

# 1. Einleitung

## Chemie der AGEs

Mit Louis Camille Maillard beschrieb erstmals 1912 ein Chemiker die Bildung von braunefärbten, aromatisch riechenden Produkten aus einem Gemisch von Aminosäuren und Zuckern nach längerem Erhitzen auf 100°C. Im Gegensatz zu der enzymatischen Glykosilierung, die als post-translationale Proteinmodifikation zur Bildung von glykosidischen Bindungen führt, verläuft diese Reaktion, die sogenannte "Maillard-Reaktion", ohne die Katalyse von Enzymen. Daher ist sie auch unter dem Begriff "nichtenzymatische Glykosilierung" oder "Glykierung" bekannt.

Die Maillard Reaktion ist für alle reduzierenden Zucker und Zuckerphosphate mit freier Carbonylgruppe beschrieben, wobei Glukose der am wenigsten reaktive Zucker ist. Weit reaktiver sind die Metabolite des Polyolweges wie Fruktose oder Fruktose-3-phosphat und vor allem intrazelluläre Zuckermetabolite wie Desoxyglukoson, Dihydroxyacetonphosphat, Glycerinaldehyd-3-phosphat, Methylglyoxal oder Glyoxal (Hipkiss et al., 1995; Thornalley, 1996; Shipanova et al., 1997)

Die stabilen Verbindungen, die aus der nichtenzymatischen Glykierung und den nachfolgenden Dehydrierungs- und Oxidationsschritten hervorgehen, werden heute als "Advanced glycation Endproducts" (AGEs) bezeichnet (Bucala et al., 1994).

AGEs entstehen aus glykierten Proteinen. In der Maillard Reaktion wird als erster Schritt eine primäre Aminogruppe, z.B. die  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins glykiert. Die gebildete Schiff-Base lagert sich in einem zweiten Schritt zum Amadori-Produkt um. Bis hierher ist die Reaktion noch reversibel. Durch Dehydratation, Oxidation und Kondensation entsteht in weiteren Schritten ein heterogenes Gemisch aus proteingebundenen, bräunlichen, heterozyklischen Ringverbindungen mit einem charakteristischen Fluoreszenzmaximum bei 440nm bei einer Anregungswellenlänge von 370nm (Abb. 1).

Die Oxidation der Amadori Produkte zu AGEs verläuft teilweise über radikalische Zwischenstufen. Durch Übergangsmetall-katalysierte Autoxidation der proteingebundenen Amadori Produkte kommt es zur Produktion von Superoxidradikalen  $O_2^{\cdot-}$ , diese werden zu Peroxid,  $H_2O_2$  dismutiert. Über die Fenton Reaktion kann es dann zur Entstehung von Hydroxylradikalen,  $HO\cdot$ , kommen. Glykierte Proteine setzen bis zu 50-mal mehr Radikale frei als nicht glykierte Proteine (Mullarkey et al., 1990)

Die genaue Zusammensetzung komplexer AGE-Gemische ist nicht bekannt, die Struktur einiger AGEs konnte jedoch aufgeklärt werden. Bekannte, strukturchemisch analysierte AGEs sind z.B. N- $\epsilon$ -Carboxymethyl-lysin (CML), Pentosidin, Pyrralin, Imidazolone und Vesperlysin.

