

Metabolische Veränderungen und Zelltod in neuronalen Zellen
durch “Advanced Glycation Endproducts“ -
Implikationen für die Pathogenese der Alzheimer’schen Demenz

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Claudia Loske

aus

Marl

Würzburg 2000

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Zusammenfassung.....	1
Summary.....	3
1. Einleitung.....	5
2. Material und Methoden	
2.1. Material.....	16
2.2. Methoden.	
1. Herstellung von AGEs.....	18
2. Dünnschichtchromatographie zum Nachweis von Sacchariden.....	19
3. Endotoxin-Test.....	19
4. Entfernen von Endotoxin mit Polymyxin B.....	19
5. Proteinbestimmung.....	20
6. Fluoreszenzmessungen.....	20
7. Messung der Radikalproduktion von AGEs durch Reduktion von Cytchrom c.....	21
8. Bestimmung des CML Gehalts von AGEs durch kompetitiven ELISA.....	21
9. Inkubation von β A4 mit Zuckern und Übergangsmetall-ionen.....	21
10. Einbau von [^{14}C]-Zuckern in β A4.....	22
11. Nachweis von β A4-AGE und Größenbestimmung von β A4-Oligomeren durch FPLC.....	22
12. Zellkultur	
12.1. Herstellung von Zellkulturmedium.....	22
12.2. Zelllinien.....	23
12.3. allgemeine Zellkulturtechniken.....	23
12.4. Bestimmung der Zellzahl.....	23
12.5. Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	24
13. Zytotoxizitätstests	
13.1. MTT-Assay.....	24
13.2. LDH-Assay.....	25
13.3. Neutralrot-Assay.....	25
14. Glukose-Bestimmung mittels GOD-PAP-Methode.....	26
15. Laktatbestimmung.....	26
16. Glutathionbestimmung.....	27
17. ATP-Messung.....	27

18. Nachweis Thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen.....	28
19. Gelretardationsexperimente (EMSA)	
19.1. Herstellung von Kernextrakten.....	29
19.2. Bindungsreaktion.....	29
19.3. Konkurrenzexperimente.....	30
19.4. Markierung der Sonde.....	31
20. RNA-Isolation mit Trizol-Reagenz.....	31
20.1 DNase-Verdau.....	32
21. RT-PCR.....	32
22. SDS-PAGE.	33
23. Westernblot.....	36
24. Digitoninlyse von Zellen zum Nachweis von Cyt c.....	37
25. FACS-Färbungen.....	37
26. sonstige Puffer und Lösungen.....	38
2.3. Geräte.....	39
2.4. Software.....	39
3. Ergebnisse	
1. Einfluss von AGEs auf die Vernetzung von β A4	
1.1. Vernetzung und Glykierung von β A4.....	40
1.2. Abhängigkeit der β A4-Vernetzung vom Inkubationspuffer.....	41
1.3. Untersuchungen zu Reaktionsmechanismus und -Kinetik der β A4-Vernetzung durch Einbau von [14 C]-Zuckern.....	42
1.4. Beschleunigung der Amyloidvernetzung durch Übergangsmetalle.....	43
1.5. Auftrennung der β A4-Aggregate über FPLC.....	45
1.6. Inhibition der Peptidvernetzung durch Metallchelatoren und Antioxidantien.....	46
2. Zytotoxizität von "Advanced Glycation Endproducts"	
2.1. Herstellung und Charakterisierung verschiedener Protein-AGEs.....	48
2.2. Direkte Toxizität von AGEs.....	51
2.2.1. Toxizität von BSA- und Ovalbumin-AGEs.....	51
2.2.2. Dosis-Zeit-Abhängigkeit der Toxizität.....	53
2.2.3. Zeitverlauf der AGE-Bildung.....	54
2.2.4. Toxizität von β A4(1-40) und β A4-AGE.....	55
2.3. Abschwächung der AGE-Toxizität.....	57
2.3.1. Antioxidantien, Radikalfänger und Stoffwechselintermediate.....	58
2.3.2. Abschwächung der Toxizität von β A4 und β A4-AGE durch α -Liponsäure.....	62
2.3.3. Zytoprotektion durch Blockieren von RAGE.....	63
2.3.2.1. Nachweis von RAGE (receptor of AGEs) in SH-SY5Y Zellen.....	63

2.3.3.2. Abschwächung der AGE-Toxizität durch Inkubation der Zellen mit RAGE-antisense-Oligos.....	66
2.3.3.3. Abschwächung der AGE-Toxizität durch RAGE-Antikörper.....	67
2.3.3.4. Kombination von Antioxidantien und RAGE-Antikörpern.....	68
2.4. Toxizität von Methylglyoxal.....	70
2.4.1. Protektion gegen Methylglyoxal-vermittelte Toxizität.....	71
3. Aktivierung von NFκB durch AGEs.....	73
4. Nachweis von TBARS in AGE-gestressten Zellen.....	75
4.1. Verringerung der Bildung von TBARS durch Antioxidantien und andere Substanzen.....	76
5.1. Glutathiongehalt von Zellen unter AGE-Stress.....	77
5.2. Veränderungen im Glutathionspiegel BSA-AGE gestresster Zellen.....	77
5.3. Veränderungen des Thiolstatus durch βA4 und βA4-AGE.....	80
5.4. Wiederherstellung des Thiolstatus durch Antioxidantien.....	80
6. Untersuchungen zur Art des AGE-vermittelten Zelltods.....	81
6.1. Annexin-Fluorescein-Färbungen.....	82
6.2. Freisetzung von Cytochrom c ins Zytoplasma.....	85
6.3. Spaltung von PARP.....	86
7. Untersuchungen zum Energiestatus AGE-behandelter Zellen	
7.1. ATP-Gehalt AGE-gestresster Zellen.....	88
7.1.1. ATP-Depletion durch BSA-AGE.....	88
7.1.2. ATP-Depletion durch βA4 und βA4-AGE	89
7.2. Änderungen im Glukoseverbrauch durch AGE-Stress	
7.2.1. Effekt von BSA-AGE.....	90
7.2.2. Effekt von βA4 und βA4-AGE.....	91
7.3. Laktatausschüttung unter AGE-Stress	
7.3.1. Effekt von BSA-AGE.....	92
7.3.2. Effekt von βA4 und βA4-AGE.....	93
7.4. Abschwächung der ATP-Depletion und Normalisierung der Glukoseaufnahme und Laktatausschüttung	
7.4.1. Effekt von (R+) α-Liponsäure und 17β-Estradiol.....	94
7.4.1.2. Andere Antioxidantien und Pyruvat.....	95
7.4.2. Normalisierung der Glukoseaufnahme.....	95
7.4.3. Normalisierung der Laktatausschüttung.....	96
8. Überblick.	97
4. Diskussion.....	99
5. Literatur.....	117
6. Anhang	
Abkürzungen.....	129

Formeln.....	131
Publikationsliste.....	132