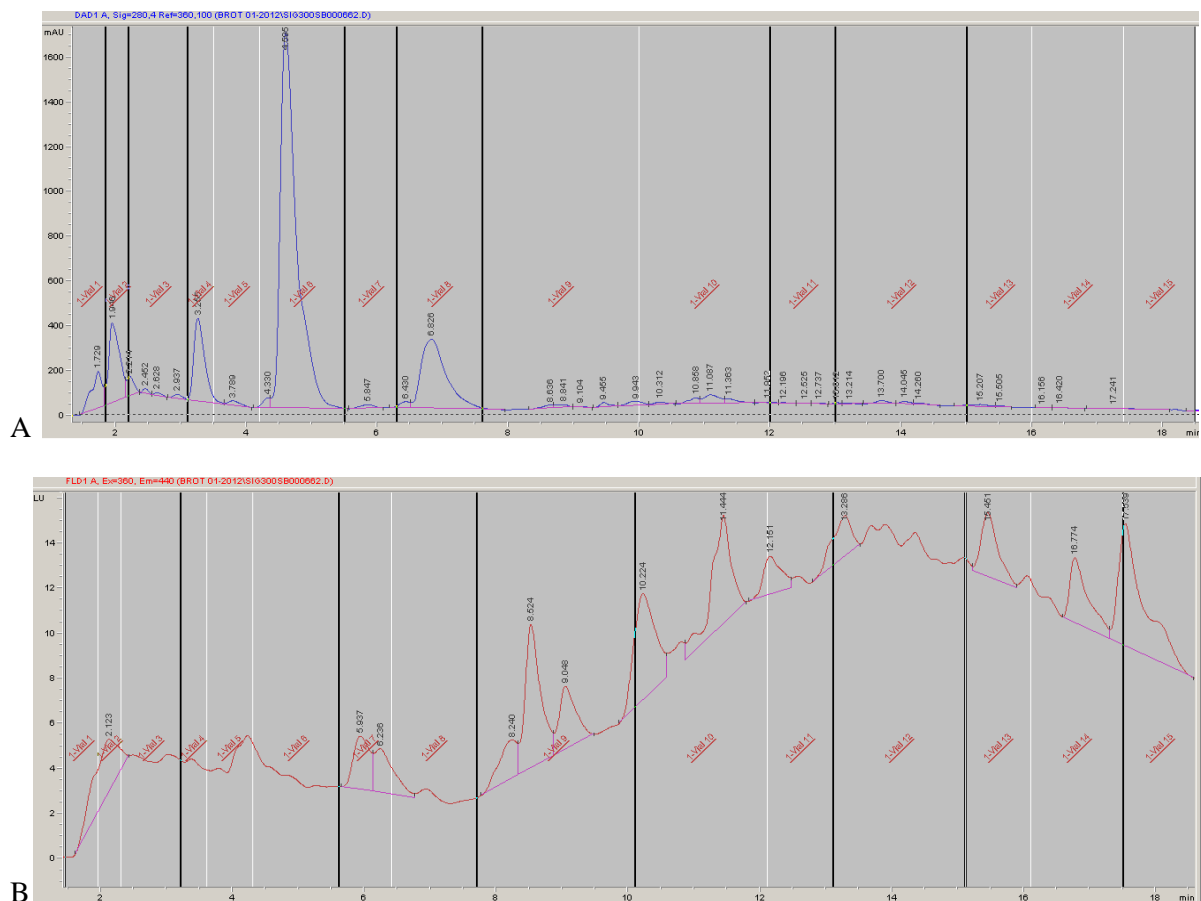


Abbildung 3: A: 280/360 Chromatogramm der HPLC, Injektion 10 μ l der 1:2 Verdünnung BCE, Sammeln von 15 Fraktionen über 20 min, B: 360/440

3.9.3 Fluoreszenzmessung der Fraktionen

Am Anfang der Untersuchung wurden alle Fraktionen mittels Spektrometer gemessen. Dazu wurden 10 μ l der jeweiligen Probe mit 190 μ l PBS verdünnt und auf eine dunkle 96-Well-Platte pipettiert. Das Spektrometer ermittelt Fluoreszenzwerte bei einer Wellenlänge von 405 nm für eine Absorption

von 330 nm und als weitere Variable 360/440 nm. Die 330/405er-Werte stehen ebenso wie die 360/440-er für AGE-Modifikationen. Der Versuch wurde mehrfach durchgeführt.

3.9.4 Proteinbestimmung der Fraktionen

1. Methode: Über die Bestimmung der Absorptionseinheiten bei einer Wellenlänge von 280 nm kann man, wie oben beschrieben, ebenfalls die Proteinkonzentration ermitteln. Dafür wurde ebenfalls ein Spektrometer (Nanodrop) verwendet. Als Vergleichswert wurde PBS aufgetragen und dessen Absorption abgezogen. Es wurde je 1 µl der Fraktion aufgetragen. Das Ergebnis der Konzentration wurde in mg/ml angegeben.

2. Methode: Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde das Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit verwendet. Das Prinzip beruht auf der Reduktion zweiwertiger Kupferionen von Proteinverbindungen zu einwertigen Kupferionen. Diese bilden mit zwei Molekülen der Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbstoff, der eine Absorption bei der Wellenlänge von 562 nm zeigt. Als Protein-Standard wurde eine Standardreihe aus Rinderserumalbumin (BSA) mit folgenden Konzentrationen [in µg/ml] genutzt: 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 20; 25; 40; 125; 200; 250; 500; 750; 1000; 1500; 2000. Mittels der Absorptionswerte der Standardreihe wurde eine Regressionsgerade ermittelt, mit deren Geradengleichung die Proteinkonzentration der Fraktionen errechnet werden konnte.

Zunächst wurde die Arbeitsreagenz hergestellt, die aus 25 Teilen Reagenz A (sodium carbonat, sodium bicarbonat, sodium tartrate in 0,2 N NaOH), 24 Teilen Reagenz B (4% bicinchoninic acid in Wasser) und einem Anteil Reagenz C (4% cupric sulfate, pentahydrate in Wasser) besteht. Die Fraktionen wurden mit PBS 1:5 verdünnt. Es wurden jeweils 25 µl der Proben und der Standardreihe in eine durchsichtige 96-Well-Platte pipettiert und 200 µl der Arbeitsreagenz auf jedes Well hinzugefügt. Die Platte wurde anschließend 30 min lang bei 60° C leicht geschüttelt. Nach stattgefundenener Reaktion wurde die Absorption bei 562 nm gemessen und die Konzentration aus der oben genannten Geradengleichung errechnet.

3.10 Zellkulturtechniken

3.10.1 Kultivierung und Passagieren der Zellen

Tabelle 10: Kultivierung und Passagieren der Zellen

| Zelltyp | Zellzahl zur Kultivierung | Standardmedium | Aufzuchtmedium nach Auftauen | Standardbedingungen |
|---------|---------------------------|--|--|---|
| HEK | $5 \cdot 10^5$ /ml | DMEM, 5% FCS | DMEM, 10% FCS, Penicillin (100 U/ml) /Streptomycin (100 µg/ml), 2% Mykokill | 37 °C, 5% CO ₂ , feuchte Atmosphäre |
| Jurkat | $5 \cdot 10^5$ /ml | RPMI, 5% FCS | RPMI, 10% FCS, Penicillin (100 U/ml) / Streptomycin (100 µg/ml), 2% Mykokill | |
| RAW | $5 \cdot 10^5$ /ml | DMEM, 5% FCS, G418 (500 µg/ml), 4 mM L-Glutamine | DMEM, 10% FCS, Penicillin (100 U/ml) /Streptomycin (100 µg/ml), 4 mM L-Glutamine, G418 (500 µg/ml) | |
| MFB | $5 \cdot 10^5$ /ml | DMEM, 5% CS | DMEM, 10% CS, Penicillin (100 U/ml) /Streptomycin (100 µg/ml), 2% Mykokill | |

Die HEK-Zellen wurden in 25 cm² Zellkulturflaschen mit Standardmedium unter Standardbedingungen kultiviert. Die Zellen wurden alle vier bis sechs Tage passagiert. Das Standardmedium wurde abgesaugt und die Flasche mit 3 ml des 37° C gewärmten PBS gespült. Anschließend wurde die Flasche mit 3 ml Trypsin-EDTA ca. 3 min inkubiert, 7 ml DMEM hinzu geführt und unter langsamen auf- und abpipettieren alle Zellen gelöst. Die Zellsuspension wurde nun in ein 15 ml-Falcon überführt und 5 min bei 95g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Standardmedium resuspendiert. Mittels einer Zählkammer oder eines Zellzählmessgeräts wurde die Zellkonzentration berechnet und die Zellen mit einer Dichte von $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml erneut ausplattiert.

Die Jurkat-Zellen gehören zu den nicht adhären Zellen und wurden in 25 cm² Zellkulturflaschen mit Standardmedium unter Standardbedingungen kultiviert. Das gesamte Medium inklusive der nicht adhären Zellen wurde in einen Falcon überführt und bei 390 g für 10 min zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde im Standardmedium resuspendiert und ein Teil davon in frisches, 37°C warmes Standardmedium überführt, damit sich ca. $5 \cdot 10^5$ Zellen pro ml Zellsuspension (Gesamtvolumen: 10 ml) befinden.

Sowohl die RAW-Zellen als auch die MFB-Zellen wurden in 10 cm² Zellkulturplatten mit Standardmedium unter Standardbedingungen kultiviert. Zum Passagieren wurde das Medium

abgesaugt, die Platte mit 10 ml PBS gespült und 2 ml Trypsin-EDTA hinzu geführt. Nach ca. 30 s wurde das überschüssige Trypsin-EDTA abgesaugt. Durch Klopfen und Resuspension mit dem Standardmedium lösten sich die Zellen ab. Es wurden $5 \cdot 10^5$ Zellen pro ml Zellsuspension auf die neue Zellkulturplatte ausgesät.

3.10.2 Auftauen von Zellen

Die Lagerung der eingefrorenen Zellen erfolgte in einem Kryo-Versorgungssystem über flüssigem Stickstoff. Das Kryo-Vial wurde in warmes Wasser mit einer Temperatur von ca. 40° C gehalten bis nur noch ein kleiner Eiskristall sichtbar war. Alle Zelltypen haben diesen ersten Schritt des Auftauens und den nachfolgenden der Aufzucht gemeinsam.

Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt. Mit einer Konfluenz von ca. 80% wurden die Zellen passagiert. Ab der 2. Passagenummer (P2) wurde auf das Standardmedium gewechselt und, wie oben beschrieben, weiter fortgefahren.

Die aufgetauten HEK-Zellen wurden in eine Zellkulturflasche (75 cm²) mit 20 ml Aufzuchtmedium überführt.

Die Jurkat-Zellen wurden in ein mit 10 ml Aufzuchtmedium gefüllten 15 ml- Falcon überführt und mit 390 g zehn Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in 20 ml Aufzuchtmedium resuspendiert und in einer 75 cm² Zellkulturflasche ausgesät.

Die RAW-Zellen wurden ebenfalls nach Überführung in ein mit Aufzuchtmedium gefüllten Tube zentrifugiert (für 5 min 95 g). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 10 ml Aufzuchtmedium suspendiert und auf einer Zellkulturplatte kultiviert.

Der Auftauvorgang der MFB-Zellen unterscheidet sich von dem der RAW-Zellen lediglich in den Zentrifugationsbedingungen. Die aufgetauten Zellen werden 5 min lang bei 214 g vom Medium getrennt.

3.10.3 Aussaat der Zellen

Die Zellen wurden, wie bei dem Passagevorgang beschrieben, in Zellsuspension gebracht. Nach Ermittlung der Zellzahl/ml mittels Zellzählmessgerät wurde eine zweite Zellsuspension mit Standardmedium hergestellt, welche die entsprechende Zellzahl/ml zur Aussaat enthielt. Die Zellen wurden auf 24er- oder 96er-Wellplatten ausgesät und eine bestimmte Zeit lang bei Standardbedingungen kultiviert (siehe Tab. 11). Dabei besteht bei jeder Zellart eine unterschiedliche Dauer bis zur Konfluenz. Anschließend wurde entweder sofort stimuliert oder ein Zwischenschritt eingefügt, bei dem die Zellen gehungert wurden (Standardmedium ohne Serum).

Tabelle 11: Kultivierungsbedingungen der Zelltypen

| Zelltyp | Methode | Zellzahl pro ml | Well | Volumen | Kultivierungsdauer | Hungermedium | Dauer bis Stimulation | Stimulationszeit |
|---------|--------------|------------------|------|-------------|--------------------|--------------|-----------------------|------------------|
| HEK | Western-Blot | $5 \cdot 10^3$ | 96 | 200 μ l | bis Konfluenz | + | 1 d | 60 min |
| | TECAN | $2 \cdot 10^4$ | 96 | 100 μ l | - | - | 1 d | 24 h |
| | FACS | $5 \cdot 10^4$ | 24 | 500 μ l | - | - | 1 d | 24 h |
| Jurkat | Western-Blot | $1 \cdot 10^5$ | 96 | 100 μ l | - | - | 1 d | 60 min |
| | FACS | $1,2 \cdot 10^5$ | 96 | 100 μ l | - | - | 1 d | 24 h |
| RAW | Western-Blot | $5 \cdot 10^3$ | 96 | 200 μ l | bis Konfluenz | + | 1 d | 60 min |
| | Assay | $5 \cdot 10^4$ | 96 | 100 μ l | - | - | 16 h | 24 h |
| MFB | Western-Blot | $1,7 \cdot 10^3$ | 96 | 200 μ l | bis Konfluenz | + | 2 d | 60 min |

3.10.4 Nachweis Mykoplasmen mittels PCR

Alle Zellenlinien wurden in regelmäßigen Abständen auf Mykoplasmen untersucht. Nur eindeutig negativ getestete Zellkulturen wurden für Experimente genutzt.

Der Nachweis erfolgt aus dem Zellpellet der jeweiligen Zellen. Dafür müssen die Zellen mit 10 ml PBS gespült, von der Zellkulturplatte abgelöst, bei 95° C 15 min lang inkubiert und anschließend für 3 min bei 16060 g zentrifugiert werden. Danach nimmt man den mit DNA enthaltenen Überstand und verdünnt diesen 1:1000 mit Wasser, das Ergebnis entspricht der Probe.

Pro 2,5 μ l Probe wurden zwei Ansätze mit je 20 μ l Mastermix (5,5 μ l Wasser, 1 μ l Primer for, 1 μ l Primer rev., 12,5 μ l Mastermix) hergestellt und pro Ansatz jeweils 2,5 μ l interner Standard oder Wasser hinzugefügt. Außerdem wurden positive Kontrollen (Mykoplasmen und Wasser, interner Standard und Wasser, Mykoplasmen und interner Standard) und eine negativ Kontrolle (nur Wasser) zum Vergleich genutzt. Alle entstandenen Proben wurden nun in einer PCR-Reaktion (Annealingtemperatur = 60°C, 40 Zyklen) (Abschnitt 3.16) eingesetzt. Anschließend wurden alle Proben auf 1%-iges TEA-Agarose-Gel mit Ethidiumbromid aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Unter der UV-Bank wurden Mykoplasmenkontaminationen bei einer Größe von 510 bp sichtbar, wohingegen der interne Standard bei 1000 bp erkennbar wurde.

3.11 Fluoreszenzmikroskop

Die adhärennten Zellen, die GFP exprimieren, konnten mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert werden.

3.12 Fluoreszenzbestimmung der HEK-Zelllinie

Die HEK-Zellen wurden, wie oben beschrieben, ausgesät und nach 24 Stunden stimuliert. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Medium abgesaugt und 50 µl des Lysepuffers, bestehend aus PBS und 0,5% Triton X-100 (-20° C), pro Well auf den Zellrasen pipettiert. Nach kurzem Schütteln und Klopfen werden die Zellen permeabilisiert und somit kann das grünfluoreszierende Protein (GFP) freigesetzt werden. Anschließend wurden die Proben auf eine schwarze, eisgekühlte Well-Platte überführt, damit keine Temperaturschwankungen die Messwerte verfälschen.

Das GFP besitzt zwei Anregungsmaxima. Das Erste liegt bei einer Wellenlänge von 395 nm und das Zweite bei 475 nm. Die Emissionswellenlänge liegt bei 509 nm.

Im Spektrometer konnte die Fluoreszenz (genutzte Exzitation = 470 nm ± 5 nm, Emission = 509 nm ± 5 nm, Verstärkung nach Probe mit maximaler Stimulation) bestimmt werden.

3.13 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren, welches die Analyse von Zellen erlaubt, indem einzelne Zellen in hoher Geschwindigkeit durch eine dünne Messkammer fließen, in der ein Laserstrahl diesen anstrahlt. Dabei entsteht für die einzelnen Zelltypen charakteristisches Streulicht. Je voluminöser die Zelle ist, desto mehr Streulicht entsteht. Durch diesen und weitere Parameter entstehen unterschiedliche Effekte, die Rückschlüsse auf Zelleigenschaften und folgend auch auf den Zelltyp schließen lassen. Die Durchflusszytometrie wurde zur Auswertung nach der Stimulation der HEK- und Jurkat-Zellen genutzt.

Zu jeder Probe wurde Propidiumiodid (PI) pipettiert (Endkonzentration $c = 10 \mu\text{g/ml}$). PI tritt leicht durch durchlässige Membranen toter Zellen, wohingegen intakte Membranen lebender Zellen es ausschließt. Somit werden tote Zellen markiert, da diese Artefakte auslösen können. PI hat sein Anregungsmaximum bei 488 nm und emittiert bei 617 nm. Des Weiteren wurde die GFP-Fluoreszenz gemessen (Anregungsmaxima: 395 nm & 475 nm, Emissionswellenlänge: 509 nm), die in diesen Zelllinien die NF-κB-Aktivität widerspiegelt.

Wie folgt, wurde vorgegangen: zuerst wurden alle Zellen in einem Data-plot aufgezeichnet. Die Seitwärtsstreuung (SSC, Side Scatter), als ein Parameter für die innere Komplexität der Zelle (Granularität der Zelle, Größe und Struktur des Zellkerns), wurde in Abhängigkeit von der Vorwärtsstreuung (FSC, Forward Scatter), als ein Maß für das Zellvolumen, aufgetragen. In diesem Diagramm wurde die Zellpopulation markiert (entspricht im Data-plot R1), die in einem zweiten Data-plot erneut dargestellt wurde (FL2-H abhängig von FL1-H). FL2 zeigt die Fluoreszenz von PI und FL1 die des GFP, somit wären alle Zellen im Bereich R2 die stimulierten, GFP-exprimierten Zellen. Im Bereich R4 finden sich die Zellen, die kein GFP exprimieren.

Diese Methode wurde für die Jurkat- und anfangs auch für die HEK-Zelllinie verwendet, da beide Zelllinien GFP produzieren können.

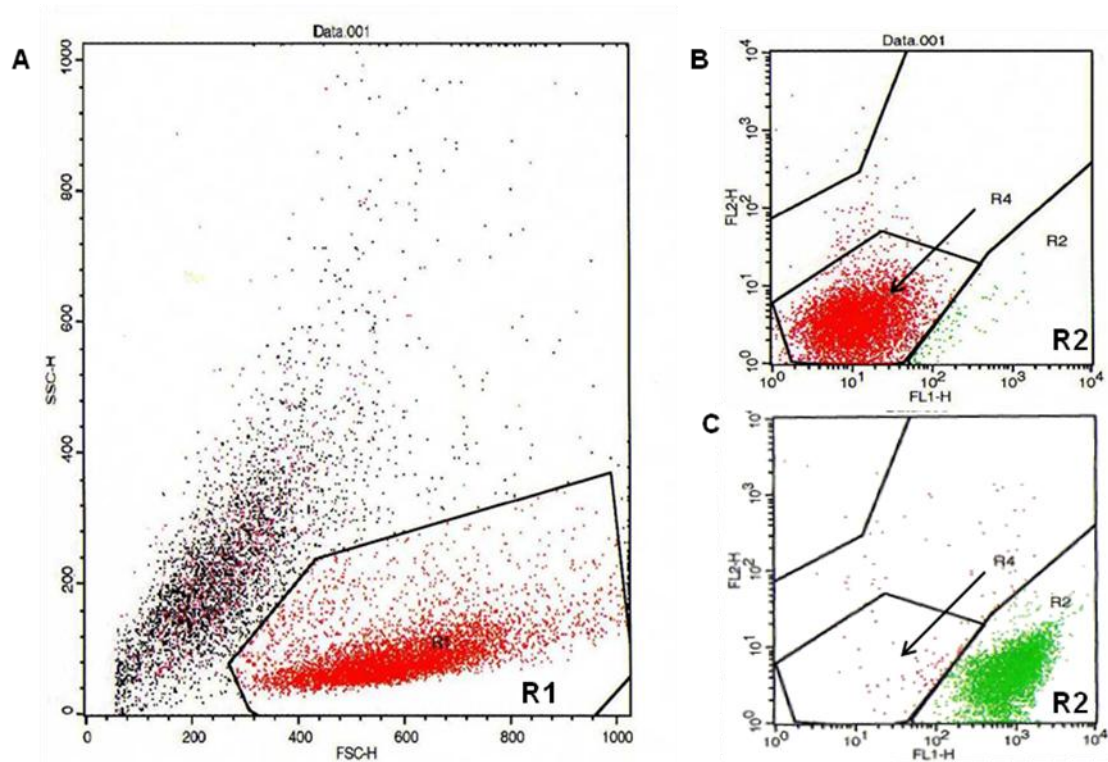


Abbildung 4: FACS-Data-plot, Jurkat, A: Seitwärtsstreuung abhängig von Vorwärtsstreuung, R1 entspricht allen Jurkatzellen. B: Versuch mit unstimulierten Zellen. C: Versuch mit Stimulation mit 100 ng/ml TNF- α .

3.14 SEAP-Assay

Die NF- κ B-Aktivität wurde mittels IMGENEX SEAPorter™ Assay Kit ermittelt.

Die RAW-Zellen wurden, wie in der o.g. Tabelle beschrieben, ausgesät. Nach 16 h wurden die Zellen stimuliert und nach weiteren 24 h wurde aus jedem Well 10 μ l des Überstandes, in dem das SEAP sezerniert wurde, abgenommen. In Vorversuchen wurde ersichtlich, dass eine verfrühte und spätere Abnahme die Daten verfälscht (siehe unten).

Der Überstand wurde 1:1 zu dem Probenverdünnungspuffer pipettiert. Zum Vergleich wurde eine Standardreihe des SEAP hergestellt. Auf jedes Well wurden 10 μ l Wasser pipettiert und weitere 10 μ l der Probe bzw. des Standards. Die Well-Platte wurde für 30 min bei 65° C inkubiert, um das SEAP zu inaktivieren. Dann wurden 100 μ l PNPP Substratlösung in jedes Well pipettiert und die Wellplatte für 30 min bei 40° C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 405 nm gemessen und die Werte nach der Standardkurve des SEAP-Standards errechnet.

3.15 Protein-Analytik

3.15.1 Herstellung Zellysats

Für adhärenente Zelllinien (HEK, RAW und MFB): Nach erfolgter Stimulationszeit wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und auf jedes 2 cm²-Well 50 µl 2% SDS-Lysepuffer pipettiert und die Wellplatte ca. 5-10 min geschüttelt. Anschließend wurde der Vorgang mit 10 µl Benzonselösung wiederholt. Nachfolgend wurde zu jeder Probe 7 µl Bromphenolblau hinzugefügt. Die Proteinproben wurden für 10 min bei 60° C inkubiert und bei -20 °C eingefroren.

Für nichtadhärenente Zelllinien (Jurkat): Die Zellsuspension wurde in 500 µl-Tubes überführt und 10 min lang bei 9503 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 50 µl PBS gevortext. Anschließend wurde der Vorgang wiederholt, aber das Zellpellet in 40 µl 2% SDS-Lysepuffer gelöst. Dem Proteingemisch wurde 5 µl Bromphenolblau hinzugefügt und ebenfalls 10 min bei 60° C inkubiert und bei -20° C eingefroren.