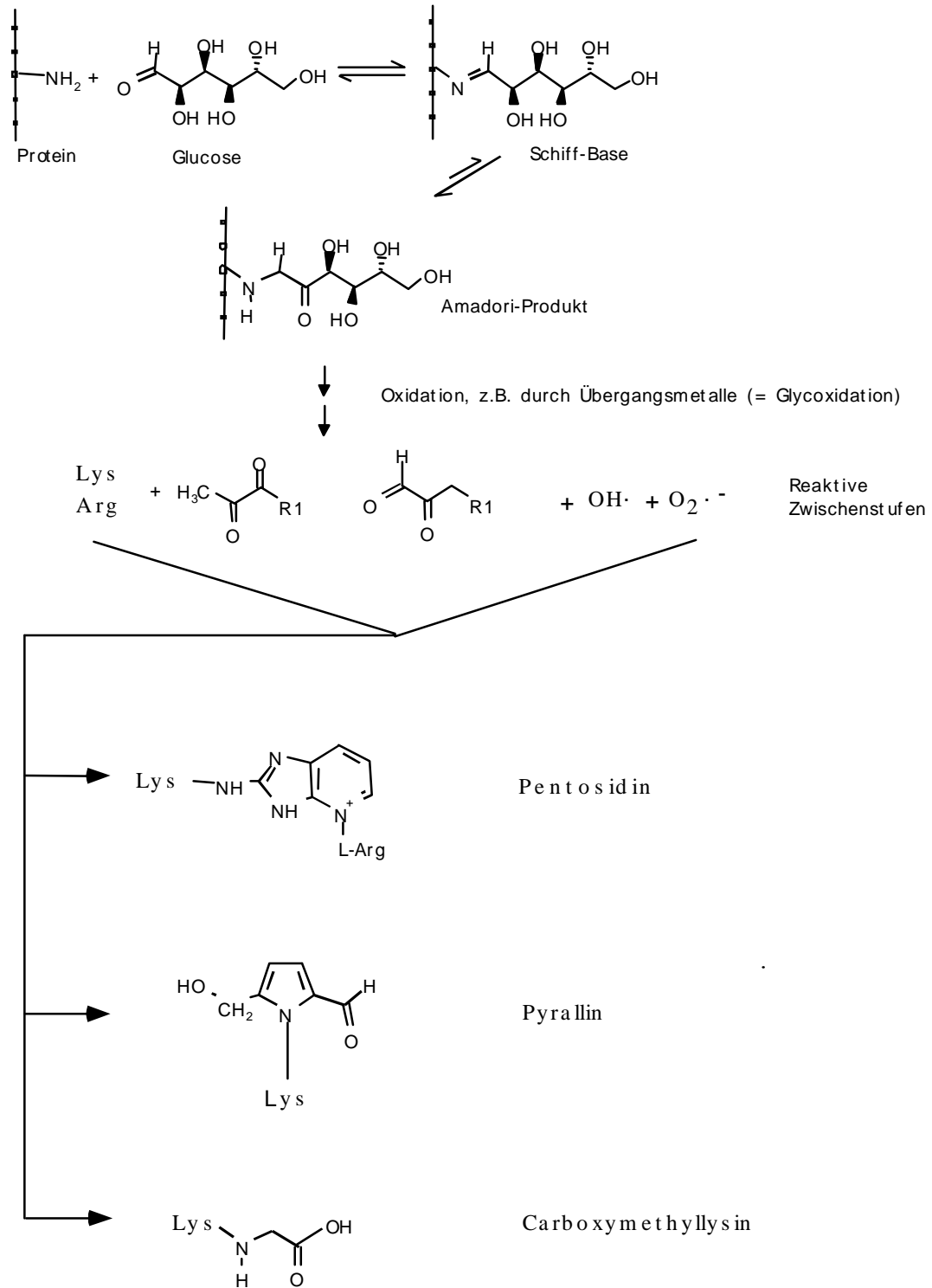


Abbildung 1 : Chemie der AGE-Bildung

### AGE-Bildung unter physiologischen Bedingungen

In der Lebensmittelindustrie ist die Bedeutung der Maillard Produkte als Geschmacksträger in erhitzten Speisen seit langem bekannt und findet dort zur Herstellung synthetischer Aromen Verwendung (Dekimpe et al., 1994). Erst im letzten Jahrzehnt wurde erkannt, dass auch in vivo in signifikantem Ausmass eine nichtenzymatische Glykierung von Proteinen stattfindet (Furth, 1997). So wird die Messung der nichtenzymatischen Glykierung von 5-20% des N-terminalen Valins im Hämoglobin A<sub>1c</sub> heute routinemässig in der klinischen Diagnostik zur Kontrolle des Blutzuckerspiegels bei Diabetikern eingesetzt (Roberts et al., 1997).

