

Zusammenfassung

Advanced Glycation Endproducts, sogenannte "AGEs", entstehen aus nicht-enzymatisch glykierten Proteinen. Durch eine Folge von Dehydratations-, Kondensations- und Oxidations-schritten entsteht ein heterogenes Gemisch aus farbigen, fluoreszierenden Ringverbindungen. AGE-modifizierte Proteine sind unlöslich und proteaseresistent, bei ihrer Bildung entstehen freie Radikale und andere reaktive Intermediate. Von der AGE-Bildung betroffen sind insbesondere langlebige Proteine mit geringem Umsatz wie Kollagen und Kristallin, auch pathologische Proteinablagerungen, z.B. in der Alzheimer'schen Demenz (AD) sind glykiert. Die Akkumulation von AGEs spielt in der Pathogenese von Komplikationen des Diabetes und der Hämodialyse eine Rolle, für die AD wird eine Beteiligung von AGEs am Krankheitsverlauf diskutiert.

Die Alzheimer'sche Demenz ist gekennzeichnet durch den histologischen Nachweis seniler Plaques und neurofibrillärer Bündel in Hirngewebe der Patienten. Auf Ebene des Stoffwechsels kommt es zu einer Verringerung des zerebralen Glukoseumsatzes, es finden sich Marker sowohl für eine Akutphasenreaktion als auch für oxidativen Stress.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die AGE-Bildung *in vitro* die Aggregation von β A4, dem Hauptbestandteil der senilen Plaques in der AD, beschleunigt. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist dabei die Glykierung des β A4-Monomers. Durch die Zugabe von Übergangsmetall-ionen konnte die Vernetzung weiter beschleunigt werden. Dies deutet darauf hin, dass AGEs zur Bildung seniler Plaques in der AD beitragen, zumal in der AD redox-aktive Eisenionen mit den Plaques assoziiert sind.

Mit Hilfe redox-inaktiver Metallchelatoren, mit Antioxidantien oder mit Substanzen, welche die zur Vernetzung notwendigen Aminogruppen abblocken, liess sich die Aggregation von β A4 verlangsamen oder verhindern.

AGEs wirken zytotoxisch auf BHK 21 Fibroblasten und humane SH-SY5Y Neuroblastoma Zellen. Es kommt sowohl zur Inhibition mitochondrialer Enzyme als auch zu Membranschäden. Die Toxizität unterschiedlicher Modell-AGEs ist abhängig von verschiedenen Faktoren, u.a. von dem zur Herstellung verwendeten Protein und vom Zucker. Die LD₅₀ der Modell-AGEs (zwischen 110 μ M und 160 μ M für BSA-AGE) korreliert dabei mit dem AGE-Gehalt (bestimmt als OD_{360nm}/mg Protein) und der Radikalproduktion der Präparationen *in vitro*.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die AGE-Toxizität hauptsächlich radikalvermittelt ist. Oxidativer Stress liess sich in AGE-behandelten Zellen durch die Bildung intrazellulärer Lipidperoxidationsprodukte nachweisen. Auf Ebene der Signaltransduktion

konnte durch Gelretardationsexperimente die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NfκB als Zeichen der Stressabwehr nachgewiesen werden.

Die Gabe von Antioxidantien vor oder gleichzeitig mit den AGEs verhinderte bzw. verringerte den Zelltod. Auch der Rezeptor für AGEs (RAGE) spielt eine Rolle bei der AGE-Toxizität, da das Überleben der Zellen auch durch Blockieren des Rezeptors mit spezifischen Antikörpern gesteigert werden konnte. Als optimal erwies sich die Kombination von Antioxidantien und RAGE-Antikörper.

Der Toxizität von Methylglyoxal, einem reaktiven Intermediat der AGE-Bildung, liegt offenbar ein anderes Wirkprinzip zu Grunde, da die Zellen durch Antioxidansgabe kaum geschützt werden konnten. Lediglich das Abblocken der reaktiven Carbonylgruppen des Methylglyoxals führte zu einer wesentlichen Erhöhung des Prozentsatzes vitaler Zellen.

Durch AGEs ausgelöster Stress führte in Neuroblastoma Zellen bereits in Konzentrationen unterhalb der LD₅₀ zu Störungen im Redoxstatus, es kam zur Depletion von GSH und zu Verschiebungen im Verhältnis von reduziertem Glutathion zu Glutathiondisulfid. Damit einher gingen Veränderungen im Energiestoffwechsel der Zelle, nach nur anfänglich erhöhter Glukoseaufnahme kam es im weiteren Verlauf der Inkubation zu einer Verringerung der Aufnahme von Glukose aus dem Medium, gefolgt von einer Zunahme der Laktatausschüttung um den Faktor drei. Ausserdem wurde eine Depletion von ATP um bis zu 50% nachgewiesen. Antioxidantien konnten die Störungen im Metabolismus der Zellen verhindern oder abschwächen, die meisten der getesteten Substanzen konnten Redoxstatus und ATP-Gehalt der Zellen zu normalisieren. Als wirksamste Substanz erwies sich dabei R(+) α-Liponsäure.

Obwohl sich in AGE-gestressten Zellkulturen durch Annexin-Fluorescein-Markierung ein geringfügig erhöhter Prozentsatz apoptotischer Zellen nachweisen ließ und AGEs auch die Freisetzung von Cytochrom c als proapoptotisches Signal ins Cytoplasma induzieren, konnte eine Aktivierung der Capase-3 nicht nachgewiesen werden. Der durch AGEs ausgelöste Zelltod verläuft offenbar insgesamt nekrotisch. Darauf deutet auch die ATP-Depletion hin.

Sowohl durch Radikalproduktion als auch über rezeptorvermittelte Signalwege verursachen AGEs oxidativen Stress. AGEs induzieren Veränderungen im Metabolismus der Zelle, dies führt u. a. dazu, dass für die antioxidativen Schutzmechanismen der Zelle nicht mehr genügend Energie zur Verfügung steht. AGE-Stress trägt damit in einer selbstverstärkenden Reaktionskaskade zur Neurodegeneration bei und kann so an der Pathogenese der AD beteiligt sein. Antioxidantien und auch AGE-Inhibitoren könnten einen interessanten Ansatz zur Entwicklung alternativer Therapien in der AD darstellen.