3.15.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Proteinauftrennung wurde eine SDS-PAGE verwendet. APS und TEMED sind zuständig für die Polymerisation des Gels. Die Größe der Poren im Gel ist abhängig von der Konzentration des Polyacrylamids. Dementsprechend eignen sich niedrigprozentige Gele besser zur Auftrennung von großen Proteinen und hochprozentige zur Auftrennung von kleinen. Das SDS reagiert mit dem Protein und negativiert es mit seiner eigenen Ladung. Das hat den Vorteil, dass die elektrische Ladung der Proteine keine Auswirkung auf den Lauf im Gel hat. Alle Moleküle wandern dadurch zum Pluspol, sobald eine elektrische Spannung angelegt wird.

In allen Proben sollten Proteine detektiert werden, die eine Größe zwischen 30 und 50 kDa aufweisen. Aus Vorversuchen wurde deutlich, dass ein 10 %-iges Trenngel am geeignetsten dafür ist, da es Proteingrößen von 15-100 kDa auftrennt. Zuerst wurde dieses Gel angefertigt, mit Wasser überschichtet und ca. 30 min lang ausgehärtet. Als nächster Schritt wurde das überschüssige Wasser wieder entfernt und mit 5 %-igem Sammelgel ersetzt. In dieses wurden Kämme gesteckt, welche später als Tasche für die Proben dienen, und erneut gewartet, bis es aushärtet.

Nun wurden die Gele in eine Elektrophorese-Apparatur eingebaut und diese mit 1x Laufpuffer gefüllt. Die Proben müssen 10 min lang bei 95° C denaturiert werden, um Sekundär- und Tertiärstrukturen aufzubrechen. Danach pipettiert man jeweils 10 µl der Proben in die jeweilige Tasche. Zur Proteingrößenbestimmung wurde zusätzlich ein Proteingrößenstandard (Marker: PAGE Ruler Prestained) aufgetragen. Nach Anlegen einer elektrischen Spannung (60 V für ca. 15 min) wandern die Proben in dem Sammelgel, bis sie unabhängig von ihrer Größe in einer Ebene fokussiert wurden. Nachfolgend wurden die Proben abhängig von ihrer Größe für 60 - 90 min bei 130 V

aufgetrennt. Die größeren Moleküle wurden stärker aufgehalten und wanderten dementsprechend nicht so weit wie kleinere.

3.15.3 Western-Blot

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine mittels einer Blot-Apparatur auf eine PVDF Transfer Membran gebracht.

Die Aufschichtung der verschiedenen Medien für den Blot stellt sich von unten nach oben folgendermaßen dar: 2 Filterpapiere, gefolgt von der PVDF Membran, dem Gel und einem dritten Filterpapier. Das erste Filterpapier wurde in Transferpuffer I getränkt. Das zweite Filterpapier ist durchfeuchtet von Transferpuffer II. Die PVDF Membran wurde in Methanol aktiviert, in Wasser abgespült und in Transferpuffer II getränkt. Das Gel ist wiederum vom Transferpuffer II durchfeuchtet und das dritte Filterpapier vom Transferpuffer III durchtränkt. Nach dieser Reihenfolge müssen alle Teile sorgfältig, ohne Blasen auf die Blot-Apparatur gebracht werden.

Der Transfer begann mit dem Anlegen einer elektrischen Spannung, wobei die Stromstärke konstant blieb. Diese errechnete sich aus der Fläche der Membran x 1,2 (entspricht mA). Nach 90 min Blotten wurde das Ergebnis durch Anfärben der Membran mit Amidoschwarz und des Gels mit Comassie-Brillant-Blau-Färbelösung kontrolliert. Die Membran wurde nach 5 min Inkubationszeit mit destilliertem Wasser wieder entfärbt. Das Gel wurde dann über Nacht in einer Entfärbelösung bei leichtem Rütteln entfärbt. Beides wurde anschließend mittels Image-Reader LAS-3000 fotodokumentiert.

3.15.4 Spot-Blot

Der Spot-Blot mit anschließender Immunodetektion dient dem qualitativen Nachweis von AGEs. Die Apparatur arbeitet mit einem Unterdruck, welcher die Proteine auf die Membran saugt. Zum Vergleich wurde mit einer Standardreihe von BSA gearbeitet.

Die PVDF-Membran wurde in Methanol aktiviert, mit Wasser gewaschen und in PBS getränkt. Zur Seite des Unterdruckes wurde ein Filterpapier, welches ebenfalls in PBS getränkt war, eingefügt. Die aufgetauten Proben wurden 10 min bei 37° C mit 152 g geschüttelt und falls nötig im Anschluss mit PBS verdünnt. Zuerst wurden die Spots mit 200 µl PBS gewaschen, danach 170 µl des Standards bzw. der Proben aufgetragen und nochmal mit 200 µl PBS gespült. Nach Abbau der Apparatur wurde die Membran mit Amidoschwarz gefärbt.

3.15.5 Immunodetektion

Nachdem durch einen Western-Blot oder Spot-Blot die Proteine auf der Membran fixiert wurden, ließen diese sich mittels Antikörperreaktion immunologisch nachweisen.

Die Membran wurde als erster Schritt mit 1% -iger BSA/TBS-T-Lösung für 60 min blockiert, um die restlichen Proteinbindungsstellen der Membran abzudecken, und anschließend mit TBS-T gespült. Danach wurde die Membran mit dem primären Antikörper (siehe Tabelle 12) ebenfalls 60 min lang inkubiert (bei Raumtemperatur auf einem Schüttler). Nach dreimaligem Waschvorgang für 5 min mit TBS-T wurde der passende sekundäre Antikörper (siehe Tabelle 12) für eine Stunde auf die Membran gebracht. Ein weiterer Waschvorgang mit TBS-T (3x 5min) folgte.

Zur Detektion der Antikörperreaktion wurde anschließend eine Detektionslösung für 2 min bei Dunkelheit aufgetragen und mit Hilfe des Image-Reader LAS-3000 fotografiert. Die Chemilumineszenzsignale wurden mit der Software AIDA Image Analyzer v.3.51 ausgewertet.

Diese Ergebnisse der Western-Blots wurden immer auf das housekeeping-Gen GAPDH bezogen. Somit konnten die Ergebnisse miteinander verglichen werden.

Tabelle 12: ELISA, Paarung der primären und sekundären Antikörper mit Auflistung der Verdünnung und Lagerung

| Primärer Antikörper gegen | Verdünnung | Lagerung | sekundärer Antikörper | Verdünnung | Lagerung |
|---------------------------|------------|----------|-----------------------|------------|----------|
| GAPDH | 1:4.000 | -4° C | Anti-rabbit | 1:10.000 | -20° C |
| pERK | 1:1.000 | -20° C | Anti-rabbit | 1:10.000 | -20° C |
| CML | 1:2.000 | -20° C | Anti-mouse | 1:20.000 | -20° C |
| Arg-Pyrimidine | 1:2.000 | -20° C | Anti-rabbit | 1:10.000 | -20° C |
| Imidazolone | 1:500 | -20° C | Anti-mouse | 1:10.000 | -20° C |
| Pentosidin | 1:500 | -20° C | Anti-mouse | 1:10.000 | -20° C |

3.16 RNA-Analytik

3.16.1 RNA-Isolation aus Zellen

Zur RNA-Isolierung wurde das RNeasy Mini Kit-Set von der Firma Quiagen genutzt.

Es wurden 2×10^5 Zellen in 2 ml Standardmedium in einer 12er-Wellplatte ausgesät. Nach zwei Tagen Kultivierungsdauer wurden adhärenente Zellen in Lösung gebracht, nun alle Zelllinien für 5 min bei 95 g zentrifugiert und 1,5 ml von dem fertigen Lysepuffer (1 ml Lysepuffer RLT + 10 µl β-Mercaptoethanol) zu dem Zellpellet pipettiert. Der RLT Lysepuffer enthält Guanidiniumthiocyanat, welches Proteine denaturiert und somit RNasen inaktiviert. 400 µl dieses Lysates wurden mit 400 µl Ethanol gemischt. Durch die Zugabe von Ethanol wurden selektive Bindungen der RNA an die Membran erreicht. Die gesamten 800 µl einer Probe wurden auf eine Säule gegeben, die die gesamte RNA spezifisch bindet, für 5 min stehen gelassen und anschließend für 1 min bei 7697 g zentrifugiert. Als Waschvorgang wurden 400 µl des RW1-Puffers auf die Säulen pipettiert und wieder für 1 min bei 7697 g zentrifugiert. Um reine RNA zu bekommen wurde das RNase-freie

DNase Set von der Firma Quiagen vorbereitet (pro Probe: 70 µl RDD Puffer + 10 µl DNase). Diese wurde auf die Membran pipettiert und für 15 min im Hitzeblock bei 30° C inkubiert. Zunächst wurde ein zweites Mal, wie oben beschrieben, mit dem RW1-Puffer gewaschen. Durch diesen Waschvorgang wurde die gesamte DNase wieder entfernt. Danach folgten zwei Waschgänge mit 500 µl RPE-Puffer. Abschließend wurde die Probe nochmal zentrifugiert (1 min, 7697 g), um alle möglichen Reste des RPE-Puffers zu entfernen. Bis zu diesem Moment befand sich die RNA in der Säule. Um sie nutzen zu können, wurde 40 µl RNase-freies Wasser auf die Säule pipettiert und kurz gewartet, bevor nochmals zentrifugiert wurde. Die entstandenen Proben wurden auf 1%-iges TEA-Agarose-Gel mit Ethidiumbromid aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. (siehe Abschnitt 3.15.2) Bei intakter RNA entstehen zwei getrennte Banden, die 18S- und 25S-Bande ribosomaler RNA. Die Konzentration der RNA in den Proben wurde durch das Spektrometer ermittelt. Dann wurde die RNA mit RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von ca. 40 ng/ml verdünnt.

3.16.2 Bestimmung RNA-Konzentration und Reinheit

RNA hat sein absolutes Absorptionsmaximum bei 260 nm. Die Konzentration der Lösung wird durch das folgende Verhältnis berechnet: $OD_{260}=1$ entspricht 40 µg/ml RNA. Die jeweiligen Proben wurden auf eine Konzentration von 40 ng/ml mit RNase-freiem Wasser verdünnt und bei -80° C eingefroren.

Um die Reinheit der RNA-Lösung zu ermitteln, nutzt man das Verhältnis von OD_{260} zu OD_{280} . Ein Ergebnis von 2,0 spricht für eine reine RNA-Isolierung. Geringere Werte stehen für eine Kontamination von Proteinen oder von anderen Substanzen, die bei ca. 280 nm ihr Absorptionsmaximum besitzen. Als zweite Messung der Reinheit wurde das Verhältnis von OD_{260} zu OD_{230} genutzt, welches zwischen 2,0-2,2 zu erwarten ist. EDTA, Kohlenhydrate und Phenol haben ihre Absorption bei ca. 230 nm. Eine Kontamination mit diesen Stoffen zeigt sich in einer Abweichung des Verhältnisses nach unten.

Tabelle 13: Reinheit der RNA-Lösungen

| Zelllinie | HEK | Jurkat | RAW | MFB |
|---------------------|------|--------|------|------|
| OD_{260}/OD_{280} | 2,07 | 2,06 | 2,09 | 2,08 |
| OD_{260}/OD_{230} | 1,92 | 1,84 | 2,05 | 2,15 |

3.16.3 Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die isolierte RNA wurde mittels Reverse-Transkriptom in cDNA umgewandelt, um nachfolgend PCRs durchzuführen. Dieses Verfahren wurde genutzt, um die Rezeptorpräsenz der verschiedenen Zelllinien zu vergleichen.

Für die cDNA-Synthese wurden 20 µl der RNA-Probe (40 ng/ml) mit 20 µl des Mastermixes (RT) vermischt und 5 min bei 70° C denaturiert, um anschließend auf 10° C abgekühlt zu werden. Zu jeder Lösung wurden 10 µl EM hinzugefügt. Die Reaktion ist bei 42° C aktiv. Nach 50 min inaktiviert man die reverse Transkriptase bei 70° C. Man erhält 50 µl cDNA pro Probe.

Aus der entstandenen cDNA können nun mittels PCR verschiedene Sequenzen amplifiziert werden. Für die jeweiligen Gene wurden die spezifischen Primer (siehe Tabelle 3) eingesetzt. Jeder Ansatz beinhaltete: 10 µl PCR-Master-Mix, 1 µl Primer forward, 1 µl Primer rev., 6 µl Wasser, 2 µl der cDNA. In dem PCR-MM befanden sich mitunter thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerasen, die einen festgelegten Abschnitt replizieren. Nach Denaturierung (95° C, 2 min) wurden die Wasserstoffbrücken zwischen den beiden Strängen zerstört. Es folgt als zweiter Schritt die Primerhybridisierung (Annealing) mit der primerspezifischen Annealing-Temperatur für 30 s bzw. eine Minute bei DNA-Abschnitten über 500 Basenpaaren und als dritter Schritt die Elongation (72°C, 40 s), bei der die Polymerase die Synthese des fehlenden Stranges durchführt. Die PCR endet mit einer 2 minütigen Elongationsphase mit abschließender Abkühlung auf 4° C. Die amplifizierten Abschnitte wurden mittels Gelelektrophorese (1%-iges Agarosegel mit Ethidiumbromid) sichtbar gemacht.

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von DNA oder RNA wurden Mini/Midi-Gel-Elektrophorese-Systeme verwendet. Agarose wurde durch Erhitzen in TAE-Puffer gelöst und nach Abkühlung mit 0,002% Ethidiumbromid versetzt. Diese Lösung wurde in die vorbereitete Apparatur mit Kämme geschüttet. Nach Aushärten des Gels wurde es in die Elektrophoresekammer gelegt, welche mit TAE-Puffer gefüllt war. Die Proben wurden mit 4-fach Puffer orange im Verhältnis 3:1 vermischt und in die Taschen gefüllt. Nach Anlegen der elektrischen Spannung von 80 V für ca. 45 min liefen die DNA- und RNA-Banden aufgrund ihrer negativen Ladungen zur Anode. Als Größenvergleich lief stets ein 1 kbp-Marker mit. Mittels Image-Reader LAS-3000 wurden die Gele visualisiert und Signale mit der Software AIDA Image Analyzer v.3.51 ausgewertet.

3.17 statistische Auswertung

Grundsätzlich wurden alle erhobenen Daten mit zwei verschiedenen Varianten berechnet. Die Rohdaten wurden jeweils zu der unstimulierten Probe ins Verhältnis gesetzt. Als zweite Variante wurden dann die Daten noch zusätzlich als dekadischer Logarithmus genutzt.

Die Daten wurden mit Hilfe der Programme Microsoft Excel 2010 und IBM SPSS Statistics 20 erfasst und ausgewertet. Zur Auswertung der statistischen Signifikanz wurde zuerst mit dem Test Tamhane-T2 gearbeitet, welcher ein konservativer Test ist und die meisten Ergebnisse im Vergleich zum t-Test unterschätzte. Aus diesem Grund wurde der t-Test bei unabhängigen Stichproben zur endgültigen Signifikanzauswertung genutzt. Des Weiteren wurden zur Ermittlung der Korrelation zwei verschiedene Tests angewandt. Wenn die Daten normalverteilt und intervallskaliert waren,

dann konnte die Korrelation nach Pearson genutzt werden. Wenn mindestens eine Variable nicht normalverteilt oder ordinalskaliert war, wurde Kendall-Tau-b verwendet. Statistisch signifikante Werte mit $p < 0,05$ wurde mit *, $p < 0,01$ mit ** gekennzeichnet.

Die Boxplots enthalten jeweils den Median und zusätzlich die 25%- und 75%-Perzentile. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert der jeweiligen Daten mit SEM.

4 Ergebnisse

4.1 Proteinbestimmung der Fraktionen

Zu Beginn dieser Forschungsarbeit wurden 15 verschiedenen Fraktionen aus dem BCE hergestellt. Es sollte nur mit den drei vielversprechendsten Fraktionen weitergearbeitet werden. Die Proteinbestimmung über die Absorptionseinheiten bei $\lambda=280$ nm ergab die in Abbildung 5 dargestellte Verteilung mit der Darstellung der Fraktionen mit den höchsten Konzentrationen an Proteinen. Da AGEs durch eine Glykierung u.a. von Aminosäuren entstehen, könnte die Fraktion mit der höchsten Proteinkonzentration auch die Fraktion mit dem größten AGE-Gehalt sein. Diese erste Methode ließ jedoch keine Rückschlüsse auf den AGE-Gehalt zu.

Die Fraktion sechs zeigte durch die Messung der Absorption die höchste Proteinkonzentration an. Jedoch konnte dies mit der zweiten Methode nicht belegt werden. Die Fraktionen zehn und zwölf haben mit die höchsten Proteinkonzentrationen erzielt.

Die zweite Methode mittels Micro BCA™-Kit zeigt ein anderes Bild der Proteinkonzentration der Fraktionen, insbesondere der Fraktionen 1 und 4-6. Man kann auf den ersten Blick keine Erklärung für diesen Unterschied finden. Da man sich im weiteren Verlauf für Fraktionen der späten HPLC-Phase entschieden hat, beschäftigt sich diese Arbeit nicht weiter mit diesem Problem.

Da die Höhe der Proteinkonzentration nicht mit der Höhe der AGE-Konzentration gleichzusetzen ist, wurden diese Ergebnisse nicht so stark in die Wahl der Fraktionen einbezogen.

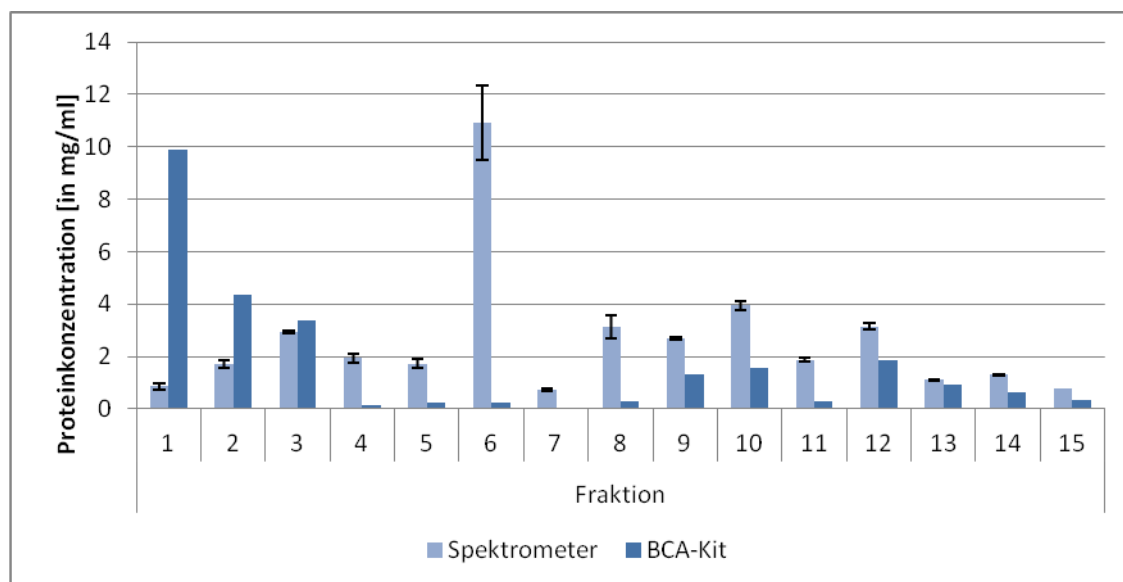


Abbildung 5: Proteinbestimmung der Fraktionen 1-15 zur Darstellung der Proteinkonzentration in mg/ml mittels Nanodrop (Absorptionseinheiten bei $\lambda=280$ nm) und Micro BCA-Kit (Standardreihe)

4.2 Fluoreszenzbestimmung der Fraktionen

Die Absorption bei 360 nm und Fluoreszenz bei 440 nm steht für AGE-Modifikationen und lässt Rückschlüsse auf den AGE-Gehalt der Fraktionen zu (Abb. 6). Ebenso wie die Proteinbestimmung wurde dieser Versuch genutzt, um die besten Fraktionen zu ermitteln, mit denen weitergearbeitet werden sollte.

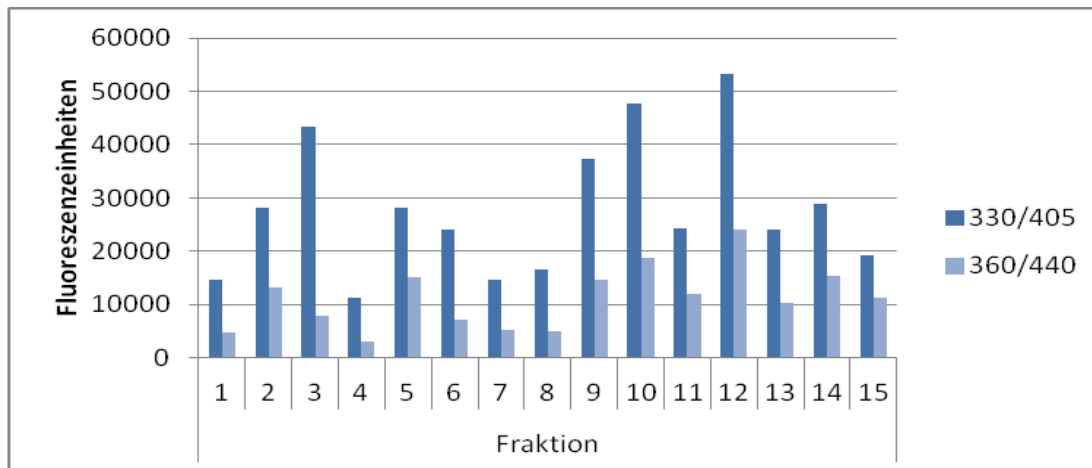


Abbildung 6: Fluoreszenzbestimmung der Fraktionen 1-15

4.3 Wahl der Fraktionen

Das Chromatogramm (360 nm/440 nm) legt nahe, dass die Fraktionen der späteren HPLC-Phase AGE-reicher sind als die früheren. Dies könnte an der Gewinnung der Proben mittels HPLC, genauer an dem ACN-Gradienten, liegen. Die letzten Proben sind lipophiler als die vorderen.

In Zusammenschau der ersten Ergebnisse schienen die Fraktionen zehn, zwölf und dreizehn die vielversprechendsten zu sein. Der ausschlaggebenden Punkt waren die ersten Versuche mit der RAW-Zelllinie. (Abb. 7) Bei diesen war nach Stimulation mit den Fraktionen zehn, zwölf und dreizehn die höchste NF- κ B-Aktivität nachweisbar. Außerdem gehörten diese Fraktionen zu denen mit der größten Proteinkonzentration, den höchsten Fluoreszenzeinheiten bei 360 nm/ 440 nm und wiesen im Spot-Blot verschiedene AGEs (wie Pentosidin, Imidazolone) auf, sodass für die Zellversuche nur noch diese drei Fraktionen genutzt wurden.

Die Fraktionen elf, vierzehn und fünfzehn wären ebenso gut geeignet gewesen.

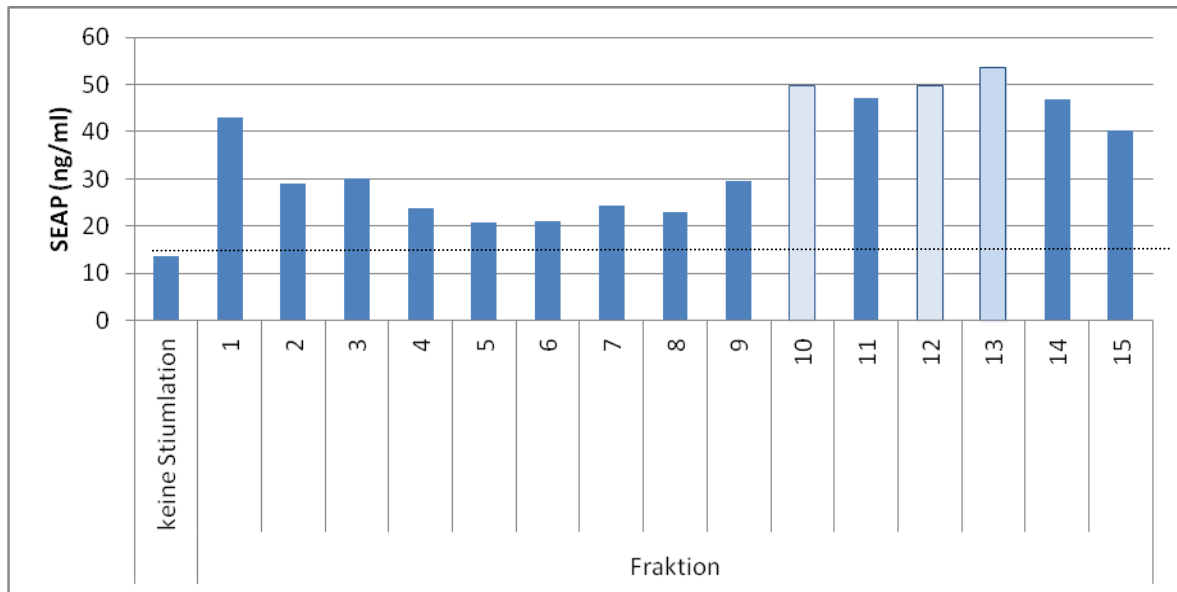


Abbildung 7: Stimulation RAW-Zelllinie mit 5% der jeweiligen Fraktion, Inkubation 24 h

4.4 Spot-Blot Analysen der Fraktionen

Der Nachweis der bekannten AGEs Arg-Pyrimidin, Imidazolone, CML und Pentosidin diente der Bestätigung der Wahl der Fraktionen. Falls keines der AGEs in den bestimmten Fraktionen gefunden worden wäre, hätte sich die Wahl noch revidieren lassen. Mit dem Ergebnis dieser Versuchsreihe (Abb. 8), konnten die Zellversuche begonnen werden.