Im Körper kann die AGE-Bildung Aminosäuren, Proteine, Lipoproteine und auch Nukleinsäuren betreffen. Da die Bildung von AGEs unter physiologischen Bedingungen sehr langsam vor sich geht, sind besonders langlebige Proteine mit geringem Umsatz wie Kollagen und das Kristallin der Augenlinse sowie amitotische Gewebe wie das ZNS anfällig für Glykierungsreaktionen. Auch auf pathologischen Proteinablagerungen wie Amyloidplaques akkumulieren AGEs. Da AGE - modifizierte Proteine unlöslich und proteaseresistent sind, ist ihre Entfernung aus dem Organismus schwierig, glykierte Proteine können jedoch in einem gewissen Umfang in der Leber abgebaut werden.

Erhöhte AGE-Spiegel sind bei einer Reihe von Krankheiten zu finden, so z.B. bei Artherosklerosen, Diabetes mellitus und diabetischer Neuropathie (Monnier et al., 1993; Ryle & Donaghy, 1995). Die AGE-Bildung wird hier u.a. durch einen erhöhten Blutzuckerspiegel gefördert. Auch Hämodialysepatienten weisen erhöhte AGE Spiegel auf. Die Akkumulation von AGEs gilt allgemein als Risikofaktor für das vaskuläre System und das periphere Nervensystem (Brownlee, 1995).

Für die Alzheimersche Demenz wurde eine pathophysiologische Rolle von AGEs erstmals 1994 aufgrund histochemischen Untersuchungen vorgeschlagen (Colaco & Harrington, 1994; Harrington & Colaco, 1994; Ledesma et al. 1994; Vitek et al., 1994; Yan et al., 1994a).

### Die Alzheimer'sche Demenz

Die Alzheimersche Demenz (AD), die erstmalig 1906 von dem Psychiater und Neuropathologen Alois Alzheimer beschrieben wurde, ist eine der häufigsten degenerativen Alterskrankheiten des Zentralnervensystems. Sie beginnt mit einer Schädigung des Kurzzeitgedächtnisses, gefolgt von Sprachstörungen und Orientierungslosigkeit bis hin zum völligen Verlust von Sprache, Gedächtnis und Körperkontrolle.

Etwa 5% der Bevölkerung über 65 Jahre und 20% der Bevölkerung über 80 Jahren erkranken an der AD. Mit zunehmendem Durchschnittsalter der Bevölkerung steigt die Zahl der Alzheimerpatienten kontinuierlich an. Eine Behandlung ist bisher nur symptomatisch, z.B. durch Acetylcholinesterase-Inhibitoren möglich, auch Cyclooxygenase-Inhibitoren werden eingesetzt.

Der genaue Pathomechanismus der AD ist bisher nicht genau geklärt. Die zahlreichen Einzelbefunde auf den Gebieten der Pathologie, Genetik, Molekularbiologie und Neurochemie konnten noch nicht zu einer einheitlichen Theorie über die Ätiologie der Erkrankung zusammengefügt werden, eine multifaktorielle Ätiopathogenese ist wahrscheinlich.

Im Hirngewebe von AD Patienten kommt es zu fortschreitenden Störungen der synaptischen Funktion und zu regionalem neuronalem Zelltod. Histopathologisch fallen vor allem unlösliche Proteinablagerungen auf.

Im Vergleich zu altersgleichen, nichtdementen Kontrollen finden sich in der AD folgende, charakteristische Veränderungen im Gehirn:

- extrazelluläre, kongophile Angiopathien und intrazelluläre neurofibrilläre Bündel (tangles, NFTs),
- senile Plaques,
- aktivierte Astro- und Mikrogliazellen,
- gestörter Glukosemetabolismus,
- erhöhter oxidativer Stress.

### Histochemische Marker der AD

#### 1. Neurofibrilläre Bündel und MAP $\tau$

Die intrazellulären neurofibrillären Bündel (tangles, NFTs) bestehen aus Komponenten des Zytoskelettes, vor allem aus dem Mikrotubuli-assoziierten Protein tau (MAP $\tau$ ).

Die strukturelle Integrität der Mikrotubuli ist wesentlich für deren Transportfunktion und hängt hauptsächlich von MAP $\tau$  ab. Hyperphosphorylierung und Glykierung von tau führen zur Bildung sogenannter "paired helical filaments" (PHF $\tau$ ) und infolgedessen zu Störungen in der Funktion der Mikrotubuli (Ledesma et al., 1994; Mandelkow et al., 1996). Dies ist besonders fatal in Neuronen, die grosse Mengen Neurotransmitter produzieren und ausschütten, z.B. in den pyramidalen Neuronen des Cortex. In geringerem Ausmass finden sich NFTs auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen, möglicherweise treten sie als Folge chronischer Schädigung der Nervenzellen auf, der genaue Mechanismus ihrer Bildung ist nicht geklärt.

Die Anzahl der NFTs korreliert weit deutlicher mit dem neuronalem Zelltod und der Schwere der Demenz als die senilen Plaques (Arriagada et al., 1992). Die Frage, ob die "tangle"-Bildung ein unabhängiger Vorgang der Hirnalterung ist oder in regionalem und zeitlichem Zusammenhang mit der  $\beta$ -Amyloid Deposition steht, ist umstritten.

## 2. Senile Plaques und das $\beta$ -Amyloid-Protein

Das  $\beta$ -Amyloidprotein ( $\beta$ A4) ist die Hauptproteinkomponente der senilen Plaques. Andere Proteinbestandteile sind z. B. Ubiquitin und Apolipoprotein E (Masters et al., 1985; Selkoe et al., 1986).

$\beta$ A4 besteht aus 40 - 42 Aminosäuren; die extrazellulären Domäne umfasst 29 Aminosäuren, die Transmembrandomäne 11-14 Aminosäuren. Das Peptid entsteht als proteolytisches Spaltprodukt aus dem Amyloid Precursor Protein (APP), einem ubiquitär exprimiertem Transmembran-Glykoprotein (Kang et al., 1987). Der N-Terminus des APP befindet sich auf der extrazellulären Seite, während ein kurzes Stück des Carboxyterminus ins Cytoplasma ragt.

$\beta$ -A4 1-40	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV
$\beta$ -A4 1-42	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA

Abb. 2 : Aminosäuresequenz von  $\beta$ -A4

Obwohl APP im gesamten Organismus gebildet wird, lagert es sich ausschliesslich in der Hirnrinde, den Gefässen der Hirnrinde und in den weichen Hirnhäuten ab und ist dort als sogenannte kongophile Angiopathie nachzuweisen.

Aus der APP-mRNA entstehen durch differentielles Spleissen 4 unterschiedlich lange Isoformen des Proteins, alle mit amyloidogenen Eigenschaften. APP 645 ist die vorherrschende Form im Gehirn.

Die Spaltung von APP erfolgt durch verschiedene Sekretasen. Die  $\alpha$ -Sekretase spaltet das Vorläuferprotein in der  $\beta$ A4 Sequenz unter Freisetzung eines 100 kDa grossen, C-terminalen Fragments.  $\beta$ A4 entsteht durch die aufeinanderfolgende Spaltung von APP durch  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretasen. Da die  $\beta$ A4 Sequenz in der Transmembrandomäne des APP liegt, erfolgt die Freisetzung von  $\beta$ A4 durch pathologische Vorgänge wie Membranzerstörung oder proteolytischen Abbau. Während früher die These einer Prozessierung von APP zu  $\beta$ A4 in Endosomen favorisiert wurde, wird heute die Entstehung von  $\beta$ A4 unter Beteiligung der sogenannten Präseniline im endoplasmatischen Retikulum diskutiert (Hartmann et al., 1997).

Auf die Bedeutung von  $\beta$ A4 in der Pathogenese insbesondere der familiären Formen der Alzheimer'schen Demenz, deuten neben den histologischen Befunden auch genetische Untersuchungen hin.