Arg-Pyrimidin konnte in keiner der drei Fraktionen nachgewiesen werden. Imidazolone wurde in Fraktion zwölf und dreizehn gefunden und sowohl Pentosidin als auch CML befindet sich in jeder der drei Fraktionen, wobei Pentosidin in Fraktion zehn am geringsten vorhanden ist.

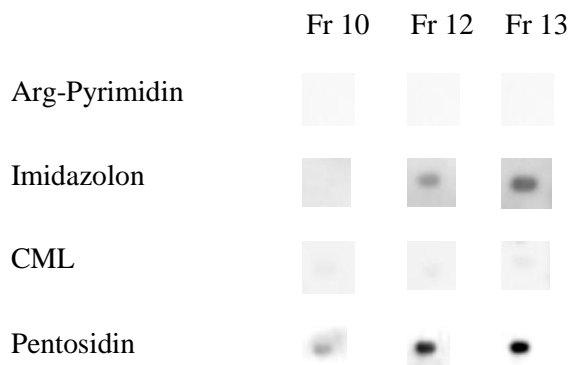


Abbildung 8: Spot-Blot-Analyse. Darstellung der AGEs Arg-Pyrimidin, Imidazolone, CML, Pentosidin in den Fraktionen 10, 12 und 13

4.5 NF- κ B/293/ GFP-Luciferase

4.5.1 Fluoreszenzmikroskop

Bei der Generierung der Zelllinie isolierte der Hersteller nur Zellen, die auf eine Stimulation mit 10 ng/ml TNF- α mit einer GFP-Produktion reagierten. Somit gilt ab dieser Konzentration TNF- α als

positive Kontrolle. Da dieses Stimulans in 0,1-prozentigem BSA gelöst wurde, gilt dies als negative Kontrolle.

Zur ersten Überprüfung, ob der Versuch funktioniert hat, konnten die Zellpopulation mittels Fluoreszenzmikroskop angeschaut werden, wobei in diesem Fall nur die positive Kontrolle ausschlaggebend war. Außerdem konnte man einen Trend sehen, ob in den Zellen der NF- κ B-Weg aktiviert wurde. Da diese Methode keine statistischen Werte ermittelt, sondern nur eine Momentaufnahme ist, wurde in dieser Arbeit dafür primär auf andere Methoden zurückgegriffen.

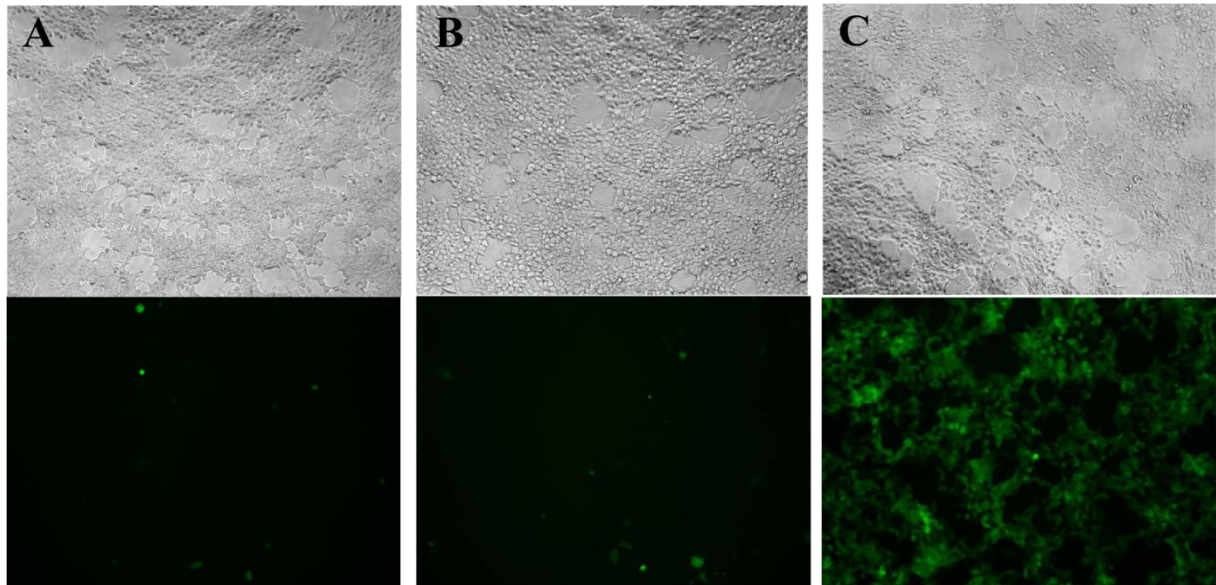


Abbildung 9: Fluoreszenzmikroskopie, HEK-Zelllinie, oben natives Bild, unten Expressierung von GFP unter Anregung bei 475 nm, (A) unstimuliert, (B) negativ Kontrolle: BSA, (C) positiv Kontrolle: 100 ng/ml TNF- α

4.5.2 FACS

Die HEK-Zellen wurden in den Vorversuchen größtenteils beim Ablösen mit Trypsin von der Well-Platte geschädigt, sodass im FACS zumeist nur lebende Zellpopulation von deutlich unter 65%, z.T. nur 4%, gemessen wurden. Aus diesen niedrigen Werten konnte man nicht auf die gesamte Population schlussfolgern. Auf der Fehlersuche beschäftigte sich diese Arbeit mit verschiedenen Ablöseverfahren (chemisch durch Trypsin, mechanisch durch Pipettieren oder Nutzen eines Kratzers). In diesem Versuch zeigten sich alle drei Varianten mit einer erstaunlich guten Überlebensrate der Zellen. Die höchste Rate wies die Methode mit Trypsin auf (durchschnittlich 78,11%). Danach folgte die Methode mit der Nutzung eines Spatels, der die Zellen von der Well-Platte löste (ϕ 63,31). Die geringste Überlebensrate zeigte die Pipettier-Methode (ϕ 59,48). Jedoch erklärt es nicht die hohe Sterberate in anderen Versuchen. Es erwies sich als schwierig, die lebende Population im Data-Blot (SSC-FSC) auffindig zu machen. Nach mehreren Erklärungsversuchen wurde schließlich die Methode geändert. Im Folgenden nutze man die Möglichkeit der Darstellung der Fluoreszenz des GFPs in lysierten Zellen.

4.5.3 GFP-Fluoreszenzbestimmung

Der TNF- α aktiviert auch bei dieser Methode die HEK-Zelllinie am stärksten und gilt deshalb als positive Kontrolle. Jede Konzentration (1, 3, 10, 33 und 100 ng/ml) zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontroll-Stimulation mit BSA, welches das Lösungsmittel für TNF- α darstellt, wobei gleichzeitig eine lineare Abhängigkeit zwischen der steigenden Konzentration und Stimulierung des NF κ B-Weges ersichtlich wird.

LPS wurde auch bei der HEK-Zelllinie getestet. Allerdings zeigt sich keine signifikante Erhöhung zu den unstimulierten Zellen.

Des Weiteren wird bei der Stimulation mit Brotkrustenextrakt eine statistische Signifikanz aufgezeigt. Die Konzentration von 5 mg/ml weist eine Signifikanz von $p=0,042$ auf, 10 mg/ml entsprechen $p=0,003$ und 20 mg/ml zeigt ein $p<0,001$ auf. Auch hier sieht man eine lineare Abhängigkeit zwischen der Konzentration BCE und der Stimulierung des NF κ B-Weges (Kendall-Tau-b: Korrelationskoeffizient von 0,588, $p<0,001$).

Die Fraktionen 12 und 13 stimulieren ebenfalls die HEK-Zelllinie. Die Ergebnisse der Stimulation mit der Fraktion zehn sind nicht eindeutig, da diese zu stark streuen.

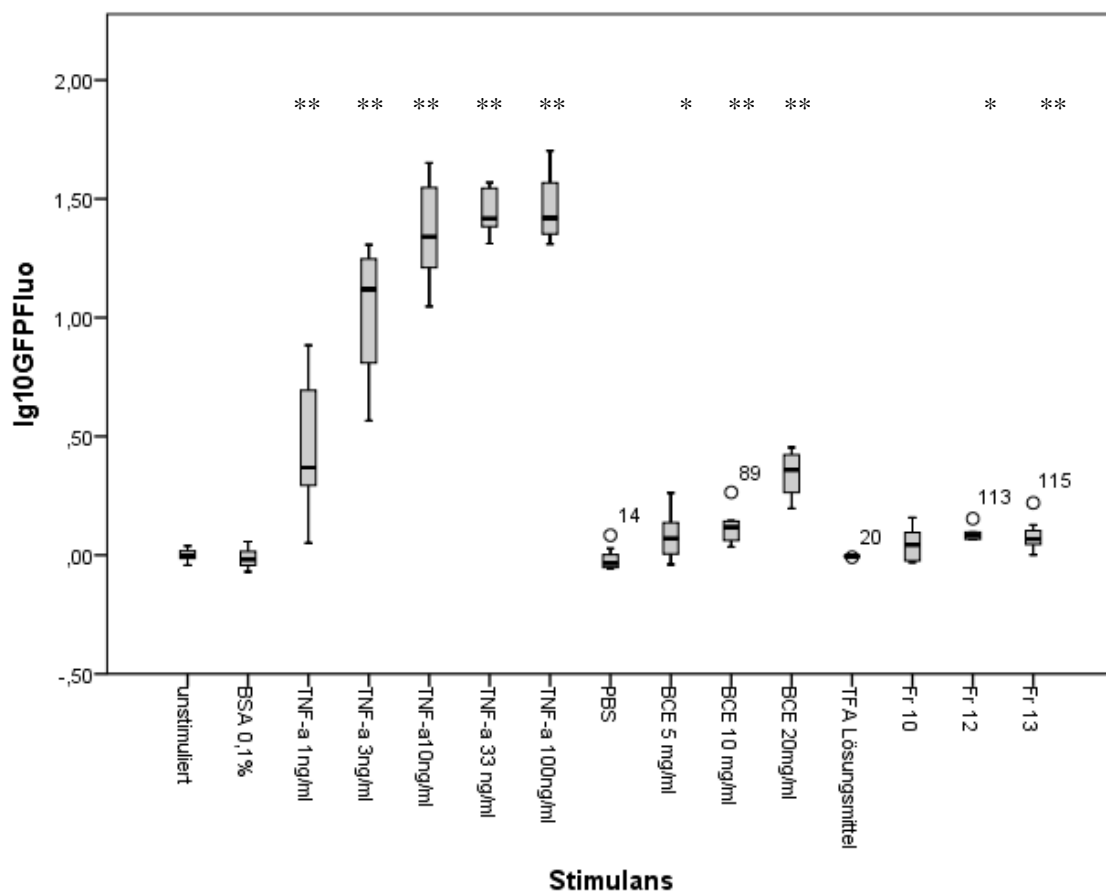


Abbildung 10: HEK-Zelllinie, FACS Boxplot: Ig10 (GFP-Fluo) in Abhängigkeit von den Stimulanzen mit * $p<0,05$ oder ** $p<0,01$

4.5.4 Western-Blot

Bei der Analyse der phosphorylierten Form der p42/44 MAP-Kinase ließ sich ein Trend erkennen, dass mit einer höheren Konzentration von TNF- α , LPS und BCE die p42/44 MAPK –Aktivität steigt und die Fraktionen ebenfalls zu einer Aktivierung der phosphorylierten Form der p42/44 MAP-Kinase führt. Jedoch streuen die Daten so stark, sodass man bei keinem Stimulans eine statistisch signifikante Erhöhung der Nf- κ B-Aktivität im Vergleich zu den Lösungsmitteln erkennen kann. Aus demselben Grund konnte man keine Korrelation zwischen der Menge an phosphorylierter p44/42MAPK und der Konzentration von TNF- α , LPS bzw. BCE erkennen.

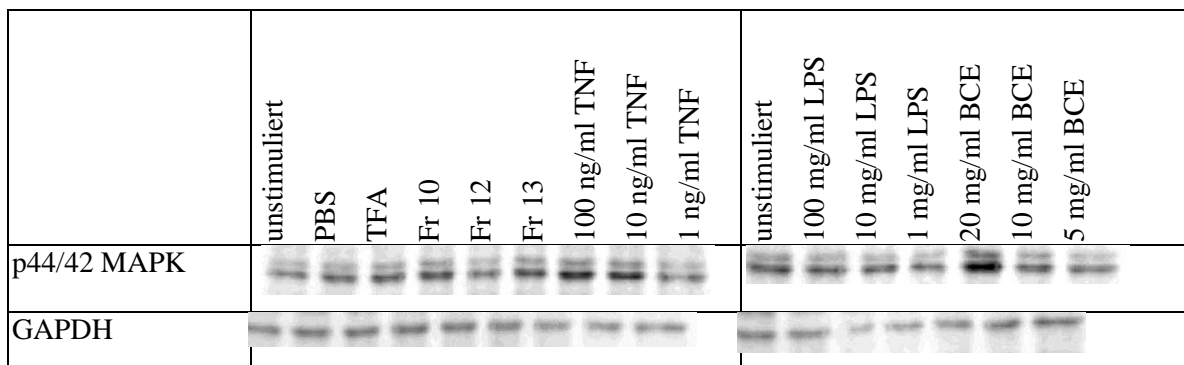


Abbildung 11: HEK-Zellen, Western-Blot Analyse der Expression der p44/42 MAPK- und GAPDH-Proteine bei Stimulation mit den Fraktionen 10, 12 und 13 (je 5%), TNF- α , LPS und BCE

4.6. NF- κ B/Jurkat/GFP

4.6.1 FACS

Die Jurkat-Zelllinie wurde wie die HEK-Zelllinie von einem Hersteller übernommen, der ein NF- κ B-Promoter-GFP-Konstrukt in die Zellen eingebracht hat und dann nur Zellen isolierte, die auf eine TNF- α -Stimulation (10 ng/ml über 24 Stunden) mit einer GFP-Expression antworteten. Somit wurde für diese Arbeit TNF- α als Positivkontrolle verifiziert. Der Versuchsaufbau wurde vom Hersteller vorgegeben.

In jeder angewandten Konzentration (1, 3, 5, 10, 100, 1000 ng/ml) antwortete diese Zelllinie mit einer Erhöhung der NF- κ B-Aktivität ($p < 0,01$). An dieser Versuchsreihe kann man die Annäherung an die logarithmische Dosis-Wirkungs-Kurve erkennen (Abb. 12). TNF- α hat diese Wirkung über Rezeptoren, die den NF- κ B-Weg anschalten.

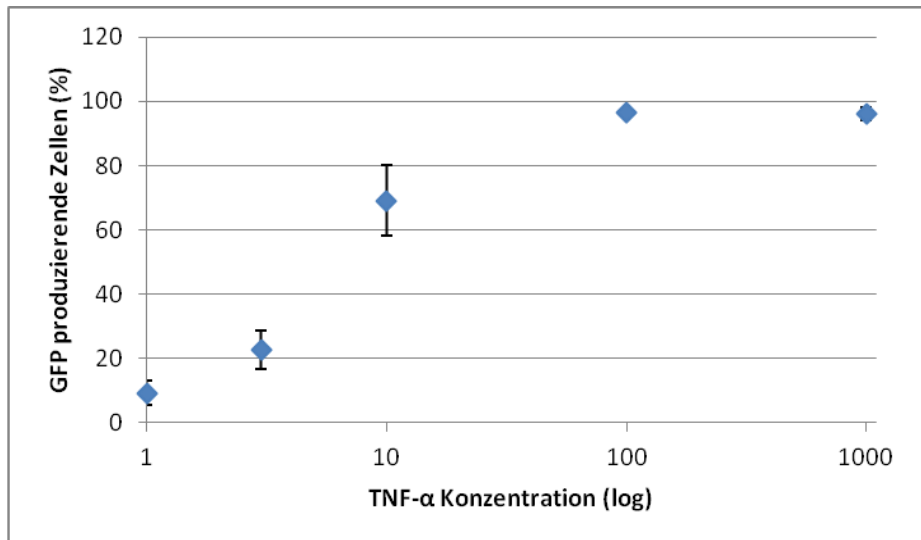


Abbildung 12: Jurkat- Zelllinie, GFP-produzierende Zellen in Prozent in Abhängigkeit der stimulierenden TNF- α -Konzentration in logarithmischer Form

Ähnlich wie bei den HEK-Zellen wurde am Anfang dieser Arbeit nach weiteren Stimulatoren des NF- κ B-Weges gesucht. Wasserstoffperoxid wurde mit 10 μ M, 100 μ M und 1 mM getestet. Jede dieser Konzentrationen war toxisch für die Zellpopulation.

Des Weiteren wurde ein Toxizitätsversuch mit BCE durchgeführt. Konzentrationen bis 10 mg/l wirkten nicht toxisch, ab 50 mg/ml starben alle Zellen ab.

Die Jurkat-Zellen, welche mit BCE stimuliert wurden, exprimierten kaum mehr GFP als die Negativ-Kontrolle, welche in diesem Fall PBS (Lösungsmittel) war. Somit hat das Brotkrustenextrakt keine Wirkung auf die NF- κ B-Aktivität in dieser Zelllinie. Entgegengesetzt zur Vermutung zeigte sich sogar bei der Stimulation mit 10 mg/ml BCE eine signifikant niedrigere GFP-Produktion im Vergleich zu PBS. Dies spricht für eine Inhibition von NF- κ B.

Diese Zelllinie wurde zu einem weiteren Versuch verwendet. Es wurde eine Versuchsreihe entworfen, um den Unterschied zwischen der Stimulation mit 5 μ l und 20 μ l der Fraktionen auf 95 μ l bzw. 80 μ l (entspricht im weiteren 5% und 20%) Zellsuspension herauszufinden. Zu allererst wurde geschaut, ob die Konzentration eine toxische Schwelle für die Jurkat-Zellen überschreitet. Bei einer Konzentration von 20% starben diese nicht ab. Im zweiten Schritt wurden die Zellen mit 5% und mit 20% der drei Fraktionen stimuliert. Das Ergebnis war, dass die Zellen einen höheren Median der Expression von GFP aufwiesen, jedoch ebenso eine stärkere Streuung der Daten und nachfolgend keine Signifikanz zeigten, sodass die weiteren Versuche mit einer Konzentration von 5% der Fraktion durchgeführt wurden.

Bei der Stimulation mit den Fraktionen ergab sich ein diffizileres Bild. Die Fraktionen zehn und zwölf (je mit 5%) stimulierten signifikant ($p=0,02$ bzw. $p=0,012$) die Expression des GFP. Wohingegen die Fraktion dreizehn die humanen T-Lymphozytenzellen zwar stimuliert und zu einer

Erhöhung der Expression führte, jedoch mit einem Signifikanzwert von 0,062 und damit über dem festgelegten p-Wert lag.

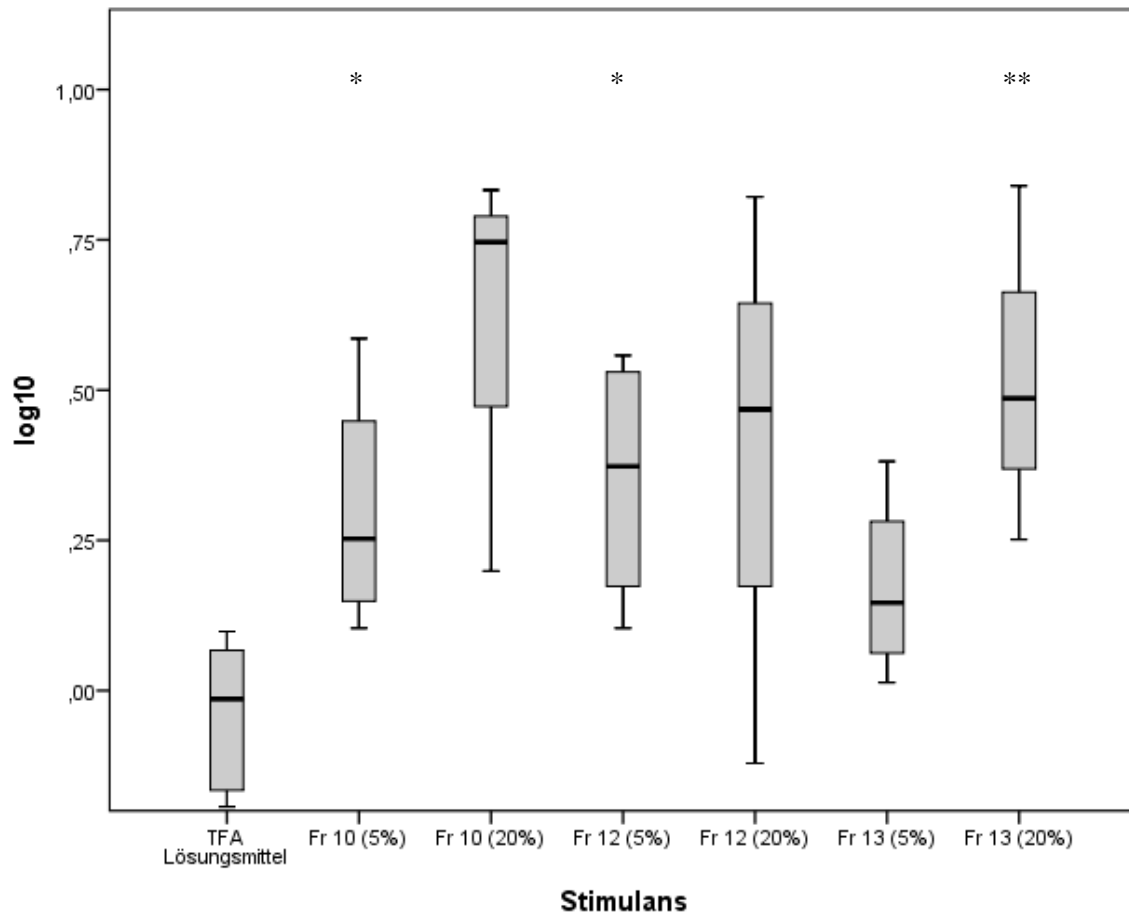


Abbildung 13: Jurkat-Zelllinie, Boxplot: lg (GFP-Expression) bei Stimulation mit Fraktionen 10, 12 und 13 mit je 5% oder 20%, * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$

4.6.2 Western Blot

Bei der Analyse der Expression von pERK in den nicht adhärenen Jurkat-Zellen zeigten die unstimulierten Zellen mit die höchste Aktivität. Kein Stimulans wies eine signifikant positive Reaktion auf.