Der grösste Teil der dominant erblichen Alzheimer Fälle wird durch Mutationen in den 1995 entdeckten Präsenilin-Genen verursacht. Präseniline beeinflussen die Prozessierung von APP zu  $\beta$ A4 im ER. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Präsenilin-Mutationen zu einer erhöhten Produktion von  $\beta$ A4 (1-42) führt, das besonders schnell aggregiert (Citron et al., 1997; Hardy, 1997; Capell et al., 2000).

In Familien mit präseniler Demenz finden sich unterschiedliche APP Mutationen, die jeweils zum Austausch einer Aminosäure führen. Alle diese Mutationen finden sich in unmittelbarer

Nähe zum  $\beta$ A4 Fragment und führen entweder zur Bildung abnormer Mengen an  $\beta$ A4 oder zur beschleunigten Aggregation des Peptids (Kosaka et al., 1997).

Die molekularen Mechanismen der  $\beta$ A4 - vermittelten Neurodegeneration sind nicht eindeutig geklärt. Drei Hauptmechanismen wurden vorgeschlagen: die Bildung von Ionenkanälen, v.a. für Kalzium (Eckert et al., 1995; Engstrom et al., 1995; Pollard et al., 1995), oxidativer Stress (Behl et al., 1995; Pike et al., 1997) und die Inhibierung des mitochondrialen Energiestoffwechsels (Bozner et al., 1997; Keller et al., 1997; Takenouchi & Munekata 1998).

Obwohl eine zentrale Rolle von  $\beta$ A4 bei der Pathogenese der AD unumstritten ist, ist die Hypothese der direkten Neurotoxizität des Amyloids nicht mehr allgemein akzeptiert.

Frühe Amyloidablagerungen, sogenannte "diffuse" Plaques, lösen kaum neuronale Reaktionen aus während sich in der Nähe älterer, "neuritischer" Plaques zahlreiche degenerierte Nervenzellfortsätze finden. Dies zeigt sich aber nicht in den bisher vorhandenen Tiermodellen. Transgene,  $\beta$ A4 überexprimierende Mäuse entwickeln z. B. keine AD-typischen Läsionen. Auch die Injektion von präaggregiertem  $\beta$ A4 in das Hirn von Versuchstieren führt nicht zu AD-typischen Veränderungen (Irizarry et al., 1997). Neuropathologisch zeigten sich hier Ähnlichkeiten zu sog. "High Load Controls", nicht-dementen Menschen mit hoher Plaquebelastung, jedoch ohne Neuronenverlust und Akutphase-Reaktion. Offenbar sind für die Pathogenese der AD noch andere, möglicherweise altersabhängige Faktoren von Bedeutung.

### Immunantwort in der AD

Während die diffusen Plaques eine normale Begleiterscheinung der Hirnalterung darstellen und auch beim Gesunden vorkommen, finden sich die späteren, neuritischen Plaques vorwiegend bei AD-Patienten. Sie sind kolokalisiert mit aktivierten Mikroglia- und Astrogliazellen (Kalaria et al., 1996), ebenso finden sich die Komplementproteine des klassischen Weges. Die charakteristischen Marker einer Akutphasenreaktion wie Interleukine,  $\alpha$ -Makroglobulin und anti-Chymotrypsin sind bei AD-Patienten nachweisbar (McGeer & McGeer, 1995).

Die sog. "Immunpathogenesehypothese" der AD schlägt vor, dass die von aktivierten Astro- und Mikroglia ausgeschütteten Zytokine und freien Radikale zum Verlust der synaptischen Plastizität und zum neuronalen Zelltod beitragen. Diese Hypothese wird unterstützt durch den erfolgreichen Einsatz sogenannter NSAIDs (non steroidal antiinflammatory drugs) als Therapeutika für AD Patienten in mehreren Studien (McGeer & McGeer, 1997; Rogers et al., 1993). Erhöhte Spiegel an Zytokinen führen ausserdem auch zu einer Verschiebung der Prozessierung von APP hin zu amyloidogenen Formen (Wyss-Coray et al., 1997).

Die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  durch Mikroglia wird auch durch AGEs induziert (Guzdek & Stalinska, 1992; Vlassara et al., 1988). AGEs können so direkt zur Neurodegeneration beitragen. Oxidativer Stress kann die Neuronen

weiter schädigen, sofern diese, z. B. durch Energiemangel, ein geschädigtes Redox-abwehrsystem haben.

### Glukosemetabolismus in der AD

Im Verlauf der AD kommt es bereits in frühen Stadien zu einer ausgeprägten Verringerung des zerebralen Glukoseumsatzes und der oxidativen Phosphorylierung, die im Lauf der Krankheit zunimmt (Henneberg & Hoyer, 1995; Rapoport, 1996). Dies kann auch in vivo durch bildgebende Verfahren wie z.B. PET sichtbar gemacht werden (Jagust et al., 1991; Berent et al., 1999). Vermutlich kommt es trotz erhaltenen zerebralen Glukoseangebots zu einer intrazelluläre Unterversorgung. Als Grund für die Störung im Glukosemetabolismus werden u.a. die Inhibierung von Glukosetransportern und von mitochondrialen Enzymen durch Lipidperoxidationsprodukte wie Hydroxynonenal diskutiert (Mark et al., 1997). Damit kann eine direkte Verbindung zwischen oxidativem Stress und der Störung im Energiehaushalt hergestellt werden (Brucekeller et al., 1998; Montine et al. 1998).

### Oxidativer Stress in der AD

Freie Radikale entstehen in allen aeroben Organismen als instabile Zwischenprodukte des Zellstoffwechsels, dienen aber auch der Abwehr oder zu Regulationszwecken. Wegen ihrer Toxizität sind geeignete Schutz- und Entgiftungsmechanismen für die Zelle unbedingt notwendig. Dazu dienen Enzyme wie Katalase, Superoxiddismutase und verschiedene Peroxidasen sowie Antioxidantien wie Vitamin E, Ascorbat oder Glutathion.

Oxidativer Stress bedeutet ein Ungleichgewicht zwischen Bildung und Beseitigung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). ROS können zur Oxidation von Membranlipiden führen sowie zu DNA- und Proteinschäden beitragen. Weiter sind sie ein direkter Auslöser von nekrotischen Vorgängen und regulieren die Empfindlichkeit der Zelle gegen apoptotische Stimuli (Clément et al., 1998).

Der hohe Energiebedarf des Gehirns wird hauptsächlich durch die Oxidation von Glukose gedeckt, als Nebenprodukt entstehen dabei in den Mitochondrien auch ROS. Da manche Antioxidantien und auch Katalase im Gehirn nur in geringen Mengen vorkommen, muss es besonders sorgfältig durch andere Systeme gegen oxidativen Stress geschützt werden, auch wegen seines relativ hohen Anteils an oxidierbaren Lipiden.

Das Tripeptid Glutathion (L- $\gamma$ -Glutamyl-L-Cysteinylglycin) ist dabei das wichtigste Antioxidans und kommt im Gehirn in Konzentrationen von 2 - 3 mM vor (Cooper & Kristal, 1997). Reduziertes Glutathion (GSH) kann auf Grund seines stark negativen Redoxpotentials ( $E'_0 = -230$  mV) leicht durch Peroxide und Radikale zu Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert werden. Dies geschieht entweder direkt oder durch Katalyse durch das Selenoprotein Glutathionperoxidase. GSH wird über die Glutathionreduktase regeneriert, die ein Verhältnis

GSH / GSSG von etwa 99:1 aufrechterhält. Die Glutathionreduktase ist von NADPH-regenerierenden Systemen, insbesondere dem Pentosephosphatzyklus, abhängig.

Die Depletion von GSH erhöht die Empfindlichkeit der Zelle für Apoptose, somit sind oxidativer Stress und dadurch ausgelöste Signale direkt auch mit dem intrazellulären Glutathiongehalt verknüpft (Fernandez et al., 1995).

Vieles deutet auf einen Zusammenhang von altersabhängigen, neurodegenerativen Erkrankungen und dem oxidativen Status der Zelle hin. Mit zunehmendem Alter verschiebt sich der Redoxzustand der Zelle zur oxidativen Seite hin, die Produktion von ROS übersteigt dann die antioxidative Kapazität der Zelle.