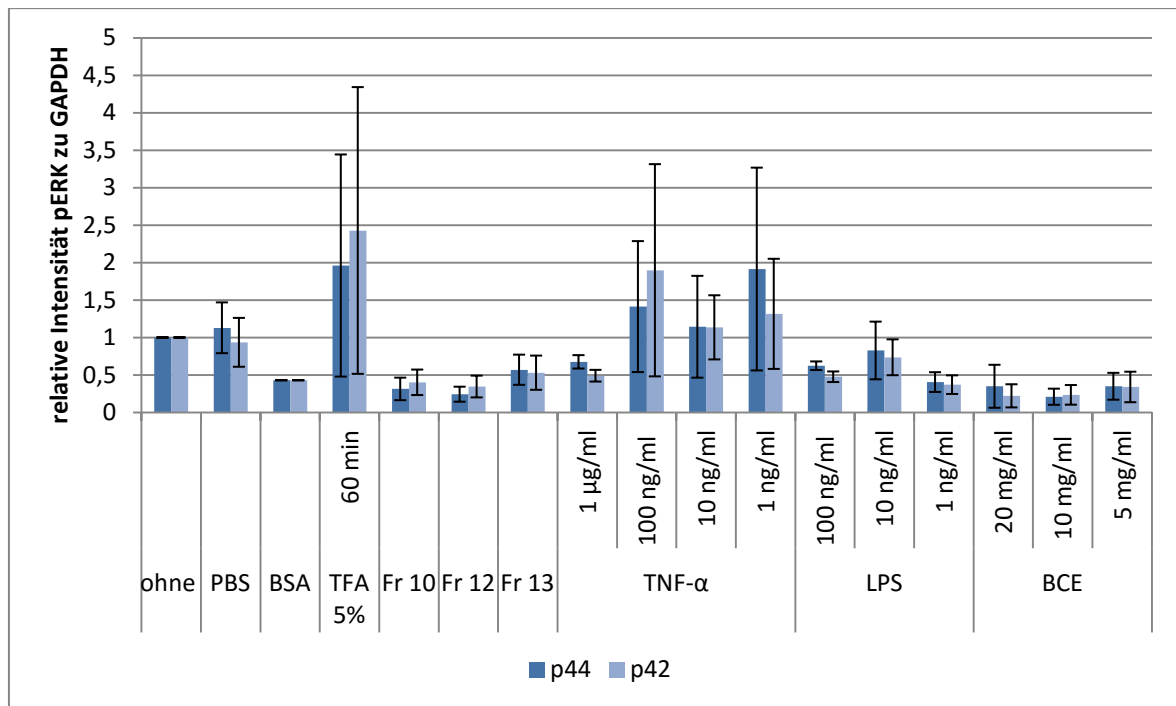


Abbildung 14: Jurkat-Zelllinie, Western-Blot-Analyse: Stimulation mit den Fraktionen 10, 12 und 13, TNF, LPS und BCE

4.7 NF-κB/SEAPorter TM RAW Cell Line

4.7.1 SEAP-Assay

Für die RAW-Zelllinie wurde LPS von dem Hersteller als Positivkontrolle benannt. In deren Versuchen wurden die Zellen mit einer Konzentration von 1 ng/ml bis 500 ng/ml signifikant stimuliert. Diese Arbeit bestätigt dies, da sowohl 100 ng/ml ($p=0,001$), als auch 10 ng/ml ($p=0,002$) und 1 ng/ml LPS ($P=0,006$) nach 24 Stunden den NF-κB-Signalweg der Zellen signifikant stimuliert.

Zur weiteren Etablierung der Methode wurden Versuchsreihen zur Zeitkinetik gestaltet. Das Assay wurde 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Stimulation durchgeführt, wobei bei vorzeitiger Abnahme (6 und 12 Stunden) kaum ein Unterschied zwischen unstimulierten und mit 1 bzw. 10 ng/ml LPS stimulierten Zellen zu finden ist. Dies liegt an der Zeitspanne, die die Transkription und Translation zur Proteinbiosynthese des SEAP benötigt. Ab einer Dauer von 24 Stunden sieht man eine signifikante Erhöhung der SEAP-Produktion bei Stimulierung der Zellen mit LPS. Allerdings aktiviert sich bei einer 48-stündigen Stimulation ebenfalls bei den unstimulierten Zellen der NF-κB-Signalweg und somit wird zusätzlich SEAP produziert, sodass der reine Effekt der Stimulation durch LPS durch den zusätzlichen Stress des Nahrungsmangels überlagert wird. Nach 72 Stunden gleicht sich die NF-κB-Aktivierung der unstimulierten Zellen derer an, die stimuliert wurden. Somit wird der Effekt fälschlicherweise zu niedrig dargestellt. Das Ergebnis aus dieser Versuchsreihe war, dass bei zukünftigen Versuchen SEAP nach 24 Stunden ermittelt wird.

Im Korrelationstest mittels Kendall-Tau-b erreichte der dekadische Logarithmus der Expression vom SEAP-Protein in Abhängigkeit zur LPS-Konzentration jedoch nur ein Signifikanzwert von 0,072 (lineare Abhängigkeit).

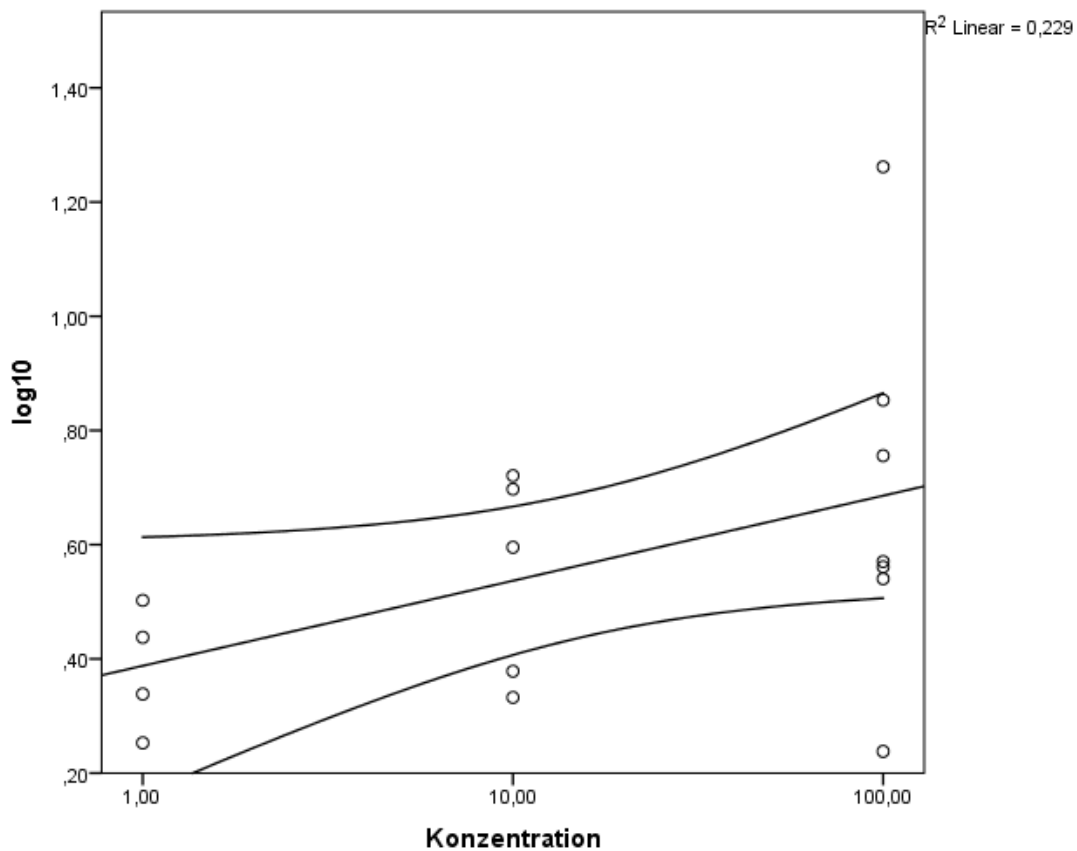


Abbildung 15: SEAP-Zelllinie, Analyse der Expression von SEAP Protein (log10) in Abhängigkeit zu logarithmischen Konzentration von LPS

Des Weiteren stimulierte BCE ebenso in jeder verwendeten Konzentration (5, 10 und 20 mg/ml) den NF- κ B-Signalweg signifikant ($p < 0,01$). Bei den Versuchen mit den Fraktionen zehn ($p = 0,092$) und zwölf ($p = 0,091$) sah man hingegen keine signifikante Erhöhung der Expression des SEAP Proteins in Bezug auf das Lösungsmittel mit TFA, nur die Fraktion dreizehn zeigt diese ($p = 0,012$).

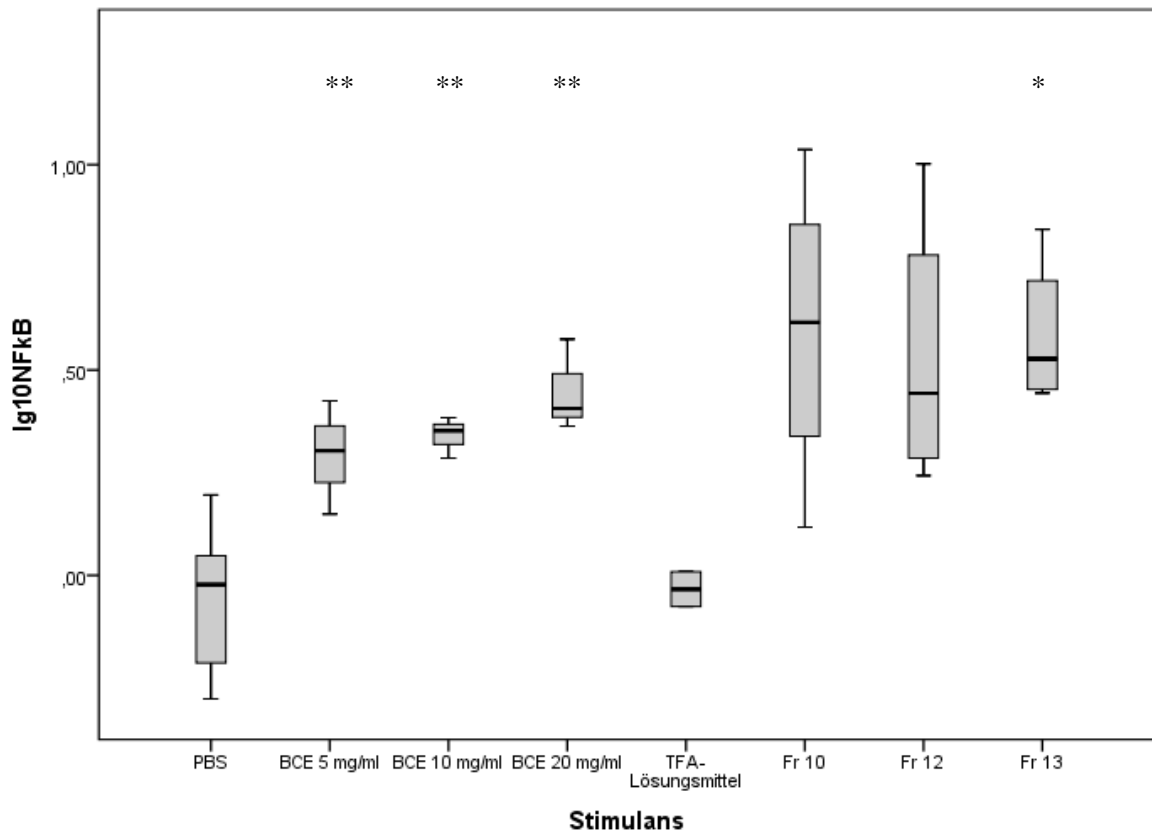


Abbildung 16: RAW-Zelllinie, relative Expression der SEAP bei Stimulation mit BCE (5, 10 und 20 mg/ml) und der Fraktionen 10, 12 und 13

4.7.2 Western-Blot

In der Western-Blot-Analyse lässt sich keine konkrete Stimulation nachweisen. Die Daten streuen zu stark, als dass man eine Tendenz sehen könnte. Die Erhöhung der Phosphorylierung bei TNF- α und LPS lässt sich vermuten, doch durch die Versuche nicht beweisen.

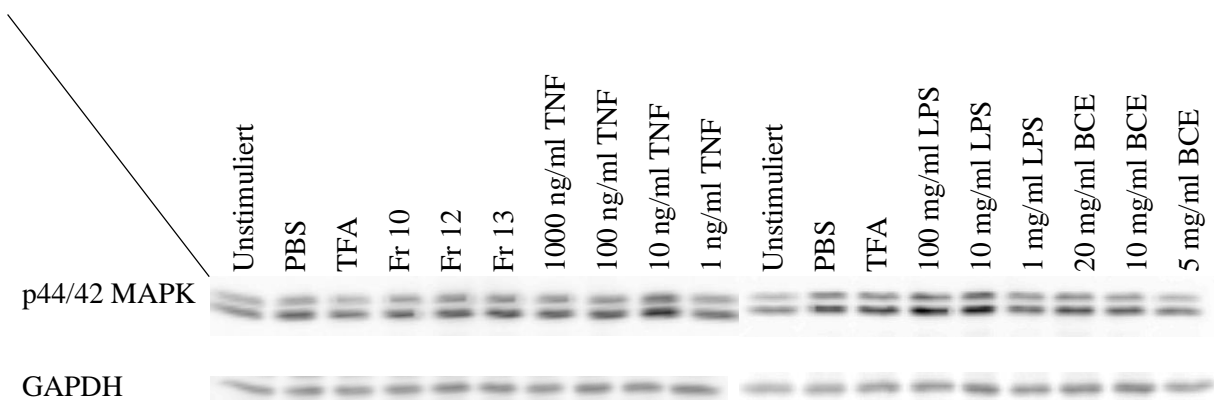


Abbildung 17: RAW-Zelllinie, Western-Blot-Analyse der pERK-Stimulation mit den Fraktionen 10, 12 und 13, TNF, LPS und BCE

4.8 MFB

4.8.1 Western-Blot

Durch die Versuche kann man eine pERK-Aktivität vermuten, doch nicht statistisch signifikant nachweisen. Es gibt trendmäßige Unterschiede zwischen der Reaktion der Zellen mit Stimulierung und jenen ohne.

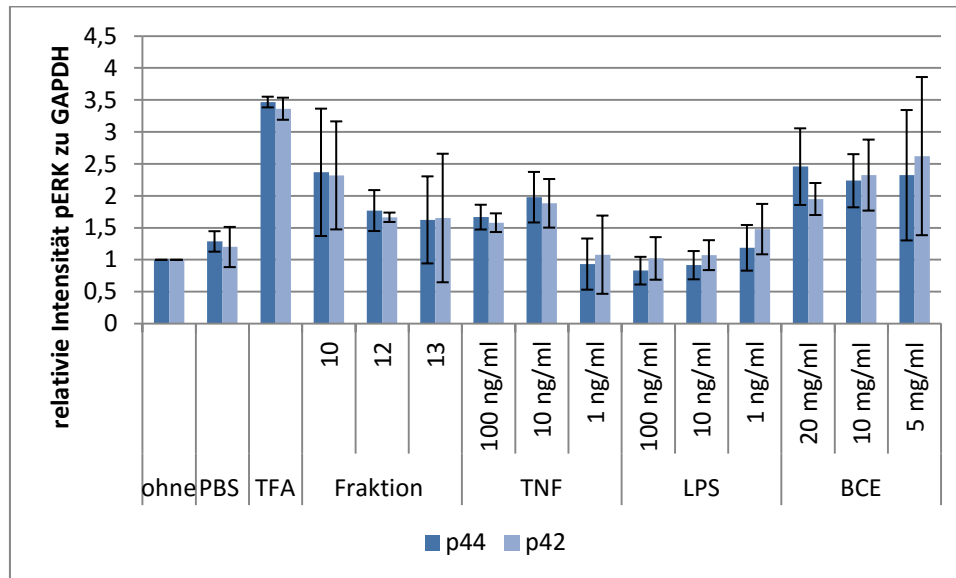


Abbildung 18: MFB, Western-Blot-Analyse der pERK-Expression bei Stimulation mit den Fraktionen 10, 12 und 13, TNF, LPS, BCE

4.9 RNA-Analytik der Rezeptoren

Nach der Verdünnung der RNA auf eine Konzentration von 40 ng/ml, wurde diese zur Herstellung von cDNA genutzt, welche wiederum der PCR dient. Die RNA wurde jeweils von unstimulierten Zellen aus der Zellkultur isoliert. Als Housekeeping-Protein wurde GAPDH genutzt, welches in allen vier Zelllinien in gleichen Maßen vorhanden ist. Die jeweiligen Daten der Rezeptoren wurden ins Verhältnis zu dem jeweiligen GAPDH gesetzt.

In jeder Zelllinie wurde RNA mit der Gensequenz für RAGE nachgewiesen, wobei RAW-Zellen mit Abstand am meisten dieser RNA besitzt. Die restlichen Zelllinien enthalten ungefähr gleich viel, wobei man die humanen (HEK, Jurkat) und Maus-Zelllinien (RAW und MFB) nur zu einem gewissen Maße vergleichen kann, da mit unterschiedlichen Primer gearbeitet wurde. Bei den weiteren AGE-Rezeptoren konnte mit identischen Primer gearbeitet werden. Ein AGE-R1-Bestand konnte ebenfalls in allen Zellen belegt werden. Die Zelllinien HEK und MFB weisen trotz hoher Mengen weniger RNA dieser Rezeptoren als Jurkat und RAW auf. RAW und MFB sind reich an RNA des AGE-R2; im Gegensatz zu HEK und Jurkat, bei denen dieser Rezeptor nur in kleinen Mengen nachweisbar ist. Der AGE-R3 findet sich nicht in den Jurkat-Zellen. Bei den anderen Zelllinien kann man eine Staffelung in der Konzentration von AGE-R3-RNA erkennen:

HEK<RAW<MFB. Als letzten Rezeptor wurde der Scavenger Rezeptor II untersucht, dessen RNA-Sequenz sich in Menschen- und Mäusezellen unterscheidet, und somit keine genaueren Vergleiche gezogen werden können. Die MFB-Zellen besitzen keine, die RAW relativ viel RNA dieses Rezeptors. Die humanen Zelllinien weisen gleich wenig RNA auf.

Tabelle 14:RNA der Rezeptoren RAGE, AGE-R1, AGE-R2, AGE-R3 und Scavenger Rezeptor II der Zelllinien HEK, Jurkat, RAW, MFB

| | HEK | Jurkat | MFB | RAW |
|----------------|-----|--------|-----|-----|
| GAPDH | | | | |
| RAGE | | | | |
| AGE-R1 | | | | |
| AGE-R2 | | | | |
| AGE-R3 | | | | |
| Scavenger R.II | | | | |

4.10 Protein-Analytik der Zelllinien zum Rezeptorbesatz

Da die RNA nicht den Rezeptorbesatz der Zelle darstellt, wurden in einem weiteren Schritt in unstimulierten Zellen der jeweiligen Zelllinie die Menge an Oberflächenproteine der Rezeptoren RAGE, AGE-R1 und AGE-R3 mit Hilfe des Western-Blots ermittelt (Abb. 19). Von den gemessenen Rezeptoren zeigt die HEK- und Jurkat-Zelllinie vor allem den AGE-R1 und AGE-R3. Die MFB weisen insbesondere AGE-R1 auf. Die RAW-Zelllinie besitzt alle drei Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche und hebt sich mit ihrem Rezeptorbesatz von RAGE deutlich von den anderen Zelllinien ab.

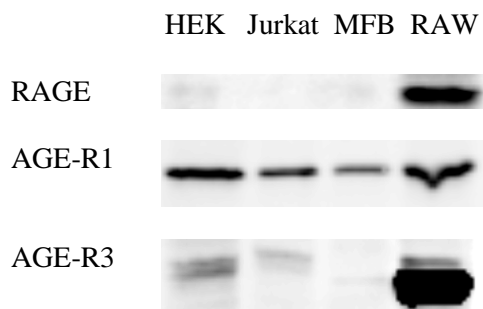


Abbildung 19: Proteinexpression der Rezeptoren RAGE, AGE-R1 und AGE-R3 detektiert mittels Western-Blot in den Zelllinien HEK, Jurkat, MFB und RAW

4.11 Analyse der Beziehung zwischen AGE-Gehalt und NF- κ B-Aktivität

Man findet keine Korrelation zwischen dem AGE-Gehalt der Fraktionen (gemessen anhand der Fluoreszenz) und der NF- κ B-Aktivität in den vier Zelllinien.

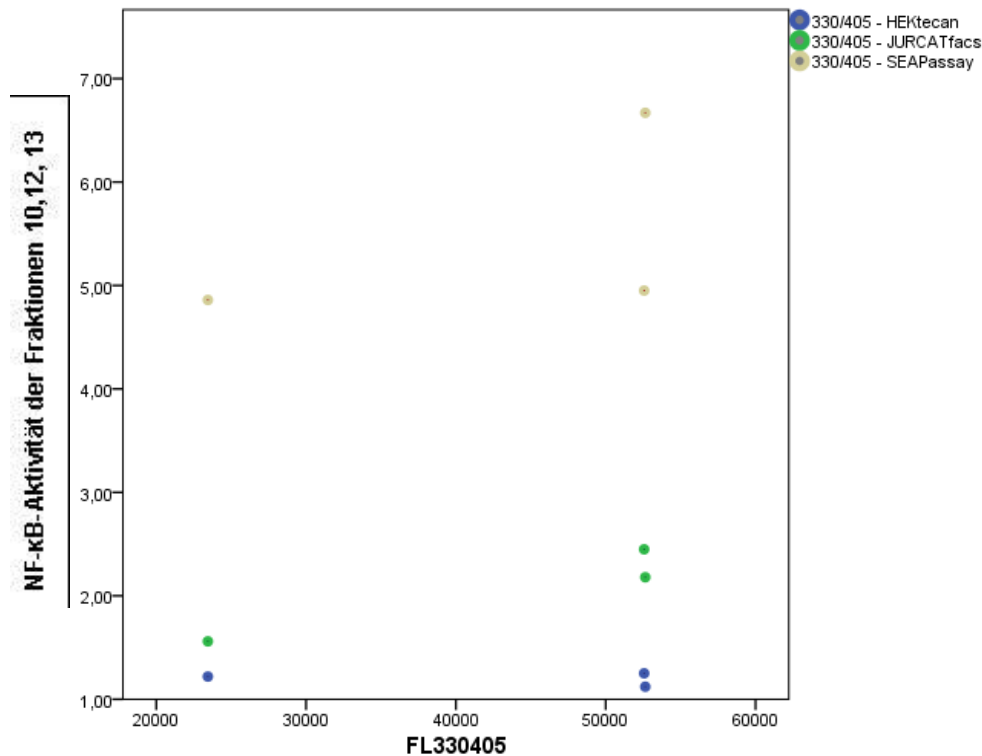


Abbildung 20: Analyse des AGE-Gehalts und der NF- κ B-Aktivität der Zelllinien HEK, Jurkat und RAW

4.12 Abhängigkeit zwischen NF- κ B-Aktivität vom Rezeptor-RNA-Gehalt

Es scheint eine Abhängigkeit zwischen der NF- κ B-Aktivität und dem Rezeptor-RNA-Gehalt, vor allem vom Rezeptor RAGE zu geben. (Abb. 21) Diese Vermutung kann jedoch mit dem durchgeführten Versuchsaufbau nicht gezeigt werden. Der RNA-Gehalt der Rezeptoren wurde bei unstimulierten Zellen gemessen. Die NF- κ B-Aktivität wurde jeweils bei Stimulation als Quotient zur Negativkontrolle ermittelt, sodass man die Datensätze nicht zusammenfügen kann, da der RNA-Gehalt vermutlich bei Stimulation geändert wird (entweder durch vermehrte Expression oder Suppression von RAGE).