Dass bei der AD oxidativer Stress vorliegt, wird durch verschiedene Marker angezeigt. So enthalten z.B. NFTs die Lipidperoxidationsprodukte Malondialdehyd und Hydroxynonenal (Yan et al., 1994; Sayre et al., 1997). Weiter findet sich die Expression einer Typ-1 Hämooxygenase (Premkumar et al., 1995) und die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB (Smith et al., 1994).

Post mortem Untersuchungen an AD Patienten zeigen eine Anhäufung von Prooxidantien wie z. B. Eisen, die eine Radikalbildung auslösen können. Dies wird begleitet von einer verminderten Konzentration an Antioxidantien (Gerlach et al., 1994).

In der Alzheimer'schen Demenz findet sich ein Ungleichgewicht im Verhältnis der radikalentgiftenden Enzyme Superoxiddismutase und Katalase. Die verringerte Katalase-Aktivität führt zur Anreicherung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bei Anwesenheit von freiem Eisen kann es über die Fenton Reaktion zur Produktion von Hydroxylradikalen kommen (Gsell et al., 1995). Auf DNA-Ebene wurde eine oxidative Schädigung der mitochondrialen DNA festgestellt (Mecocci et al., 1997).

Eine weitere Quelle von Superoxidradikalen in der AD stellen aktivierte Mikroglia dar. Die Anwesenheit von AGEs im Hirngewebe von AD Patienten ist ebenfalls ein Marker für oxidativen Stress, da zu ihrer Entstehung ein oxidativer, Übergangsmetall-katalysierter Schritt notwendig ist.

### AGEs in der Pathogenese der Alzheimer'schen Demenz

Die Glykosilierung und nachfolgende Vernetzung von Proteinen, z.B. von Enzymen, Transportmolekülen, aber auch von Immunglobulinen oder Nukleinsäuren kann zu erheblichen Funktionseinbußen führen, bis hin zum Funktionsverlust biologischer Systeme. Durch die Akkumulation unlöslicher AGEs können sowohl intra- als auch extrazellulär Entsorgungsprobleme auftreten, die letztlich zu einer Immunantwort, oxidativem Stress und Lipidperoxidation führen. Störungen durch AGEs sind also auf ganz unterschiedlichen Funktionsebenen des Organismus denkbar.

In geringem Maße können glykierte Proteine in der Leber abgebaut werden, dies ist mit Apolipoprotein E (Apo E) assoziiert. Im Gehirn wird Apo E vor allem von Mikroglia und Astroglia produziert. Durch Unterschiede in der Aminosäuresequenz der verschiedenen



ApoE-Typen kommt es vermutlich auch zu Unterschieden in der Empfindlichkeit gegenüber AGE-induzierten Veränderungen. Apo E4, dessen Träger ein erhöhtes Risiko an Alzheimer zu erkranken haben, bindet dabei vermutlich eher an Amyloidplaques und erleichtert die Proteinaggregation als z.B. Apo E2, das einen eher protektiven Effekt hat (Li & Dickson, 1997).

Aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften können AGEs als direkte Noxen im ZNS auftreten, andererseits sind auch indirekte, rezeptorvermittelte Pathomechanismen denkbar.

An der Pathogenese der Alzheimer'schen Demenz können AGEs durch die Vielzahl möglicher Angriffspunkte auf verschiedene Weise beteiligt sein, z.B. an der Veränderung der neuronalen Plastizität. Diese geht mit einer charakteristischen Synapsenpathologie einher, die zu der klinischen Entwicklung der Krankheit in Beziehung steht (Walsh, 1992). AGEs lagern sich altersabhängig selektiv in den Pyramidenzellen ab und betreffen damit denselben Neuronentyp, der bei der AD degeneriert (Li et al., 1995).

Das Vorkommen von AGEs in der AD als Bestandteil von neurofibrillären Bündeln (NFTs) und senilen Plaques ist vor allem durch histochemische Untersuchungen nachgewiesen (Vitek et al., 1994). Weiter ist  $\beta$ A4-AGE auch im Liquor von AD-Patienten nachzuweisen. Plaques aus dem Hirngewebe von AD Patienten enthalten die etwa 3-fache Menge an AGEs als die einer altersgleichen Kontrollgruppe (Vitek et al., 1994).