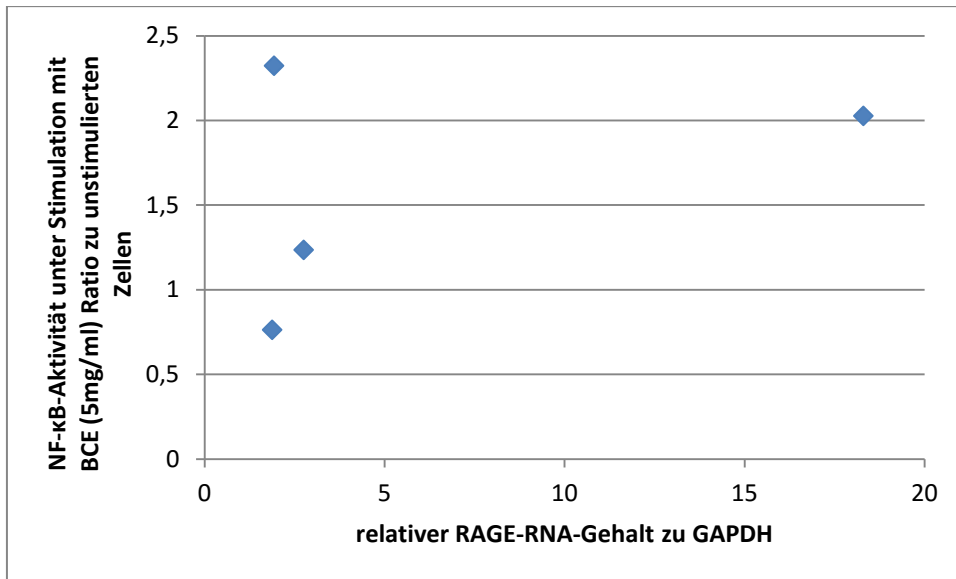


Abbildung 21: Abhängigkeit der NF-kB- Aktivität zum RAGE-RNA-Gehalt der verschiedene Zelllinien unter Stimulation von 5mg/ml BCE

5 Diskussion

5.1 Vergleich der Zelllinien

Die bisherigen Versuche zielten darauf ab, die NF- κ B-Aktivität nach Stimulation zu erfassen, die stellvertretend für die Aktivierung durch Brotkruste (als Brotkrustenextrakt oder Fraktion) gemessen wurde. Die Hypothese, die dahinter steht, ist, dass Brotkruste über AGE-Rezeptoren (RAGE, AGE-R1-3) den NF- κ B-Weg aktiviert. In der Literatur wird Brotkruste bereits als AGE-reiches Nahrungsmittel behandelt (Somoza et al. 2005b), sodass davon ausgegangen werden kann, dass insbesondere das BCE aber auch die verwendeten Fraktionen aus einer komplexen Zusammensetzung aus verschiedenen AGEs und sonstiger Substanzen bestehen. Somit ist es nicht außergewöhnlich, dass sich die Ergebnisse der Stimulierung des Gesamtextraktes und der Fraktionen teilweise stark unterscheiden.

Damit eventuell nur noch einzelne Verbindungen und deren Effekte getestet werden konnten, wurde das BCE mittel HPLC in 15 Fraktionen aufgeteilt. In einer anderen aktuellen Forschungsarbeit (von Sandy Pötzsch am Forschungslabor der Klinik für Herzchirurgie des Universitätsklinikum Halle (Saale)) wurde tiefgründiger in den verschiedenen Fraktionen nach speziellen Verbindungen gesucht. Die hier vorliegende Arbeit behandelt ausschließlich die Fraktionierung der BCE. In den meisten Publikationen wird der Effekt eines einzelnen AGEs untersucht, seltener AGE-BSA als ein Produkt mehrerer AGEs und noch seltener mit Lebensmittelextrakten (am bekanntesten Brotkruste oder Kaffeeextrakt). Somit würden mehrere Moleküle bzw. Produkte im Fokus der Untersuchung stehen. Es liegt auf der Hand, dass die Lebensmittelextrakte am ehesten der Realität entsprechen.

Abbildung 22 gibt einen Überblick über die Kerndaten der hier vorliegenden Arbeit.

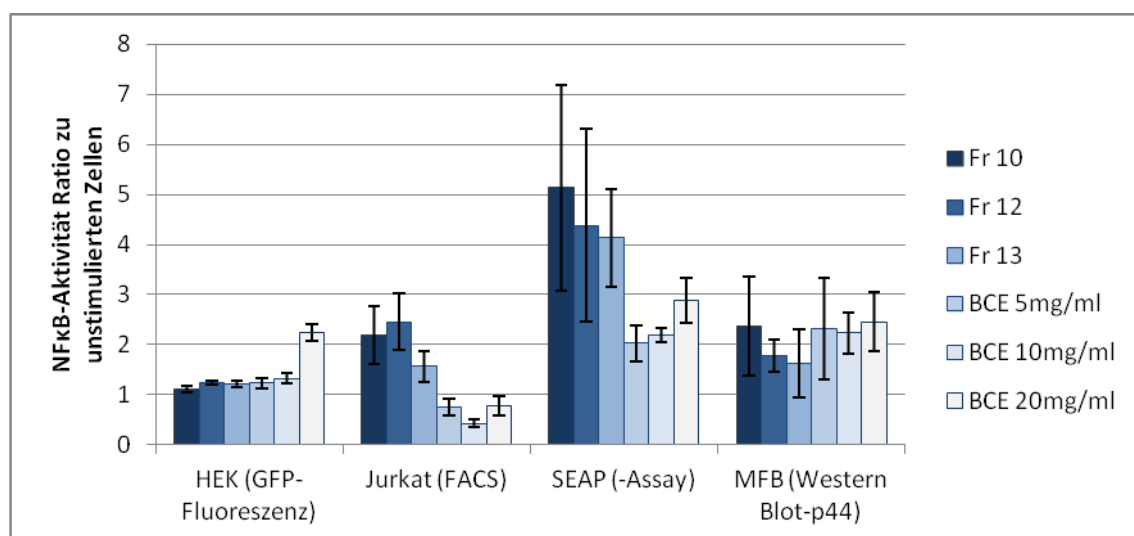


Abbildung 22: NF- κ B-Aktivität unter Stimulation mit den Fraktionen und BCE, Rezeptor-RNA Vergleich der Zelllinien

Die RAWZellen besitzen den höchsten Gehalt an RAGE. Man muss bedenken, dass die RNA-Analyse nicht den tatsächlichen Bestand der Rezeptoren auf der Zelloberfläche widerspiegelt, lediglich den Bestand an mRNA, welche in weiteren Schritten zum Rezeptorprotein umgeschrieben, aber auch modifiziert oder abgebaut werden könnte. Als weitere Methode der Darstellung des RAGE wurde der Western-Blot genutzt, der die Expression auf der Proteinebene analysiert. Somit könnten sich die Ergebnisse zwischen der mRNA-Analyse und dem Western-Blot unterscheiden. In beiden Methoden findet man bei der RAW-Zelllinie den größten Gehalt an RAGE. Passend dazu zeigt die RAW-Zelllinie die höchste Aktivierung des NF- κ B-Signalweges nach Stimulation mit der Brotkruste oder den daraus abgeleiteten Fraktionen im Vergleich zu den anderen Zelllinien.

Dies lässt die Vermutung zu, dass RAGE eine besondere Rolle bzw. die Hauptrolle bei Stimulation des NF- κ B-Signalweges durch AGEs spielt. Mehrere Makrophagen-Phänotypen besitzen ebenfalls den RAGE an der Zelloberfläche (Rojas et al. 2016). Aus der Literatur ist bekannt, dass über den RAGE der NF- κ B-Signalweg induziert wird (Gil, Bengmark 2007). Es ist ebenfalls bekannt, dass Maus-Makrophagen, wie es die RAW-Zelllinie ist, auf eine Stimulation mit CML-BSA mit einem signifikanten Anstieg der NF κ B-Aktivierung (nach der ersten Stunde) reagieren (Miyahara et al. 2002). Neuere Studien zeigen ebenfalls, dass der NF- κ B-Signalweg durch AGE-BSA in Makrophagen aktiviert wird (Jin et al. 2015). Selbst bei der Blockade des RAGE-Rezeptors durch Antikörper kommt es zu einer NF- κ B-Aktivierung (Jin et al. 2015, p. 7), sodass auch andere Rezeptoren, die durch AGEs stimuliert werden, diesen Effekt haben. Dies bestätigt die eigenen Ergebnisse mit der RAW-Zellreihe. In der gleichen Studie konnte eine Hochregulierung der RAGE-Expression sowohl als mRNA als auch als Protein durch AGEs gezeigt werden (Jin et al. 2015).

Makrophagen werden auch durch andere AGE-reiche Lebensmittelextrakte wie Kaffeeextrakt, ebenfalls Maillard-Reaktionsprodukte, zu einer NF- κ B-Aktivierung stimuliert. Dieser Effekt ist sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig. Es kommt nach 2 Stunden und mit einer Konzentration von 4 mg/ml Kaffeeextrakt zu einem Maximum der Stimulation (Sauer et al. 2011). In dem folgenden Versuch wurden Ratten-Makrophagen verwendet (Muscat et al. 2007). Es zeigte sich eine vermehrte Expression von p65, welche nur nach Inkubation von L-Lysin mit D-Ribose, wodurch ein Maillard-Reaktionsprodukt entstanden ist, zu sehen war und nicht durch die einzelnen Produkte bzw. auch dann nicht, wenn beide Produkte ohne Inkubation untersucht wurden. Demnach ist das einzige Produkt, welches in Ratten-Makrophagen NF- κ B stimuliert, das Maillard-Reaktionsprodukt (Muscat et al. 2007). In den genutzten Fraktionen war, wie oben beschrieben, nur sehr wenig CML auffindbar, sodass auch andere Substanzen als CML zu einer Aktivierung des Signalweges führen müssen. In mehreren Studien wurde der Zusammenhang zwischen CML und MG als Marker für den AGE-Gehalt gezeigt (z.B. bei Vlassara et al. 2002). Die hoch signifikante Korrelation zwischen der CML- und MG-Konzentration in der gesunden Bevölkerung lässt vermuten, dass beide Derivate durch denselben Prozess (Maillard-Reaktion) entstehen (Uribarri et al.

2007). Bedenken sollte man bei dieser Tatsache, dass sich die meisten Studien nur mit N-ε-Carboxymethyllysine (CML) beschäftigten und daraus Rückschlüsse auf den gesamten AGE-Gehalt gezogen werden.

Die HEK-Zellen zeigen in einer Studie von Cai et al. bei der Stimulation mit AGE-BSA eine signifikante Erhöhung der p44/42 Phosphorylierung (Cai et al. 2006). Diese Ergebnisse bestätigen den Trend, der sich in den eigenen Arbeitsergebnissen wiederfindet, sodass man bei Anwendung dieser Methode vermuten kann, dass die Stimulation mit den Fraktionen und BCE ebenfalls zu einer Erhöhung von p44/42 führt und damit zu einer vermehrten Aktivierung von NFκB. Sehr wahrscheinlich könnte man eine statistische Signifikanz durch eine vergrößerte Versuchszahl erreichen. Unterstützend zu dieser Hypothese konnte ebenso bei HEK-Zellen die Erhöhung der p38-MAP-Kinase-Aktivität nachgewiesen werden (Somoza et al. 2005a). P38 gehört genauso wie p44/42 zu den mitogenaktivierten Proteinkinasen und korreliert mit der Aktivierung von NFκB.

In dieser Arbeit wurden die HEK-Zelllinie durch BCE und durch die Fraktionen 12 und 13 signifikant stimuliert. Sowohl die Stimulation mit Maillard-Reaktionsmixturen, also eine Mehrzahl an AGEs, (Muscat et al. 2007) als auch mit AGE-BSA (Serban et al. 2015) führt ebenfalls bei humanen Nierenendothelzellen (HEK) zu einer erhöhten Expression von NFκB, sodass die Literatur die Arbeitsergebnisse beider durchgeführter Methoden (Western-Blot und Fluoreszenzmessung des GFP) bestätigt.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass AGE-BSA zu einer signifikanten Hochregulierung der RAGE-Expression in HEK-Zellen führt (Liang et al. 2010).

Folgende Forschungsliteratur zeigt jedoch, dass AGEs keinen Einfluss auf die Expression von RAGE haben (Schmidt et al. 2001; Bartling et al. 2007). Auch in einer neuen Publikation von Medeiros et al. 2014 wurde weder die RAGE-Expression noch der intrinsische Signalweg der Apoptose in humanen T-Lymphozyten durch AGE-BSA beeinflusst (Medeiros et al. 2014). Das geht zum Teil mit den Ergebnissen zu humanen T-Lymphozyten (Jurcat) mit Inkubation von BCE einher. In den eigenen Untersuchungen wurde das Augenmerk vermehrt auf die NF-κB-Aktivierung gelegt, nicht auf die RAGE-Expression. BCE führt dabei zu keiner Stimulierung von NF-κB. Bei einer Konzentration von 10mg/ml BCE konnte sogar eine signifikante Inhibition gezeigt werden.

Widersprüchlich dazu, dass AGEs keinen Einfluss auf die RAGE-Expression haben, ist, dass man bei Mäusen, die mit einer AGE-armen Ernährungsweise gefüttert werden, ein niedrigeres RAGE-Proteinlevel als bei normal gefütterten Mäusen findet (Cai et al. 2007). Hieraus kann man den Rückschluss ziehen, dass AGEs eine RAGE-Expression indizieren. Vermutlich kann man aber dieses Ergebnis nicht auf alle Zelllinien übernehmen.

BCE führte bei den T-Lymphozyten nicht zu einer Aktivierung von NFκB, jedoch stieg die Expression unter Stimulation einzelner Fraktionen an. Dies lässt die Vermutung zu, dass in den

Fraktionen eine höhere Konzentration an AGEs zu finden war. Das ist aber nicht mit Sicherheit festzustellen, da bisher noch nicht alle aktiven Substanzen in den Fraktionen ermittelt wurden.

In Vorversuchen aus dem gleichen Labor wurden MFB mittels BCE stimuliert. Dies führte zu einer fünffachen Erhöhung der Aktivierung von NF- κ B (Versuch 18 Stunden nach Stimulierung) (Ruhs et al. 2007). In dieser Arbeit kommt es bei den kardialen Fibroblasten durch eine Stimulierung von Brotkruste (BCE oder Fraktionen) zu einer ca. zweifachen Erhöhung der Expression von der p44/42 MAP-Kinase. Bei diesen Versuchen wurde mit der gleichen Zelllinie gearbeitet, jedoch war die Stimulierungszeit von einer Stunde geringer. Da Ruhs et al. die Stimulierung von NF- κ B bei MFB mit BCE bereits bewiesen haben, ist der nicht statistisch signifikante Trend der Aktivierung der p44/42 MAP-Kinase durch BCE und die Fraktionen sehr wahrscheinlich. Des Weiteren könnte gezeigt werden, dass BCE in einer Aktivierung von NF- κ B-Luciferase resultiert (Ruhs et al. 2010). Dies spricht ebenso für die hier dargestellten Ergebnisse.

Ebenfalls als AGE-reiche Lebensmittelextrakte werden unter anderen Kaffee, Soja-Soße und Rotwein gehandelt. Diese zeigen AGE-spezifische Fluoreszenzen. Zusätzlich wurde in Soja-Soße und in Kaffee CML nachgewiesen (Munesue et al. 2013). Diese Arbeitsgruppe trennte jedes Lebensmittel einzeln in eine niedrig- und hochmolekulare Fraktion. Die großen Moleküle führten zu einer Expression und die kleinen zu einer Inhibition des NF- κ B. Diesen Effekt kann man jedoch nicht auf alle Lebensmittel verallgemeinern. Derselbe Versuch wurde mit Cola, welches ebenso AGE-spezifische Fluoreszenzen aufweist, durchgeführt. Die niedrig-molekulare Fraktion führte hierbei zu einer Expression von NF- κ B und die großen Moleküle hatten keinen Effekt (Munesue et al. 2013).

Kaffee stimulierte ebenfalls die NF- κ B-Aktivierung in tumorösen Prostatat- Zellen (Kolberg et al. 2016). Jedoch konnte gleichzeitig gezeigt werden, dass eine TNF- α - induzierte NF- κ B-Aktivierung durch eine geringe Kaffee-Konzentration (von 1m/ml) bereits zu einer Inhibition dieses Signalweges führt. Diese Inhibition ist auf die im Kaffee beinhalten Chlorogensäure zurückzuführen (Feng et al. 2005).

In mehreren Publikationen (siehe Tabelle 15) sieht man, dass es bei Aktivierung von RAGE zu einer Hochregulierung der Expression von NF κ B kommt. Es lässt sich zusammenfassend feststellen, dass in der Literatur eine zustimmende Meinung zur Ausgangshypothese (Aktivierung von NF- κ B durch Brotkruste) vorherrscht.

Tabelle 15: Analyse der NFkB-Aktivierung in der Literatur. (Bierhaus et al. 2001; Cai et al. 2006; Kislinger et al. 1999; Lander et al. 1997; Lappas et al. 2007; Marko et al. 2003; Medeiros et al. 2014; Miyahara et al. 2002; Muscat et al. 2007; Ruhs et al. 2007; Sauer et al. 2011)

| Autor | Jahr | Spezies | Zell-Typ | Produkt | | | Methode | | | Ergebnis | NFkB-Aktivierung | | |
|------------------|------|---------|--|-----------------------------|-----------------------------|--------|----------|-------------------------------------|--------------------------------------|---|-------------------|------------|---|
| | | | | Lebensmittel extrakt | AGE-BSA | AGE's | in vitro | in vivo | signifikanter Anstieg | | keine Reaktion | Inhibition | |
| Bierhaus et al. | 2001 | human | BAEC (Aortenendothel) | | AGE-Albumin | | x | | | | x | | |
| | | human | BAEC mit Luciferse-Expression | | AGE-Albumin | | x | | | | x | | |
| Cai et al. | 2006 | human | HEK (Nierenendothelzellen) | | x | | x | | Western-Blot für p44/42 | signifikant erhöht | | | |
| Kislinger et al. | 1999 | human | vascular smooth muscle cells | | CML-BSA | | x | | | | x | | |
| Lander et al. | 1997 | Ratte | pulmonary artery smooth muscle cells | | AGE-Albumin | | x | | Western-blot | konzentrations- und zeitabhängige Aktivierung von pERK 44/42 | x | | |
| Lappas et al. | 2007 | human | Placenta- und Gestationsmembran | | x | | x | | ELISA-Detektion NF-kB aus Kern | | x | | |
| Marko et al. | 2003 | human | Tumorzellen aus Lunge, Magen & colorectal | | | x | x | | MAP-Kinase | herunterreguliert | | | x |
| | | | | | | andere | x | | MAP-Kinase, Zellwachstum | 8/14 herunterreguliert, 6/14 kein Effekt | 6/14 | 8/14 | |
| Medeiros et | 2014 | human | T-Lymphozyten & Monozyten | | x | | x | | AGE-BSA ->PCR RAGE | kein Effekt auf RAGE-Expression | | x | |
| Miyahara et al. | 2002 | Maus | Makrophagen (RAW-cells) | | CML-BSA | | x | | Electrophoretic mobility shift assay | Peak 1h, geringerer Effekt bis 5h | x | | |
| Muscat et al. | 2007 | Ratte | Makrophagen | coffe-extract | | | x | | Western-Blot p65 (subunit von NFkB) | 13-fach erhöht im Vergleich zu PBS (Kontrolle) | x | | |
| | | | Makrophagen | Maillard-Reaktions-Mixturen | | | x | | Western-Blot p65 (subunit von NFkB) | nur bei MRP, nicht bei D-Ribose bzw. L-Lysin | x | | |
| | | human | HEK (Nierenendothelzellen) +/- RAGE-Transfektion | | Maillard-Reaktions-Mixturen | | x | | Western-Blot p65 (subunit von NFkB) | 2-fache Erhöhung NF-kB-Aktivität, jedoch mit Katalase keine Reaktion- alles über H2O2 | x | | |
| Ruhs et al. | 2007 | | | BCE | | | | | Dot Blot mit AGE-Antikörper | BCE besitzt CML, Arg-Pyr und GA-Pyr | | | |
| | | Maus | CF (cardiac fibroblast) | BCE | | | x | | 10mg/ml BCE Wester-Blot p38 und p42/ | Erhöhung 8xp38 und 5xp42/44 | x | | |
| | | | | BCE | | | x | | NFkB-Aktivität | 5x erhöht | x | | |
| Sauer et al. | 2011 | Ratte | Makrophagen | coffe-extract | | | x | | Western-Blot p65 (subunit von NFkB) | zeit- und konzentrationsabhängige Erhöhung | x | | |
| | | | CaCo-Zellen (Kolonkarzinom) | | | | x | | Western-Blot p65 (subunit von NFkB) | keine Reaktion | | x | |
| | | Ratte | Makrophagen und CaCo-Zellen | | Maillard-Reaktions- | | x | | Western-Blot p65 (subunit von NFkB) | | x | | |
| | | | | | | x | | Western-Blot p65 (subunit von NFkB) | Blockierung mit Katalase | | | x | |

5.2 Aufnahme AGEs

Wie in der Einleitung beschrieben, wird angenommen, dass AGEs über den Darmtrakt in den menschlichen Körper aufgenommen wird. Semba et al. 2011 zeigten jedoch, dass es keine Korrelation zwischen der Menge an aufgenommenem Fast Food und der Höhe des CML-Serums besteht, jedoch eine positive Korrelation zum Beispiel zu Früchten, Soja, Milch u.a. besteht (Semba et al. 2011). Den Grund für die geringer enterale Aufnahme von CML bei AGE-reicherem Essen kann die Arbeitsgruppe nicht nennen. In einer Folgearbeit bei gesunden Erwachsenen verringert sich bei einer AGE-armen Ernährung der AGE-Gehalt sowohl im Serum als auch im Urin. Jedoch ist kein signifikanter Unterschied in den Gruppen mit AGE-reicher und -armer Ernährung innerhalb von sechs Wochen festzustellen (Semba et al. 2014). Möglicherweise kann kein signifikanter Effekt nachgewiesen werden, weil die Versuchsdauer zu kurz war. Dieses Ergebnis wird im Forschungsdiskurs durchaus kontrovers diskutiert, da Publikationen (siehe oben) einerseits zeigen, dass eine AGE-reiche Nahrung zu erhöhten AGE-Gehalt im Körper führt, und andererseits auch nicht. Der aufgezeigte Unterschied zwischen den Ergebnissen von Cai und Somoza (Cai et al. 2007 und Somoza et al. 2006) zu Semba (Semba et al. 2014) ergibt sich aufgrund differenter Spezies. Bei der ersten Ergebnisreihe wurden Mäuse bzw. Ratten getestet und bei der zweiten Menschen. Somit kann man in diesem Fall keine Rückschlüsse der AGE-Aufnahme bei Mäusen oder Ratten auf die Prozesse im Menschen ziehen.

Schlussendlich werden nur die aufgenommenen Substanzen im Stoffwechsel verarbeitet und können dadurch einen Nutzen oder einen Schaden verursachen. Zusätzlich ist nicht nur die Zufuhr, sondern auch die Stoffwechsellage entscheidend. Bei NOD-Mäusen mit nicht spontan aufgetretenem Diabetes mellitus ist der AGE-Gehalt im Serum und im Nierengewebe 2-3fach höher als bei Diabetes resistenten Mäusen (He et al. 2000).

5.3 Schaden oder Nutzen: was überwiegt?

Ein erhöhter AGE- Gehalt ist mit den meisten chronischen Erkrankungen assoziiert, sodass es nahe liegt, dass AGEs unter dem Strich eher schädlich für den Körper sind. Wie bei so vielem macht die Konzentration den Unterschied. In Zellversuchen wurde an Hand von Makrophagen einerseits gezeigt, dass eine höhere Konzentration von AGEs zytotoxisch wirkt, jedoch bei demselben Stimulans, dass eine kleinere Konzentration das Zellwachstum anregt, wobei mit dem Co-Faktor Katalase mehr Zellen überleben und somit die zytotoxische Potenz reduziert werden kann (Sauer et al. 2011).

Es ist nicht von der Hand zu weisen, dass bei RAGE-Knockout Mäusen eine längere Lebenserwartung festgestellt wurde, als bei RAGE +/-Mäusen (Chen et al. 2014). Aus diesen Ergebnissen kann man interpretieren, dass es bei einer verminderten Aktivierung von NFkB zu einer erhöhten Lebenserwartung kommt. Außerdem ergaben die Ergebnisse dieser Publikation, dass bei

RAGE-Knockout Mäusen das Tumorwachstum bei implantiertem Gliom kleiner ausfällt und es zu einer geringeren Expression von proinflammatorischen Cytokinen kommt (Chen et al. 2014).

Bezugnehmend auf die im Vorherigen beschriebene erhöhte Sterblichkeit mit steigendem CML-Gehalt zeigten Schwendler et al. 2002 bei Patienten, die mindestens wöchentlich eine Hämodialyse benötigen, dass ein höherer CML-Gehalt bzw. ein höhere AGE-Fluoreszenz zu einer geringeren Mortalität führt. Die Lebensspanne wird bei niedrigeren AGE-Fluoreszenzen verkürzt. Die Autoren bringen diese eher widersprüchliche Tatsache mit einem besseren Ernährungszustand der Patienten in Zusammenhang, sodass man in diesem speziellen Fall einen Nutzen aus dem erhöhten AGE-Gehalt schlägt. Des Weiteren untersuchten Marko et al. 2002 ein bestimmtes Maillard-Reaktionsprodukt (3-hydroxy-4-[(E)-(2-furyl)methylidene] methyl-3-cyclopentene-1,2-dione). Dieses inhibiert das Wachstum von humanen Tumorzellen (Marko et al. 2002). In einer weiteren Publikation von Marko et al. 2003 wurden insgesamt vierzehn Maillard-Reaktionsprodukte getestet, wobei nur sechs dieser Reaktionsprodukte keinen Effekt auf das Wachstum zeigten, die restlichen jedoch wachstumshemmend wirkten (Marko et al. 2003). Die MAP-Kinase gilt als ein Hauptweg der Zellproliferation und wurde durch das Maillard-Reaktionsprodukt herunter reguliert. In diesen Versuchen wurde mit humanen Tumorzellen der Lunge, des Magens und des Darms gearbeitet, bei denen die Reaktion sehr ähnlich war. Allerdings weist jede dieser Zelllinien ein entkoppeltes Zellwachstum (Kriterium für bösartige Tumore) vor. Somit können auch hier keine genauen Rückschlüsse auf eine normale, nicht tumoröse Zelle geschlossen werden. Positiv ist hingegen zu werten, dass das Tumorwachstum durch AGEs gehemmt wird.

Ein weiterer positiver Effekt nach der oralen Aufnahme von CML ist die Aktivierung von Gluthation (GSH) (Somoza et al. 2005b), welches den Redoxzustand in Zellen reguliert (Miyahara et al. 2002). GSH kommt eine zentrale Rolle bei der Entgiftung von organischen Stoffen, unter anderem auch AGEs, zu. Beispielsweise wird Methylglyoxal durch GSH entgiftet (Ferguson, Booth 1998), sodass ein Rückkopplungsmechanismus zwischen AGEs und Glutathion besteht, wodurch die Akkumulation der AGEs im Gewebe vermindert werden kann. Nicht nur AGEs, sondern auch oxidativer Stress, welcher unter anderem ebenfalls durch AGEs entsteht, induziert die GSH-Biosynthese (Dieter, Vella 2013). Bei schlecht eingestellten Diabetes mellitus Typ 2-Patienten wurde eine verminderte hepatische GSH-Produktion festgestellt (Sekhar et al. 2010), was eine weitere Erklärung dafür darstellt, dass Diabetiker einen höheren AGE-Gehalt aufweisen.

Schlussendlich gibt es ebenfalls positive Effekte durch AGEs, jedoch überwiegen die schädlichen Einflüsse.

5.4 Möglichkeit der AGE-Reduzierung

Obwohl man noch nicht mit letzter Gewissheit sagen kann, dass AGEs vermutlich mehr Schaden als Nutzen für den menschlichen Körper bringen, ist man bei der Vielzahl mit AGE-assoziierten

Erkrankungen (siehe Einleitung) auf der Suche nach Möglichkeiten, AGEs im Blut und auch in Gewebe zu reduzieren. Einen Überblick zeigt Abbildung 23.

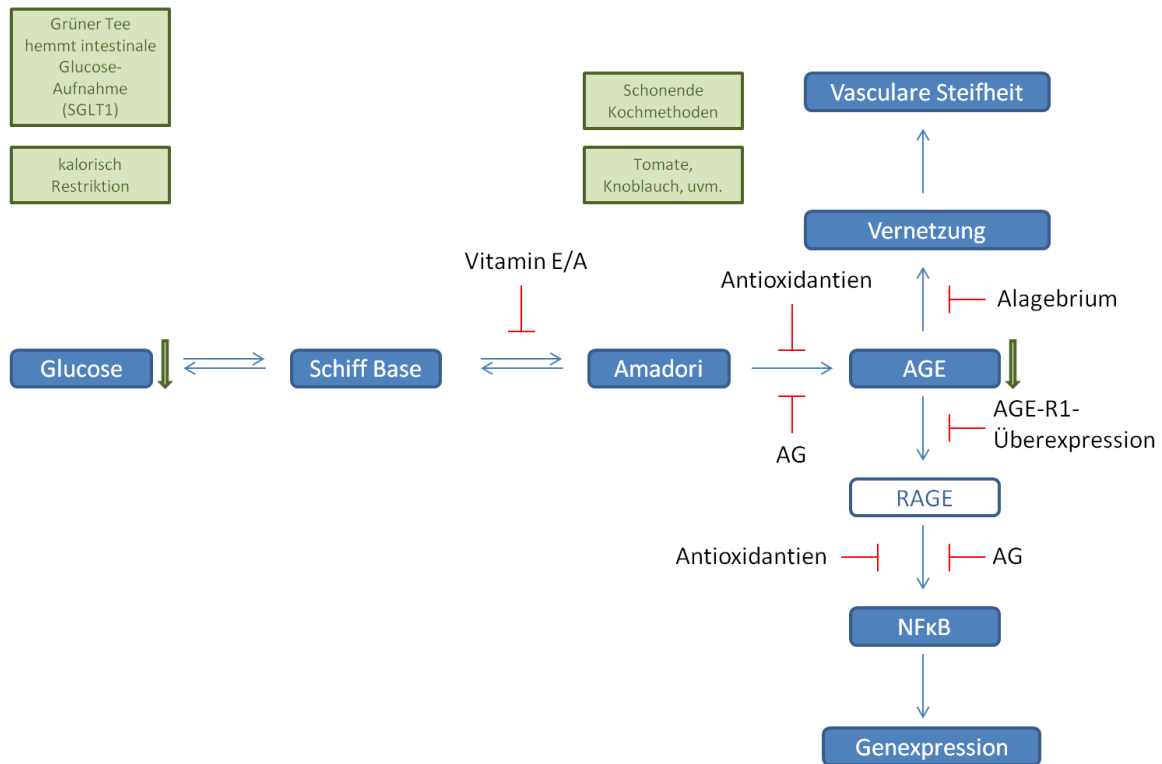


Abbildung 23: Möglichkeiten der Reduktion AGEs

Der erste Schritt der AGE-Reduzierung sollte über eine gesunde ausgewogene Ernährung geschehen (Uribarri et al. 2010). Uribarri et al. zeigen ebenfalls auf, dass diese Richtlinien im Einklang mit den Empfehlungen von Organisationen, wie zum Beispiel American Heart Association, American Institute for Cancer Research und American Diabetes Association, stehen. Des Weiteren kann man die Produktion von AGEs während des Erhitzungsprozesses reduzieren, indem man das Erhitzen unterlässt oder die schonenden Garmethoden, wie Pochieren, Dämpfen, Dünsten und Kochen nutzt (Uribarri et al. 2010). Insgesamt zeigte schon Ledl et al. 1990, dass AGEs bei kürzerer Kochzeit, geringerer Kochtemperatur und dem Gebrauch von sauren Lebensmitteln (wie zum Beispiel Zitrone) reduziert werden (Ledl, Schleicher 1990).

Viele Nahrungsprodukte besitzen eine natürliche Potenz, AGEs zu verringern, so z.B. auch Knoblauch, welches zu einer verringerten Vernetzung der AGEs führt (Ahmad et al. 2007). Zudem führt *Ilex paraguariensis* extracts, umgangssprachlich bekannt als Mate, ebenfalls zu einer konzentrationsabhängigen Unterbindung der ersten Glykierung von Proteinen (Lunceford, Gugliucci 2005). Einem weiteren Produkt, dem grünen Tee, spricht man ebenfalls eine Inhibition der AGE-Akkumulation zu (Lunceford, Gugliucci 2005). Außerdem kann durch grünen Tee der Glucosespiegel im Blut und damit einhergehend auch die Komplikationen minimiert werden (Vinson, Zhang 2005). Als bewiesen gilt auch, dass grüner Tee, genauer der Bestandteil epicatechin

galleate, die intestinale Aufnahme von Glukose über den SGLT1-Transport hemmt (Shimizu et al. 2000). Ferner führen Tomaten zu einer Reduktion der AGE-Verbindungen *in vitro* (Kiho et al. 2004). Jedoch sind die Effekte des Knoblauchextrakts und der Tomatenfraktion bis jetzt nur *in vitro* geprüft worden, sodass kein genereller Rückschluss auf die orale Zufuhr gezogen werden kann.

Zu einer gesunden Ernährung gehört auch eine entsprechende Zufuhr von Vitaminen. Durch die Ergänzung des antioxidativem Vitamin E zur Ernährung wurde der erste Schritt der Maillard-Reaktion blockiert, damit die Proteinglykierungen reduziert und infolgedessen sank bei Diabetikern der HbA1c-Wert innerhalb von ein und zwei Wochen signifikant ab (Ceriello et al. 1991) (Xu et al. 2014). Im Umkehrschluss wurde bei einer Langzeitstudie (23 Jahre follow-up) gezeigt, dass die Einnahme von Vitamin E oder A mit einem niedrigerem Risiko, Diabetes mellitus Typ 2 zu entwickeln, einhergeht (Montonen et al. 2004).

Eine weitere Alternative zur AGE Reduktion wird durch eine Überexpression von AGE-R1 durch die Blockierung des AGE induzierten RAGE-Signalweg vermittelt (Lu et al. 2004). AGE-R1 gilt als Gegenspieler zu RAGE, indem AGEs an AGE-R1 binden und über die Endozytose abgebaut werden (Lu et al. 2004). Somit wirkt es zusätzlich präventiv gegenüber AGE-assoziierten Erkrankungen, indem es z.B. vor einer arteriellen Intimahyperplasie schützt (Torreggiani et al. 2009). Cai et al. 2007 konnten zudem zeigen, dass es bei einer AGE-armen Ernährungsweise zu einem ansteigenden AGE-R1-Proteinlevel kommt (Cai et al. 2007). Ein ähnliches Ergebnis dazu zeigten He et al. 2000: Prädiabetische NOD-Mäuse weisen im Vergleich zu Diabetes resistenten Mäusen ein dreifach niedrigeres AGE-R1-Level auf (He et al. 2000).

Eine andere Möglichkeit bietet sRAGE, indem AGEs ebenfalls über dieselbe Domäne wie bei RAGE bindet und somit nicht nur im Wettbewerb zur Ligandenbindung mit dem membranösen Rezeptor RAGE steht, sondern zusätzlich AGEs im zweiten Schritt abbaut (Yonekura et al. 2003). Es ist eine gespaltete Variante des RAGE-Rezeptors, die extrazellulär zu finden ist und unter anderem die Aktivierung von NFkB minimiert (Lander et al. 1997). Des Weiteren wurde festgestellt, dass sRAGE positiv mit zirkulierenden AGEs korreliert (Nakamura et al. 2008). Daher ist es nicht verwunderlich, dass Patienten, die an Typ 2 Diabetes mellitus erkrankten, einen erhöhten sRAGE-Spiegel aufweisen (Thomas et al. 2015). Außerdem könnte sRAGE als indirekter Biomarker für Entzündungsprozesse gelten. So findet man bei Patienten mit rheumatoider Arthritis einen Mangel an sRAGE vor (Geroldi et al. 2006a); ganz im Gegensatz zu Menschen, die sehr lang leben (Alter: 100-104 Jahre) (Geroldi et al. 2006b).

Eine weitere Alternative findet sich in der Pharmakotherapie. Aminoguanidine reagieren mit der Dicarbonylverbindung in der Maillard-Reaktion (Hirsch et al. 1995) und inhibieren dadurch *in vitro* die AGE-Bildung und die Kollagenvernetzung, obwohl die Amadorieprodukte nicht beeinflusst werden. Außerdem verhindern sie die Diabetes-induzierte Akkumulation von AGEs *in vivo* und

nachweislich die Vernetzung von arteriellen Wandproteinen (Brownlee et al. 1986). Zusätzlich sind Aminoguanidine in der Lage den NFκB-Signalweg zu supprimieren, indem sie die NFκB-p65-Translokation inhibieren (Parthasarathy et al. 2014). Wang et al. 2009 sahen ebenfalls eine Suppression des NF-κB-Signalweges, dennoch wurde kein Unterschied in der RAGE-Expression gesehen (Wang et al. 2009). Dessen ungeachtet haben Aminoguanidine auch Nebenwirkungen, wie etwa Magen-Darm-Störungen, Anomalien bei Leberfunktionstests, Grippe-ähnliche Symptome, eine seltene Vaskulitis (Freedman et al. 1999), eine Ausbildung von bereits makroskopisch sichtbar maligne Nierentumore (Oturai et al. 1996), eine verkürzte Lebenserwartung (Oudes et al. 1998), die Bildung von Wasserstoffperoxid und eine zeit- und konzentrationsabhängige Inhibition der Katalase (Ou, Wolff 1993), wodurch es durch freie Radikale zu oxidativen Schäden an der DNA kommen kann.

Einer der ersten klinischen Studien (ACTION I= Clinical Trial in Overt Type 1 Diabetic Nephropathy) mit Pimagedine (Wirkstoff der Aminoguanidinen) durchgeführt. Diese zeigte bei Typ 1-Diabetikern keine statistisch signifikante Reduktion der Progression in die Dialysepflichtigkeit, der Notwendigkeit einer Nierentransplantation oder der Mortalität. Dabei konnte in dieser Studie ein signifikant langsamerer Niedergang der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und ein signifikanten Rückgang der Proteinurie aufgezeigt werden. Somit kann die Behandlung mit Aminoguanidinen eine sinnvolle Ergänzung zu den bereits bestehenden Therapien des Diabetes mellitus Typ 1 sein.

Weitaus bekannter und in der täglichen Medikation vieler Hypertoniker sind Angiotensin-Converting-Enzyme(ACE)-Hemmer. Unabhängig von ihrer Hauptfunktion, den Blutdruck zu verringern und dadurch die Schäden der Niere durch arterielle Hypertension zu verringern, ist u.a. Benazepril in der Lage, die Glomerulosklerose zu dämpfen und den AGE-Gehalt signifikant zu minimieren (Liu et al. 2009, p. 291). Ebenfalls durch eine Benazepril-Therapie lässt sich diese RAGE-Expression indirekt wie folgt reduzieren (Liu et al. 2009): Durch die Blockade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), wird die intrazelluläre Bindung von NF-κB an den RAGE-Genpromoter inhibiert und dadurch die weitere RAGE-Expression verhindert (Yamagishi et al. 2008). Forbes et al. 2005 zeigte zusätzlich ein Anstieg von sRAGE. (Forbes et al. 2005).

Schon 1987 konnte gezeigt werden, dass Aspirin (=Acetylsalicylsäure, ASS) ebenfalls den AGE-Gehalt reduziert (Rendell et al. 1986). Jedoch muss ASS dafür in einer hohen Dosis und für einen langen Zeitraum eingenommen werden, wodurch viele ungewollte Nebenwirkungen entstehen können. ASS ist schon bei geringer Dosis ein nicht reversibler Thrombozytenaggregationshemmer. Unter anderem sind die Blutungsneigung und damit auch das Risiko einer spontanen Blutung erhöht, sodass die Risiken den Nutzen übersteigen und ASS damit für die AGE-Therapie unbrauchbar ist.

Man kann zusammenfassen, dass die klinische Evidenz zu Interventionen über die Inhibition der AGE-Bildung bzw. -Wirkung derzeit schwach und wenig überzeugend ist (Engelen et al. 2013).

5.5 Ausblick

Die Arbeit zielt auf die Darstellung der NF- κ B-Aktivität ab. Jedoch wurde nicht untersucht, welches Produkt in der Brotkruste bzw. in den Fraktionen diesen Weg aktiviert bzw. hochreguliert. Es wurde lediglich festgestellt, dass einzelne AGEs in der Brotkruste und in den Fraktionen vorhanden sind und dann der Rückschluss gezogen, dass diese AGEs den NF- κ B-Signalweg aktivieren.

Wie schon von Ruhs et al. 2007 beschrieben wurde, befinden sich mehrere AGE-Modifikationen in der von uns genutzten Brotkruste, unter anderem nachgewiesen wurde Arg-Pyrimidin, CML und GA-Pyridin (Ruhs et al. 2007). Da ebenso Versuche mit den Fraktionen gemacht wurden, mussten diese im Vorfeld auch auf das Vorhandensein von AGE-Modifikationen geprüft werden; wie oben bereits erwähnt, fanden sich kein Arg-Pyrimidin, jedoch CML, Imidazolol und Pentosidin. Vor dem Hintergrund, dass mehrere Maillard-Reaktionsprodukte zur selben Zeit und im selben Prozess entstehen, ist der Gedanke, dass man in Brotkruste bzw. in den Fraktionen nicht nur die bekannten AGEs findet, naheliegend. So wurde angenommen, dass noch weitere AGE-Modifikationen im BCE bzw. den Fraktionen zu finden sind. Muscat et al. 2007 gingen allerdings noch einen Schritt weiter. Die Gruppe untersuchte außerdem noch HEK-Zellen, von denen zusätzlich welche mit RAGE transfiziert wurden, sodass es eine HEK-Zelllinie mit und eine ohne dem RAGE-Rezeptor vorlag. Beide Zelllinien wurden mit MRPs inkubiert und beide zeigten dieselbe Reaktion einer zweifachen Aktivierung von NF- κ B. Demnach muss angenommen werden, dass auch andere Rezeptoren den intrazellulären Signalweg anregen. Derselbe Versuch wurde dann unter Zugabe von Katalase erneut durchgeführt und zeigte keine Reaktion. Dem folgend haben Muscat et al. darauf geschlossen, dass dieser Signalweg über Wasserstoffperoxid und ROS läuft. Im Zuge dessen wurden die Stimulanzien auf ihren Gehalt an Wasserstoffperoxid geprüft und die höchste Konzentration wurde in MRP und Kaffeeextrakt gefunden. In diesem Zusammenhang sollte man ebenfalls die den Wasserstoffperoxid-Gehalt in BCE bzw. in den Fraktionen ermitteln und prüfen, ob gegeben falls unter Zugabe von Katalase die Versuchsreihen dieser Forschungsarbeit anders ausfallen würden. Des Weiteren sollte spezifischer nach den AGE-Verbindungen im BCE bzw. in den Fraktionen geforscht werden. Wenn man, wie oben erwähnt, die genaue Zusammensetzung und Konzentration kennt, kann man die aktive Substanz ermittelt, welche den NF- κ B-Signalweg aktiviert. Wichtig wäre auch zu überprüfen, ob das BCE und die Fraktionen ohne die bekannten AGEs immer noch einen Effekt an den AGE-Rezeptoren erzielen oder ob ebenfalls der NF- κ B-Weg aktiviert wird. Dies würde Rückschlüsse auf eventuell weitere aktive Substanzen in der Brotkruste zulassen. Eine aktive Verbindung wurde bereits in den Fraktionen des BCE gefunden. Bei Gliadin-geblockten Fraktionen kommt es nicht zu einer Stimulierung des NF- κ B-Signalweges (Pöttsch et al. 2014), somit ist Gliadin für die Induktion von NF- κ B verantwortlich. Außerdem konnte die NF- κ B-Aktivität fast ausschließlich auf C6-Aminoreductone im Kaffee zurückgeführt werden (Wühr et al. 2010).

Es gibt jedoch auch andere AGE-reiche Lebensmittelextrakte, wie etwa Kaffee (Muscat et al. 2007), Sojasoße und Malz. Mit diesen Substraten könnten ähnliche Versuche durchgeführt werden. Gegebenenfalls lassen sich andere AGEs finden und deren Reaktion auf die Zelllinien aufzeichnen.

Unter anderem wurde auch die Reduktion von AGEs im Körper in meiner Arbeit beleuchtet. Zur Reduktion der NF- κ B-Aktivierung rückt mehr eine neue Verbindung, Chalcone genannt, in den wissenschaftlichen Fokus. Es wird in mehreren Pflanzenarten gefunden, kann jedoch ebenfalls synthetisch hergestellt werden. Chalcone sind für ihre vielseitigen pharmakologischen Effekte bekannt, darunter antioxidativ, antiinflammatorisch und antihyperglykämisch. Dadurch ist es ein Gegenspieler zum NF κ B-Signalweg. Jede dieser Eigenschaften wirkt sich positiv auf den menschlichen Körper aus. Vor allem bei übergewichtigen Patienten könnte dieses Substrat eine Minimierung der Adipositas assoziierten Folgeerkrankungen vollführen. Bisher wurde beschrieben, dass Chalcone die Aktivierung des Signalweges von NF- κ B inhibieren (Fang et al. 2015), wodurch zum Beispiel der übergewichtabhängige Verlust bzw. die Verringerung der Nierenfunktion aufgehalten werden könnte.

5.6 Limitation der Arbeit

Fehler dieser Arbeit könnten sein, dass die Versuchszahl zu gering gehalten war. Häufig sah man in den statistischen Auswertungen den Trend zur statistisch signifikanten Aktivierung des NF- κ B-Signalweges im Vergleich zur negativ Kontrolle. Bei Erhöhung der Versuchszahl wäre es denkbar gewesen, dass dann ein Signifikanzwert von unter 5% ($p < 0,05$) entsteht. Im Umkehrschluss wäre es auch möglich gewesen, das Signifikanzniveau auf $p < 0,1$ zu erhöhen.

Zu bedenken ist ebenfalls, dass die vorhandene Brotkruste in PBS in Lösung gebracht wurde. Jedoch wurden alle nicht löslichen Fraktionen in keinem der Versuche untersucht. In diesem Teil der Brotkruste können noch andere Substanzen vorhanden sein, die wiederum andere Effekte haben.

Als große Kritik dieser Arbeit sehe ich, dass man die letzte Zielsetzung der Einschätzung, ob die Aktivität des NF- κ B-Signals von der Rezeptorexpression abhängig sind, nicht abschließend beantworten werden kann. Ein sinnvoller Versuchsaufbau, um eine Korrelation zwischen dem Rezeptorbesatz und dem NF- κ B-Aktivität festzustellen, könnte zum Beispiel folgendermaßen aussehen: Man stimuliert eine Zelllinie je mindestens zweifach mit verschiedenen Stimulanzen bzw. verschiedenen Konzentrationen einer Stimulans. Dann nutzt man die erste Stimulation mit der entsprechenden Methode (bei HEK-Zellen: GFP-Fluoreszenz mittels Fluoreszenzmesser, bei RAW-Zellen: SEAP-Assay, bei MFB-Zellen: Western-Blot und bei Jurcat-Zellen: GFP Fluoreszenz mittels FACS) zur Abbildung der NF- κ B-Aktivität und aus der zweiten Stimulation wird der RNA-Gehalt der Rezeptorgene oder -proteine bestimmt. Diesen Versuch wiederholt man mehrfach, um eine entsprechende Versuchszahl zu generieren. Zum Schluss stellt man dann die Abhängigkeit der NF- κ B-Aktivität zum Rezeptorgehalt einer Zelllinie dar.

Daraus lässt sich einerseits ableiten, ob es zu einer vermehrten RAGE-Expression bei Stimulierung von RAGE kommt und andererseits könnte man die These bestätigen oder verwerfen, ob ein erhöhter RAGE-Gehalt zu einer erhöhten NF- κ B-Aktivität führt.

6 Zusammenfassung

Diese Arbeit setzte sich mit dem AGE-reichen Lebensmittelextrakt Brotkruste und deren Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B auseinander. Die Brotkruste wurde einerseits zu einem flüssigen Extrakt verarbeitet und andererseits wurde dieses Brotkrustenextrakt mittels HPLC in 15 Fraktionen aufgetrennt, von denen drei für die Versuche ausgewählt wurden. Zusätzlich wurden der Proteingehalt der Fraktionen und der Gesamt-AGE-Gehalt ermittelt. Des Weiteren wurde bei den drei Fraktionen unter Verwendung von ELISA nach den bekannten AGEs CML, Arg-Pyrimidin, Imidazolone und Pentosidin gesucht. Arg-Pyrimidin findet man nicht in den Fraktionen. Imidazolone ist in der Fraktion 12 und 13, Pentosidin und CML bei allen drei Fraktionen zu finden.

Für die Versuche wurden drei Reporter-Zelllinien genutzt. Bei den HEK- und den Jurkat-Zellen war eine Aktivierung von NF- κ B an eine Expression von einem grünfluoreszierenden Proteine (GFP) gekoppelt. Die HEK-Zellen wurden lysiert und die spezifische Fluoreszenz des GFP gemessen. Bei den Jurkat-zellen wurde mittels FACS die Anzahl der lebenden und fluoreszierenden Zellen ermittelt. Die RAW-Zellen produzierten bei Stimulierung des NF- κ B eine alkalische Phosphatase, die in den Überstand abgegeben wurde. Zusätzlich wurde bei jeder Zelllinien (ebenso MFB-Zelllinie) die phosphorylierte p44/42 MAP-Kinase mittels Western-Blot ermittelt.

Die Fraktionen zwölf und dreizehn stimulieren signifikant die HEK-Zellen. BCE erzeugt ebenfalls diese Reaktion wobei eine lineare Abhängigkeit von der Konzentration ersichtlich wird. Insgesamt ist diese Erhöhung der NF- κ B-Aktivität im Vergleich zu den anderen Zelllinien nur gering, jedoch signifikant. Im Western-Blot wird ein Trend hinsichtlich der vermehrten Aktivierung von NF- κ B erkennbar.

Die Jurkat-Zellen überraschten in ihren Ergebnissen dahingehend, dass es zu keiner Aktivierung des Transkriptionsfaktors durch BCE gekommen ist. Ganz im Gegenteil zeigte sich eine signifikante Inhibition von der NF- κ B-Aktivierung bei Stimulation von 10 mg/ml BCE. Die Fraktionen zehn und zwölf hingegen stimulierten die GFP-Expression. Kein Stimulans, auch nicht die vom Hersteller angegebene positive Kontrolle (TNF- α), wies eine signifikante Expression von phosphorylierten p44/42 MAP-Kinase im Western-Blot auf.

Die RAW-Zellen reagierten bei jeder verwendeten BCE-Konzentration und bei der Stimulation mit der Fraktion dreizehn mit einer signifikanten Erhöhung der NF- κ B-Aktivität. Diese Erhöhung ist zwischen zwei bis fünf Mal so hoch im Vergleich zur negativen Kontrolle. Das stellt die stärkste Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs in dieser Arbeit dar. Die Bilder des Western- Blots suggerieren ein positives Ergebnis. In der Analyse der Daten streuen diese zu stark.

Die MFB-Zellen lassen keine statistische Signifikanz in der Stimulierung mit BCE oder den Fraktionen erkennen, jedoch zeigt sich eine Tendenz der Mittelwerte zur zweifachen Erhöhung der p44/42-MAP-Kinase-Expression.

Es lässt sich keine Abhängigkeit zwischen den AGE-Gehalt und der NF- κ B-Aktivität aufzeigen.

Die Gen-Analyse zeigte, dass RAGE-RNA und AGE-R1-RNA in allen vier Zelllinien vorhanden ist. Die RAW- und MFB-Zelllinien sind im Gegensatz zu HEK- und Jurkat-Zellen reich an AGE-R2-RNA. Die AGE-R3-RNA findet sich lediglich nicht in den Jurkat-Zellen. Der Scavenger Rezeptor II ist am häufigsten bei den RAW-Zellen zu finden, dafür weniger bei den HEK-, Jurkat- und MFB-Zellen. Zusammenfassend kann man sagen, dass die RAW-Zelllinie alle untersuchten Rezeptoren exprimiert, in absteigender Reihenfolge des RNA-Gehalts gefolgt von MFB, HEK und Jurkat.

In der Proteinanalytik zeigt sich ein ähnliches Bild. Die RAW-Zellen weisen als einzige eine starke Expression von RAGE auf. Der AGE-R1 findet sich in hohem Maße in allen Zelllinien. Die AGE-R3-Expression liegt in allen Zellen vor, jedoch bei den MFBs nur in geringem Maße.

Eine Abhängigkeit zwischen dem Rezeptorbesatz und der NF- κ B-Aktivität lässt sich dahingehend vermuten, dass RAW die stärkste Aktivierung des Signalweges hat und gleichzeitig auch die größte Menge an RAGE-RNA und -Protein.

7 Literaturverzeichnis

- Ahmad, Muhammad Saeed; Pischetsrieder, Monika; Ahmed, Nessar (2007): Aged garlic extract and S-allyl cysteine prevent formation of advanced glycation endproducts. In *Eur. J. Pharmacol.* 561 (1-3), pp. 32–38.
- Bartling, Babett; Fuchs, Christine; Somoza, Veronika; Niemann, Bernd; Silber, Rolf-Edgar; Simm, Andreas (2007): Lung level of HMBG1 is elevated in response to advanced glycation end product-enriched food in vivo. In *Mol Nutr Food Res* 51 (4), pp. 479–487.
- Bierhaus, A.; Schiekofer, S.; Schwaninger, M.; Andrassy, M.; Humpert, P. M.; Chen, J. et al. (2001): Diabetes-Associated Sustained Activation of the Transcription Factor Nuclear Factor- κ B. In *Diabetes* 50 (12), pp. 2792–2808.
- Bierhaus, Angelika; Humpert, Per M.; Morcos, Michael; Wendt, Thoralf; Chavakis, Triantafyllos; Arnold, Bernd et al. (2005): Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. In *J. Mol. Med.* 83 (11), pp. 876–886.
- Bolton, W. Kline; Cattran, Daniel C.; Williams, Mark E.; Adler, Sharon G.; Appel, Gerald B.; Cartwright, Kenneth et al. (2004): Randomized trial of an inhibitor of formation of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. In *Am. J. Nephrol.* 24 (1), pp. 32–40.
- Brownlee, M.; Vlassara, H.; Kooney, A.; Ulrich, P.; Cerami, A. (1986): Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. In *Science* 232 (4758), pp. 1629–1632.
- Cai, Weijing; He, John C.; Zhu, Li; Chen, Xue; Zheng, Feng; Striker, Gary E.; Vlassara, Helen (2008): Oral Glycotoxins Determine the Effects of Calorie Restriction on Oxidant Stress, Age-Related Diseases, and Lifespan. In *The American Journal of Pathology* 173 (2), pp. 327–336.
- Cai, Weijing; He, John C.; Zhu, Li; Lu, Changyong; Vlassara, Helen (2006): Advanced glycation end product (AGE) receptor 1 suppresses cell oxidant stress and activation signaling via EGF receptor. In *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (37), pp. 13801–13806.
- Cai, Weijing; He, John Cijiang; Zhu, Li; Chen, Xue; Wallenstein, Sylvan; Striker, Gary E.; Vlassara, Helen (2007): Reduced oxidant stress and extended lifespan in mice exposed to a low glycotoxin diet: association with increased AGER1 expression. In *Am. J. Pathol.* 170 (6), pp. 1893–1902.
- Ceriello, A.; Giugliano, D.; Quatraro, A.; Donzella, C.; Dipalo, G.; Lefebvre, P. J. (1991): Vitamin E reduction of protein glycosylation in diabetes. New prospect for prevention of diabetic complications? In *Diabetes Care* 14 (1), pp. 68–72.
- Chavakis, T.; Bierhaus, A.; Nawroth, P. P. (2004): RAGE (receptor for advanced glycation end products): a central player in the inflammatory response [Microbes Infect. 2004] - PubMed - NCBI. Available online at [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=RAGE+\(receptor+for+advanced+glycation+end+products\)%3A+a+central+player+in+the+inflammatory+response](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=RAGE+(receptor+for+advanced+glycation+end+products)%3A+a+central+player+in+the+inflammatory+response), checked on 19/03/2014.

- Chen, Xuebo; Zhang, Leying; Zhang, Ian Y.; Liang, Junling; Wang, Huaqing; Ouyang, Mao et al. (2014): RAGE Expression in Tumor-Associated Macrophages Promotes Angiogenesis in Glioma. In *Cancer Res.* 74 (24), pp. 7285–7297.
- Dieter, Brad P.; Vella, Chantal A. (2013): A proposed mechanism for exercise attenuated methylglyoxal accumulation: activation of the ARE-Nrf pathway and increased glutathione biosynthesis. In *Med. Hypotheses* 81 (5), pp. 813–815.
- Engelen, L.; Stehouwer, C. D. A.; Schalkwijk, C. G. (2013): Current therapeutic interventions in the glycation pathway: evidence from clinical studies. In *Diabetes Obes Metab* 15 (8), pp. 677–689.
- Fang, Qilu; Deng, Liancheng; Wang, Lintao; Zhang, Yali; Weng, Qiaoyou; Yin, Haimin et al. (2015): Inhibition of MAPKs/NF- κ B-dependent inflammation by a novel chalcone protects kidney from high fat diet-induced injuries in mice. In *J. Pharmacol. Exp. Ther.*
- Feng, R.; Lu, Y.; Bowman, L. L.; Qian, Y.; Castranova, V.; Ding, M. (2005): Inhibition of Activator Protein-1, NF- κ B, and MAPKs and Induction of Phase 2 Detoxifying Enzyme Activity by Chlorogenic Acid. In *Journal of Biological Chemistry* 280 (30), pp. 27888–27895.
- Ferguson, G. P.; Booth, I. R. (1998): Importance of glutathione for growth and survival of *Escherichia coli* cells: detoxification of methylglyoxal and maintenance of intracellular K⁺. In *J. Bacteriol.* 180 (16), pp. 4314–4318.
- Forbes, Josephine M.; Thorpe, Suzanne R.; Thallas-Bonke, Vicki; Pete, Josefa; Thomas, Merlin C.; Deemer, Elizabeth R. et al. (2005): Modulation of soluble receptor for advanced glycation end products by angiotensin-converting enzyme-1 inhibition in diabetic nephropathy. In *J. Am. Soc. Nephrol.* 16 (8), pp. 2363–2372.
- Freedman, B. I.; Wuerth, J. P.; Cartwright, K.; Bain, R. P.; Dippe, S.; Hershon, K. et al. (1999): Design and baseline characteristics for the aminoguanidine Clinical Trial in Overt Type 2 Diabetic Nephropathy (ACTION II). In *Control Clin Trials* 20 (5), pp. 493–510.
- Fukushi, J.-i (2004): NG2 Proteoglycan Promotes Endothelial Cell Motility and Angiogenesis via Engagement of Galectin-3 and α 5 β 1 Integrin. In *Molecular Biology of the Cell* 15 (8), pp. 3580–3590.
- Fullerton, Birgit (2014): Intensive glucose control versus conventional glucose control for type 1 diabetes mellitus. the cochrane collaboration. In *the cochrane Library*.
- Geroldi, Diego; Falcone, Colomba; Emanuele, Enzo (2006a): Soluble receptor for advanced glycation end products: from disease marker to potential therapeutic target. In *Curr. Med. Chem.* 13 (17), pp. 1971–1978.
- Geroldi, Diego; Falcone, Colomba; Minoretti, Piercarlo; Emanuele, Enzo; Arra, Mariarosa; D'Angelo, Angela (2006b): High levels of soluble receptor for advanced glycation end products may be a marker of extreme longevity in humans. In *Journal of the American Geriatrics Society* 54 (7), pp. 1149–1150.

- Ghosh, Sankar; Hayden, Matthew S. (2012): Celebrating 25 years of NF- κ B research. In *Immunological Reviews* 246 (1), pp. 5–13.
- Gil, A.; Bengmark, S. (2007): Advanced glycation and lipoxidation end products--amplifiers of inflammation: the role of food. In *Nutr Hosp* 22 (6), pp. 625–640.
- Gloire, Geoffrey; Legrand-Poels, Sylvie; Piette, Jacques (2006): NF- κ B activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. In *Biochemical Pharmacology* 72 (11), pp. 1493–1505.
- Grimm, Stefanie; Ott, Christiane; Hörlacher, Melanie; Weber, Daniela; Höhn, Annika; Grune, Tilman (2012): Advanced-glycation-end-product-induced formation of immunoproteasomes: involvement of RAGE and Jak2/STAT1. In *Biochem. J.* 448 (1), pp. 127–139.
- Hayden, Matthew S.; Ghosh, Sankar (2004): Signaling to NF-kappaB. In *Genes Dev* 18 (18), pp. 2195–2224.
- He, C. J.; Zheng, F.; Stitt, A.; Striker, L.; Hattori, M.; Vlassara, H. (2000): Differential expression of renal AGE-receptor genes in NOD mice: possible role in nonobese diabetic renal disease. In *Kidney Int.* 58 (5), pp. 1931–1940.
- Hellwig, Michael; Bunzel, Diana; Huch, Melanie; Franz, Charles M. A. P.; Kulling, Sabine E.; Henle, Thomas (2015): Stability of Individual Maillard Reaction Products in the Presence of the Human Colonic Microbiota. In *J. Agric. Food Chem.* 63 (30), pp. 6723–6730.
- Hellwig, Michael; Geissler, Stefanie; Matthes, René; Peto, Anett; Silow, Christoph; Brandsch, Matthias; Henle, Thomas (2011): Transport of Free and Peptide-Bound Glycated Amino Acids: Synthesis, Transepithelial Flux at Caco-2 Cell Monolayers, and Interaction with Apical Membrane Transport Proteins. In *ChemBioChem* 12 (8), pp. 1270–1279.
- Hellwig, Michael; Matthes, René; Peto, Anett; Löbner, Jürgen; Henle, Thomas (2014): N- ϵ -fructosyllysine and N- ϵ -carboxymethyllysine, but not lysinoalanine, are available for absorption after simulated gastrointestinal digestion. In *Amino Acids* 46 (2), pp. 289–299.
- Hirsch, J.; Petrakova, E.; Feather, M. S.; Barnes, C. L. (1995): The reaction of D-glucose with aminoguanidine. In *Carbohydr. Res.* 267 (1), pp. 17–25.
- HODGKINSON, Conrad P.; MANDER, Ann; SALE, Graham J. (2005): Identification of 80K-H as a protein involved in GLUT4 vesicle trafficking. In *Biochem. J.* 388 (3), p. 785.
- Huang, J. S.; Guh, J. Y.; Hung, W. C.; Yang, M. L.; Lai, Y. H.; Chen, H. C.; Chuang, L. Y. (1999): Role of the Janus kinase (JAK)/signal transducers and activators of transcription (STAT) cascade in advanced glycation end-product-induced cellular mitogenesis in NRK-49F cells. In *Biochem. J.* 342 (Pt 1), pp. 231–238.
- Jin, Xian; Yao, Tongqing; Zhou, Zhong'e; Zhu, Jian; Zhang, Song; Hu, Wei; Shen, Chengxing (2015): Advanced Glycation End Products Enhance Macrophages Polarization into M1 Phenotype through Activating RAGE/NF- κ B Pathway. In *BioMed Research International* 2015 (5, article 579), pp. 1–12.

- Kalousová M: Advanced glycation and oxidation products in patients with arterosclerosis. In *Cas Lek Cesk.* 2005. Available online at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kalousova+M%2C+Zak+A%2C+Soukupova+J%2C+Stipek+S%2C+Malbohan+IM%2C+Zima+T.+Advanced+glycation+and+oxidation+products+in+patients+with+atherosclerosis+%5Bin+Czech%5D.+Cas+Lek+Cesk.2005+%3B144%3A385%E2%80%93390.>, checked on 25/03/2014.
- Kiho, Tadashi; Usui, Shigeyuki; Hirano, Kazuyuki; Aizawa, Koichi; Inakuma, Takahiro (2004): Tomato paste fraction inhibiting the formation of advanced glycation end-products. In *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68 (1), pp. 200–205.
- Kislinger, T.; Fu, C.; Huber, B.; Qu, W.; Taguchi, A.; Du Yan, S. et al. (1999): N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. In *J. Biol. Chem.* 274 (44), pp. 31740–31749.
- Kolberg, Marit; Pedersen, Sigrid; Mitake, Maiko; Holm, Kristine Lillebø; Bøhn, Siv Kjølrsrud; Blomhoff, Heidi Kiil et al. (2016): Coffee inhibits nuclear factor-kappa B in prostate cancer cells and xenografts. In *The Journal of Nutritional Biochemistry* 27, pp. 153–163.
- Lander, H. M.; Tauras, J. M.; Ogiste, J. S.; Hori, O.; Moss, R. A.; Schmidt, A. M. (1997): Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. In *J. Biol. Chem.* 272 (28), pp. 17810–17814.
- Lappas, M.; Permezel, M.; Rice, G. E. (2007): Advanced glycation endproducts mediate pro-inflammatory actions in human gestational tissues via nuclear factor- B and extracellular signal-regulated kinase 1/2. In *Journal of Endocrinology* 193 (2), pp. 269–277.
- Ledl, Franz; Schleicher, Erwin (1990): New Aspects of the Maillard Reaction in Foods and in the Human Body. In *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29 (6), pp. 565–594.
- Liang, Yao-Jen; Jian, Jhin-Hao; Liu, Yuan-Chun; Juang, Shiow-Jen; Shyu, Kou-Gi; Lai, Ling-Ping et al. (2010): Advanced glycation end products-induced apoptosis attenuated by PPAR δ activation and epigallocatechin gallate through NF- κ B pathway in human embryonic kidney cells and human mesangial cells. In *Diabetes Metab. Res. Rev.* 26 (5), pp. 406–416.
- Lindenmeier, Michael; Faist, Veronika; Hofmann, Thomas (2002): Structural and functional characterization of pronyl-lysine, a novel protein modification in bread crust melanoidins showing in vitro antioxidative and phase I/II enzyme modulating activity. In *J. Agric. Food Chem.* 50 (24), pp. 6997–7006.
- Liu, Xue-Ping; Pang, Yue-Jiu; Zhu, Wei-Wei; Zhao, Ting-Ting; Zheng, Min; Wang, Yi-Bing et al. (2009): Benazepril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, alleviates renal injury in spontaneously hypertensive rats by inhibiting advanced glycation end-product-mediated pathways. In *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 36 (3), pp. 287–296.

- Lu, Changyong; He, John Cijiang; Cai, Weijing; Liu, Huixian; Zhu, Li; Vlassara, Helen (2004): Advanced glycation endproduct (AGE) receptor 1 is a negative regulator of the inflammatory response to AGE in mesangial cells. In *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (32), pp. 11767–11772.
- Lunceford, Nicole; Gugliucci, Alejandro (2005): *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. In *Fitoterapia* 76 (5), pp. 419–427.
- Marko, D.; Kemény, M.; Bernady, E.; Habermeyer, M.; Weyand, U.; Meiers, S. et al. (2002): Studies on the inhibition of tumor cell growth and microtubule assembly by 3-hydroxy-4-[(E)-(2-furyl)methylidene]methyl-3-cyclopentene-1,2-dione, an intensively coloured Maillard reaction product. In *Food Chem. Toxicol.* 40 (1), pp. 9–18.
- Marko, Doris; Habermeyer, Michael; Kemény, Monika; Weyand, Ulrike; Niederberger, Ellen; Frank, Oliver; Hofmann, Thomas (2003): Maillard reaction products modulating the growth of human tumor cells in vitro. In *Chem. Res. Toxicol.* 16 (1), pp. 48–55.
- Matsumoto, Shigeyuki; Yoshida, Takuya; Murata, Hiroko; Harada, Shusaku; Fujita, Naoko; Nakamura, Shota et al. (2008): Solution structure of the variable-type domain of the receptor for advanced glycation end products: new insight into AGE-RAGE interaction. In *Biochemistry* 47 (47), pp. 12299–12311.
- Medeiros, Marcell Costa de; Frasnelli, Sabrina Cruz Tfaile; Bastos, Alliny de Souza; Orrico, Silvana Regina Perez; Rossa, Carlos (2014): Modulation of cell proliferation, survival and gene expression by RAGE and TLR signaling in cells of the innate and adaptive immune response: role of p38 MAPK and NF-KB. In *J Appl Oral Sci* 22 (3), pp. 185–193.
- Miyahara, Yoshiyuki; Ikeda, Satoshi; Muroya, Takahiro; Yasuoka, Chie; Urata, Yoshishige; Horiuchi, Seikoh et al. (2002): Nε-(Carboxymethyl)lysine induces γ-glutamylcysteine synthetase in RAW264.7 cells. In *Biochemical and Biophysical Research Communications* 296 (1), pp. 32–40.
- Montonen, Jukka; Knekt, Paul; Järvinen, Ritva; Reunanen, Antti (2004): Dietary antioxidant intake and risk of type 2 diabetes. In *Diabetes Care* 27 (2), pp. 362–366.
- Moreira, Paula I.; Smith, Mark A.; Zhu, Xiongwei; Nunomura, Akihiko; Castellani, Rudy J.; Perry, George (2005): Oxidative Stress and Neurodegeneration. In *Annals of the New York Academy of Sciences* 1043 (1), pp. 545–552.
- Munesue, Seiichi; Yamamoto, Yasuhiko; Urushihara, Ryouta; Inomata, Kouhei; Saito, Hidehito; Motoyoshi, So et al. (2013): Low-molecular weight fractions of Japanese soy sauce act as a RAGE antagonist via inhibition of RAGE trafficking to lipid rafts. In *Food Funct.* 4 (12), p. 1835.
- Muscat, Sonja; Pelka, Joana; Hegele, Jörg; Weigle, Bernd; Münch, Gerald; Pischetsrieder, Monika (2007): Coffee and Maillard products activate NF-kappaB in macrophages via H2O2 production. In *Mol Nutr Food Res* 51 (5), pp. 525–535.

- Nakamura, Kazuo; Yamagishi, Sho-ichi; Adachi, Hisashi; Matsui, Takanori; Kurita-Nakamura, Yayoi; Takeuchi, Masayoshi et al. (2008): Serum levels of soluble form of receptor for advanced glycation end products (sRAGE) are positively associated with circulating AGEs and soluble form of VCAM-1 in patients with type 2 diabetes. In *Microvasc. Res.* 76 (1), pp. 52–56.
- Nass, N.; Bartling, B.; Navarrete Santos, A.; Scheubel, R. J.; Börgermann, J.; Silber, R. E.; Simm, A. (2007): Advanced glycation end products, diabetes and ageing. In *Z Gerontol Geriat* 40 (5), pp. 349–356.
- 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 *J. Biol. Chem.* 267 (21), pp. 14998–15004.
- Negrean, Monica; Stirban, Alin; Stratmann, Bernd; Gawlowski, Thomas; Horstmann, Tina; Götting, Christian et al. (2007): Effects of low- and high-advanced glycation endproduct meals on macro- and microvascular endothelial function and oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. In *Am. J. Clin. Nutr.* 85 (5), pp. 1236–1243.
- Ott, Christiane; Jacobs, Kathleen; Haucke, Elisa; Navarrete Santos, Anne; Grune, Tilman; Simm, Andreas (2014): Role of advanced glycation end products in cellular signaling. In *Redox Biol* 2, pp. 411–429.
- Oturai, P. S.; Rasch, R.; Hasselager, E.; Johansen, P. B.; Yokoyama, H.; Thomsen, M. K. et al. (1996): Effects of heparin and aminoguanidine on glomerular basement membrane thickening in diabetic rats. In *APMIS* 104 (4), pp. 259–264.
- Oudes, A. J.; Herr, C. M.; Olsen, Y.; Fleming, J. E. (1998): Age-dependent accumulation of advanced glycation end-products in adult *Drosophila melanogaster*. In *Mech. Ageing Dev.* 100 (3), pp. 221–229.
- Ou, P.; Wolff, S. P. (1993): Aminoguanidine: a drug proposed for prophylaxis in diabetes inhibits catalase and generates hydrogen peroxide in vitro. In *Biochem. Pharmacol.* 46 (7), pp. 1139–1144.
- Parthasarathy, Arumugam; Gopi, Venkatachalam; Devi K M, Shyamala; Balaji, Nagarajan; Vellaichamy, Elangovan (2014): Aminoguanidine inhibits ventricular fibrosis and remodeling process in isoproterenol-induced hypertrophied rat hearts by suppressing ROS and MMPs. In *Life Sci.* 118 (1), pp. 15–26.
- Pöttsch, Sandy; Dalgalarondo, Michele; Bakan, Benedicte; Marion, Didier; Somoza, Veronika; Stangl, Gabriele et al. (2014): The antioxidative effect of bread crust in a mouse macrophage reporter cell line. In *Free Radical Biology and Medicine* 75, pp. S19.
- Poulsen, Malene W.; Hedegaard, Rikke V.; Andersen, Jeanette M.; Courten, Barbora de; Bügel, Susanne; Nielsen, John et al. (2013): Advanced glycation endproducts in food and their effects on health. In *Food and Chemical Toxicology* 60, pp. 10–37.

- Rendell, M.; Nierenberg, J.; Brannan, C.; Valentine, J. L.; Stephen, P. M.; Dodds, S. et al. (1986): Inhibition of glycation of albumin and hemoglobin by acetylation in vitro and in vivo. In *J. Lab. Clin. Med.* 108 (4), pp. 286–293.
- Rojas, Armando; Delgado-López, Fernando; Perez-Castro, Ramón; Gonzalez, Ileana; Romero, Jacqueline; Rojas, Israel et al. (2016): HMGB1 enhances the protumoral activities of M2 macrophages by a RAGE-dependent mechanism. In *Tumor Biol.* 37 (3), pp. 3321–3329.
- Ruhs, Stefanie; Nass, Norbert; Bartling, Babett; Brömme, Hans-Jürgen; Leuner, Beatrice; Somoza, Veronika et al. (2010): Preconditioning with Maillard reaction products improves antioxidant defence leading to increased stress tolerance in cardiac cells. In *Experimental Gerontology* 45 (10), pp. 752–762.
- Ruhs, Stefanie; Nass, Norbert; Somoza, Veronika; Friess, Ulrich; Schinzel, Reinhard; Silber, Rolf-Edgar; Simm, Andreas (2007): Maillard reaction products enriched food extract reduce the expression of myofibroblast phenotype markers. In *Mol Nutr Food Res* 51 (4), pp. 488–495.
- Sauer, Tanja; Raithel, Martin; Kressel, Jürgen; Muscat, Sonja; Münch, Gerald; Pischetsrieder, Monika (2011): Nuclear translocation of NF- κ B in intact human gut tissue upon stimulation with coffee and roasting products. In *Food Funct.* 2 (9), p. 529.
- Schmidt, A. M.; Vianna, M.; Gerlach, M.; Brett, J.; Ryan, J.; Kao, J. et al. (1992): Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. In *J. Biol. Chem.* 267 (21), pp. 14987–14997.
- Schmidt, A. M.; Yan, S. D.; Yan, S. F.; Stern, D. M. (2001): The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. In *J. Clin. Invest.* 108 (7), pp. 949–955.
- Sebeková, K.; Krajcovicová-Kudlácková, M.; Schinzel, R.; Faist, V.; Klvanová, J.; Heidland, A. (2001): Plasma levels of advanced glycation end products in healthy, long-term vegetarians and subjects on a western mixed diet. In *Eur J Nutr* 40 (6), pp. 275–281.
- Sekhar, R. V.; McKay, S. V.; Patel, S. G.; Guthikonda, A. P.; Reddy, V. T.; Balasubramanyam, A.; Jahoor, F. (2010): Glutathione Synthesis Is Diminished in Patients With Uncontrolled Diabetes and Restored by Dietary Supplementation With Cysteine and Glycine. In *Diabetes Care* 34 (1), pp. 162–167.
- Semba, R. D.; Ang, A.; Talegawkar, S.; Crasto, C.; Dalal, M.; Jardack, P. et al. (2011): Dietary intake associated with serum versus urinary carboxymethyl-lysine, a major advanced glycation end product, in adults: the Energetics Study. In *Eur J Clin Nutr* 66 (1), pp. 3–9.
- Semba, Richard D.; Bandinelli, Stefania; Sun, Kai; Guralnik, Jack M.; Ferrucci, Luigi (2009): Plasma Carboxymethyl-Lysine, an Advanced Glycation End Product, and All-Cause and Cardiovascular Disease Mortality in Older Community-Dwelling Adults. In *Journal of the American Geriatrics Society* 57 (10), pp. 1874–1880.

- Semba, Richard D.; Gebauer, Sarah K.; Baer, David J.; Sun, Kai; Turner, Randi; Silber, Harry A. et al. (2014): Dietary intake of advanced glycation end products did not affect endothelial function and inflammation in healthy adults in a randomized controlled trial. In *J. Nutr.* 144 (7), pp. 1037–1042.
- Serban, Andreea; Stanca, Loredana; Geicu, Ovidiu; Dinischiotu, Anca (2015): AGEs-Induced IL-6 Synthesis Precedes RAGE Up-Regulation in HEK 293 Cells: An Alternative Inflammatory Mechanism? In *IJMS* 16 (9), pp. 20100–20117.
- Shanmugam, N. (2003): Regulation of Cyclooxygenase-2 Expression in Monocytes by Ligation of the Receptor for Advanced Glycation End Products. In *Journal of Biological Chemistry* 278 (37), pp. 34834–34844.
- Shimizu, M.; Kobayashi, Y.; Suzuki, M.; Satsu, H.; Miyamoto, Y. (2000): Regulation of intestinal glucose transport by tea catechins. In *Biofactors* 13 (1-4), pp. 61–65.
- Singh, R.; Barden, A.; Mori, T.; Beilin, L. (2001): Advanced glycation end-products: a review. In *Diabetologia* 44 (2), pp. 129–146.
- 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 *Biochem. J.* 322 (Pt 2), pp. 567–573.
- Somoza, Veronika; Lindenmeier, Michael; Hofmann, Thomas; Frank, Oliver; Erbersdobler, Helmut F.; Baynes, John W. et al. (2005a): Dietary bread crust advanced glycation end products bind to the receptor for AGEs in HEK-293 kidney cells but are rapidly excreted after oral administration to healthy and subtotaly nephrectomized rats. In *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1043, pp. 492–500.
- Somoza, Veronika; Wenzel, Elisabeth; Lindenmeier, Michael; Grothe, Dörthe; Erbersdobler, Helmut F.; Hofmann, Thomas (2005b): Influence of feeding malt, bread crust, and a pronylated protein on the activity of chemopreventive enzymes and antioxidative defense parameters in vivo. In *J. Agric. Food Chem.* 53 (21), pp. 8176–8182.
- Somoza, Veronika; Wenzel, Elisabeth; Weiß, Carola; Clawin-Rädecker, Ingrid; Grübel, Nadine; Erbersdobler, Helmut F. (2006): Dose-dependent utilisation of casein-linked lysinoalanine, N(epsilon)-fructoselysine and N(epsilon)-carboxymethyllysine in rats. In *Mol. Nutr. Food Res.* 50 (9), pp. 833–841.
- Stitt, Alan W. (2005): The Maillard Reaction in Eye Diseases. In *Annals of the New York Academy of Sciences* 1043 (1), pp. 582–597.
- Theodore Koschinski (1997): Orally absorbed reactive glycationproducts (glycotoxins): An environmental risk factor in diabetic nephropathy. Available online at [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=11.+Koschinsky+T%2C+He+CJ%2C+Mitsuhashi+T%2C+Bucala+R%2C+Liu+C%2C+Buenting+C%2C+Heitmann+K%2C+Vlassara+H+\(1997\)+Orally+absorbed+reactive+glycation+products+\(glycotoxins\)%3A+an+environmental+risk+facto](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=11.+Koschinsky+T%2C+He+CJ%2C+Mitsuhashi+T%2C+Bucala+R%2C+Liu+C%2C+Buenting+C%2C+Heitmann+K%2C+Vlassara+H+(1997)+Orally+absorbed+reactive+glycation+products+(glycotoxins)%3A+an+environmental+risk+facto)

r+in+diabetic+nephropathy.+Proc+Natl+Acad+Sci+USA+94%3A6474%E2%80%936479,
checked on 23/03/2014.

- Thomas, Merlin C.; Woodward, Mark; Neal, Bruce; Li, Qiang; Pickering, Raelene; Marre, Michel et al. (2015): The Relationship Between Levels of Advanced Glycation End-Products and Their Soluble Receptor and Adverse Outcomes in Adults With Type 2 Diabetes. In *Diabetes Care*.
- Torreggiani, Massimo; Liu, Huixian; Wu, Jin; Zheng, Feng; CAI, WEIJING; Striker, Gary; Vlassara, Helen (2009): Advanced glycation end product receptor-1 transgenic mice are resistant to inflammation, oxidative stress, and post-injury intimal hyperplasia. In *Am J Pathol* 175 (4), pp. 1722–1732.
- Uribarri, J.; Tuttle, K. R. (2006): Advanced Glycation End Products and Nephrotoxicity of High-Protein Diets. In *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 1 (6), pp. 1293–1299.
- Uribarri, Jaime; Cai, Weijing; Peppas, Melpomeni; Goodman, Susan; Ferrucci, Luigi; Striker, Gary; Vlassara, Helen (2007): Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation endproducts: two links to inflammatory response, oxidative stress, and aging. In *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 62 (4), pp. 427–433.
- Uribarri, Jaime; Woodruff, Sandra; Goodman, Susan; CAI, WEIJING; Chen, Xue; Pyzik, Renata 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), pp. 911–916.e12.
- van Nguyen, Chuyen (2006): Toxicity of the AGEs generated from the Maillard reaction: On the relationship of food-AGEs and biological-AGEs. In *Mol. Nutr. Food Res.* 50 (12), pp. 1140–1149.
- Vinson, Joe A.; Zhang, Juan (2005): Black and green teas equally inhibit diabetic cataracts in a streptozotocin-induced rat model of diabetes. In *J. Agric. Food Chem.* 53 (9), pp. 3710–3713.
- Vlassara, H.; Cai, W.; Crandall, J.; Goldberg, T.; Oberstein, R.; Dardaine, V. et al. (2002): Nonlinear partial differential equations and applications: Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. In *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (24), pp. 15596–15601.
- Vlassara, H.; Li, Y. M.; Imani, F.; Wojciechowicz, D.; Yang, Z.; Liu, F. T.; Cerami, A. (1995): Identification of galectin-3 as a high-affinity binding protein for advanced glycation end products (AGE): a new member of the AGE-receptor complex. In *Mol. Med.* 1 (6), pp. 634–646.
- Vlassara, Helen; Cai, Weijing; Goodman, Susan; Pyzik, Renata; Yong, Angie; Chen, Xue et al. (2009): Protection against loss of innate defenses in adulthood by low advanced glycation end products (AGE) intake: role of the antiinflammatory AGE receptor-1. In *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94 (11), pp. 4483–4491.
- Wang, Xin; Diao, Yanpeng; Zhang, Hongwei; Huo, Xin; Zhang, Qiang (2009): The role of RAGE in aminoguanidine-induced suppression of venous intimal hyperplasia in diabetic rats. In *Ann Vasc Surg* 23 (2), pp. 246–254.

- Wautier, M. P.; Chappey, O.; Corda, S.; Stern, D. M.; Schmidt, A. M.; Wautier, J. L. (2001): Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. In *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280 (5), pp. E685-94.
- Wühr, Andrea; Deckert, Melanie; Pischetsrieder, Monika (2010): Identification of aminoreductones as active components in Maillard reaction mixtures inducing nuclear NF- κ B translocation in macrophages. In *Mol. Nutr. Food Res.* 54 (7), pp. 1021–1030.
- Xu, Renfan; Zhang, Shasha; Tao, Anyu; Chen, Guangzhi; Zhang, Muxun (2014): Influence of vitamin E supplementation on glycaemic control: a meta-analysis of randomised controlled trials. In *PLoS ONE* 9 (4), pp. e95008.
- Yamagishi, Sho-ichi; Matsui, Takanori; Nakamura, Kazuo; Inoue, Hiroyoshi; Takeuchi, Masayoshi; Ueda, Seiji et al. (2008): Olmesartan blocks advanced glycation end products (AGEs)-induced angiogenesis in vitro by suppressing receptor for AGEs (RAGE) expression. In *Microvasc. Res.* 75 (1), pp. 130–134.
- Yonekura, Hideto; Yamamoto, Yasuhiko; Sakurai, Shigeru; Petrova, Ralica G.; Abedin, Md Joynal; Li, Hui et al. (2003): Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. In *Biochem. J.* 370 (Pt 3), pp. 1097–1109.
- Zhang, M. (2006): Glycated Proteins Stimulate Reactive Oxygen Species Production in Cardiac Myocytes: Involvement of Nox2 (gp91phox)-Containing NADPH Oxidase. In *Circulation* 113 (9), pp. 1235–1243.
- Zill, Holger; Bek, Stephan; Hofmann, Thomas; Huber, Jochen; Frank, Oliver; Lindenmeier, Michael et al. (2003): RAGE-mediated MAPK activation by food-derived AGE and non-AGE products. In *Biochemical and Biophysical Research Communications* 300 (2), pp. 311–315.
- Zill, Holger; Günther, Rainer; Erbersdobler, Helmut F.; Fölsch, Ulrich R.; Faist, Veronika (2001): RAGE Expression and AGE-Induced MAP Kinase Activation in Caco-2 Cells. In *Biochemical and Biophysical Research Communications* 288 (5), pp. 1108–1111.
- Zhong, Yadong; Teixeira, Cristina; Marungruang, Nittaya; Sae-Lim, Watina; Tareke, Eden; Andersson, Roger et al. (2015): Barley malt increases hindgut and portal butyric acid, modulates gene expression of gut tight junction proteins and Toll-like receptors in rats fed high-fat diets, but high advanced glycation end-products partially attenuate the effects. In *Food Funct* 6 (9), pp. 3165–3176.

8 Thesen

1. Das Brotkrustenextrakt (BCE) aktiviert als AGE-reiches Lebensmittelextrakt den NF- κ B-Signalweg unter anderem über den Rezeptor für AGEs (RAGE).
2. Die unter Nutzung der HPLC isolierten Fraktionen besitzen bekannte AGEs, wie Pentosidin, CML und Imidazolol, sodass man auch die einzelnen Fraktionen als AGE-reich ansehen kann.
3. Die einzelnen Fraktionen (zehn, zwölf und dreizehn) stimulieren den NF- κ B-Signalweg, indem die beinhalteten AGEs an AGE-Rezeptoren binden und im Zellinneren unter anderem die MAP-Kinase aktivieren.
4. Die Zelllinien HEK, Jurcat, RAW und MFB exprimieren mRNA der AGE-Rezeptoren RAGE, AGE-R1 und AGE-R3 in vergleichbaren Ausmaßen wie den Oberflächenbesatz der jeweiligen Rezeptoren.
5. Die Auswertung der Ergebnisse lässt vermuten, dass eine lineare Abhängigkeit von dem AGE-Gehalt der Fraktionen (gemessen anhand der AGE-spezifischen Floreszenzen) zu der NF- κ B-Aktivität besteht.
6. Die Aktivität von NF- κ B ist abhängig vom RAGE-Oberflächenbesatz, da die RAW-Zelllinie sowohl den Oberflächenrezeptor RAGE qualitativ deutlich häufiger besitzt, als auch die höchste NF- κ B-Aktivität, im Sinne der relative Expression des SEAP, hervorgerufen durch eine Stimulation mit AGE-reicher Lebensmittelextrakte im Vergleich zur Negativkontrolle vorweist.

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Entstehung von AGEs entnommen aus (Uribarri, Tuttle 2006)..... | 1 |
| Abbildung 2: NF- κ B Signalweg und zusätzliche RAGE-Signalkaskaden (Ausschnitt) | 9 |
| Abbildung 3: A: 280/360 Chromatogramm der HPLC, Injektion 10 μ l der 1:2 Verdünnung BCE, Sammeln von 15 Fraktionen über 20 min, B: 360/440..... | 20 |
| Abbildung 4: FACS-Data-plot, Jurkat, A: Seitwärtsstreuung abhängig von Vorwärts-streuung, R1 entspricht allen Jurkatzellen. B: Versuch mit unstimulierten Zellen. C: Versuch mit Stimulation mit 100 ng/ml TNF- α | 26 |
| Abbildung 5: Proteinbestimmung der Fraktionen 1-15 zur Darstellung der Proteinkonzentration in mg/ml mittels Nanodrop (Absorptionseinheiten bei λ =280 nm) und Micro BCA-Kit (Standardreihe) | 33 |
| Abbildung 6: Fluoreszenzbestimmung der Fraktionen 1-15 | 34 |
| Abbildung 7: Stimulation RAW-Zelllinie mit 5% der jeweiligen Fraktion, Inkubation 24 h..... | 35 |
| Abbildung 8: Spot-Blot-Analyse. Darstellung der AGEs Arg-Pyrimidin, Imidazolone, CML, Pentosidin in den Fraktionen 10, 12 und 13 | 35 |
| Abbildung 9: Fluoreszenzmikroskopie, HEK-Zelllinie, oben natives Bild, unten Expressierung von GFP unter Anregung bei 475 nm, (A) unstimuliert, (B) negativ Kontrolle: BSA, (C) positiv Kontrolle: 100 ng/ml TNF- α | 36 |
| Abbildung 10: HEK-Zelllinie, FACS Boxplot: Ig10 (GFP-Fluo) in Abhängigkeit von den Stimulanzen mit * $p < 0,05$ oder ** $p < 0,01$ | 37 |
| Abbildung 11: HEK-Zellen, Western-Blot Analyse der Expression der p44/42 MAPK- und GAPDH-Proteine bei Stimulation mit den Fraktionen 10, 12 und 13 (je 5%), TNF- α , LPS und BCE | 38 |
| Abbildung 12: Jurkat- Zelllinie, GFP-produzierende Zellen in Prozent in Abhängigkeit der stimulierenden TNF- α -Konzentration in logarithmischer Form..... | 39 |
| Abbildung 13: Jurkat-Zelllinie, Boxplot: Ig (GFP-Expression) bei Stimulation mit Fraktionen 10, 12 und 13 mit je 5% oder 20%, * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ | 40 |
| Abbildung 14: Jurkat-Zelllinie, Western-Blot-Analyse: Stimulation mit den Fraktionen 10, 12 und 13, TNF, LPS und BCE | 41 |
| Abbildung 15: RAW-Zelllinie, Analyse der Expression von SEAP Protein (log10) in Abhängigkeit zu logarithmischen Konzentration von LPS | 42 |
| Abbildung 16: RAW-Zelllinie, Expression der SEAP bei Stimulation mit BCE (5, 10 und 20 mg/ml) und der Fraktionen 10, 12 und 13 | 43 |
| Abbildung 17: RAW-Zelllinie, Western-Blot-Analyse der pERK-Stimulation mit den Fraktionen 10, 12 und 13, TNF, LPS und BCE | 43 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 18: MFB, Western-Blot-Analyse der pERK-Expression bei Stimulation mit den Fraktionen 10, 12 und 13, TNF, LPS, BCE..... | 44 |
| Abbildung 19: Proteinexpression der Rezeptoren RAGE, AGE-R1 und AGE-R3 detektiert mittels Western-Blot in den Zelllinien HEK, Jurkat, MFB und RAW..... | 45 |
| Abbildung 20: Analyse des AGE-Gehalts und der NF- κ B-Aktivität der Zelllinien HEK, Jurkat und RAW..... | 46 |
| Abbildung 21: Abhängigkeit der NF- κ B- Aktivität zum RAGE-RNA-Gehalt der verschiedenen Zelllinien unter Stimulation von 5mg/ml BCE..... | 47 |
| Abbildung 22: NF- κ B-Aktivität unter Stimulation mit den Fraktionen und BCE, Rezeptor-RNA Vergleich der Zelllinien..... | 48 |
| Abbildung 23: Möglichkeiten der Reduktion AGEs..... | 55 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: alphabetische Auflistung der Hersteller der allgemeinen Chemikalien | 11 |
| Tabelle 2: alphabetische Auflistung der Hersteller der speziellen Chemikalien und Kits | 11 |
| Tabelle 3: Primerpaare mit DNA-Sequenzen, Genbanknummer, Basenpaaranzahl, Annealingtemperatur in °C und Anzahl der Zyklen | 13 |
| Tabelle 4: Rezepte der Puffer und Lösungen | 14 |
| Tabelle 5: alphabetische Auflistung der Hersteller der Zellkulturchemikalien..... | 15 |
| Tabelle 6: Hersteller der Zelllinien | 15 |
| Tabelle 7: alphabetische Auflistung der Hersteller der Materialien..... | 16 |
| Tabelle 8: alphabetische Auflistung der Hersteller der Geräte | 17 |
| Tabelle 9: Hersteller der Auswert-Software..... | 19 |
| Tabelle 10: Kultivierung und Passagieren der Zellen | 22 |
| Tabelle 11: Kultivierungsbedingungen der Zelltypen..... | 24 |
| Tabelle 12: ELISA, Paarung der primären und sekundären Antikörper mit Auflistung der Verdünnung und Lagerung | 29 |
| Tabelle 13: Reinheit der RNA-Lösungen..... | 30 |
| Tabelle 14: RNA der Rezeptoren RAGE, AGE-R1, AGE-R2, AGE-R3 und Scavenger Rezeptor II der Zelllinien HEK, Jurkat, RAW, MFB | 45 |
| Tabelle 15: Analyse der NF κ B-Aktivierung in der Literatur. (Bierhaus et al. 2001; Cai et al. 2006; Kislinger et al. 1999; Lander et al. 1997; Lappas et al. 2007; Marko et al. 2003; Medeiros et al. 2014; Miyahara et al. 2002; Muscat et al. 2007; Ruhs et al. 2007; Sauer et al. 2011) | 52 |

Veröffentlichung

Während der vorgelegten Dissertation entstand folgende Publikation

Angenommen Publikation

Pöttsch, S.; Blankenhorn, A.; Navarrete Santos, A.; Silber, R.-E; Somoza, V.; Simm, A. (2013):
The effect of an AGE-rich dietary extract on the activation of NF- κ B depends on the cell model used. In *Food Funct.* 4, pp. 1023-1031.

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Analyse der biologischen Aktivität von Komponenten Advanced Glycation Endproducts-reicher
Lebensmittelextrakte“

selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Name, Vorname: Lattauschke, Anne

Datum: 27.10.2016

Unterschrift: _____

Tabellarischer Lebenslauf

| | |
|---------------------|--|
| Name | Anne Lattauschke, geb. Blankenhorn |
| Geburtsdatum | 04.02.1990 |
| Geburtsort | Dresden |
| Staatsangehörigkeit | Deutsch |
| Eltern | Petra Gabrielle Blankenhorn, geb. Drömer Falk Uwe Blankenhorn |
| Email | a.blankenhorn@aol.com |

Schulbildung

| | |
|-----------|---|
| 1996-1998 | 19. Grundschule in Dresden |
| 1998-2000 | Grundschule in Oberhermsdorf |
| 2000-2008 | Kreisgymnasium Freital (Im Jahr 2007 ungenannt in Weißeritzgymnasium) |
| Juni 2008 | Allgemeine Hochschulreife |

Studium

| | |
|------------|--|
| 2008-2014 | Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle- Wittenberg |
| 18.11.2014 | Staatsexamen Humanmedizin |

Berufstätigkeit

| | |
|------------------|---|
| Seit Januar 2015 | Assistenzärztin am BG-Klinikum Bergmannstrost Halle |
|------------------|---|

Halle (Saale), den 27.10.2016

Danksagung

Zunächst möchte ich mich an dieser Stelle bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt und motiviert haben.

Ganz besonders gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Simm, der meine Arbeit und somit auch mich betreut hat. Sie gaben mir durch kritisches Hinterfragen wertvolle Hinweise für meine Entwicklung als Doktorandin. Auch hatten sie Geduld mit der noch unerfahrenen Medizinstudentin, die ich am Anfang dieser Arbeit war. Sie haben mich von Anfang an motiviert und unterstützt. Und ich bin dankbar dafür, dass sie mir die Möglichkeit gegeben haben, bei ihnen zu forschen und diese Arbeit zu schreiben.

Auch bei meinen Mitstreitern bestehend aus weiteren Doktoranden, medizinisch-technischen Assistenten und wissenschaftlichen Mitarbeitern aus dem Forschungslabor der Klinik für Herzchirurgie des Universitätsklinikums Halle (Saale) möchte ich mich bedanken, vor allem bei Sandy Pötzsch, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. In diesem Team hat es Spaß gemacht zu forschen.

Daneben gilt mein Dank auch Sebastian Lattauschke, welcher zahlreiche Stunden Korrektur gelesen hat. Er wies mich auf Schwächen hin und konnte mir als Fachfremder zeigen, wo noch Erklärungsbedarf bestand.