Auch in NFTs sind AGEs an der Bildung unlöslicher Aggregate beteiligt. Durch seinen hohen Lysingehalt (ca. 10%) ist besonders MAPt als Hauptbestandteil der NFTs von betroffen. Durch die Glykierung von MAPt wird die Bindung an Tubulin aufgehoben, was möglicherweise die Organisation des Zytoskeletts und den axonalen Stofftransport behindert (Ledesma et al., 1995a; Ledesma et al., 1995b; Ledesma et al., 1994).

AGEs sind auch an der Generierung von oxidativem Stress beteiligt, der im Rahmen der sogenannten Radikalhypothese als ein weiterer Pathogenesefaktor für die AD diskutiert wird. Durch die Bildung von AGEs kommt es vermehrt zur Bildung freier Radikale, auch die Akkumulation von AGEs im Gewebe geht mit erhöhtem oxidativem Stress einher. Es kann zu synergistischen Effekten zwischen AGE-Modifikationen und durch oxidativen Stress ausgelösten Proteinschäden kommen. Die Glykoxydation kann die Bildung von AGEs weiter beschleunigen, umgekehrt kann durch AGEs auch Lipidoxidation, zum Beispiel an Zellmembranen, ausgelöst werden.

Der Radikalmetabolismus kann somit von AGEs auf mehreren Ebenen beeinflusst werden. Über die Fenton Reaktion kann auch ein veränderter Eisen-Metabolismus, möglicherweise in Verbindung mit Veränderungen auf der Ebene der Transportmoleküle beteiligt sein (Gerlach et al., 1994).

Neben der direkten Produktion von Radikalen bei der Bildung von "advanced glycation endproducts" kann oxidativer Stress durch AGEs auch indirekt über die Interaktion AGE-modifizierter Proteine mit Mikroglia ausgelöst werden. Dies führt in einer Akut-Phasen Reaktion zum "respiratory burst" und zu "bystander-lysis" benachbarter Neuronen (McMillan et al., 1995).

Ausserhalb des ZNS können AGEs durch die Aktivierung peripherer Makrophagen und mononukleärer Phagozyten entzündliche Reaktionen hervorrufen. Im Hirngewebe von AD-Patienten finden sich in Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen überaktivierte Mikroglia und Astroglia als Marker einer chronischen Entzündungsreaktion (Kalaria et al., 1996; Halliday et al., 2000).

### AGE-Rezeptoren und Signaltransduktionswege

Auch rezeptorvermittelte Mechanismen der Zellaktivierung können in der Pathogenese der AD eine Rolle spielen. AGEs werden von verschiedenen Rezeptoren der Zelloberfläche erkannt und gebunden, darunter macrophage scavenger receptor Typ I und II, Oligosaccharyl-Transferase-48 (OST-48, AGE-R1), 80 K-H Phosphoprotein (AGE-R2), Galectin-3 (AGE-R3) und RAGE (receptor of advanced glycation endproducts). Andere AGE-bindende Proteine sind Lysozym und Lactoferrin (Thornalley, 1998).

Die Bindung von AGEs an Rezeptoren führt nicht nur zu Endozytose und Degradation der AGEs, sondern auch zur Ausschüttung von Zytokinen, zu Chemotaxis sowie zu Veränderungen in der Permeabilität der Zellmembran.

Von den Rezeptoren am besten charakterisiert ist RAGE (Yan et al, 1993; Schmidt et al., 1993; Wautier et al., 1994). RAGE wird auf verschiedenen Zellen exprimiert, z.B. Endothelzellen, Muskelzellen, Monozyten und neuronalen Zellen (Brett et al., 1993). Der Rezeptor ist ein Mitglied der Immunglobulin Familie, die extrazelluläre Region enthält drei Immunglobulin-analoge Domänen, eine V-analoge Ig-Domäne sowie zwei C-analoge Ig-Domänen. Daran schliesst sich eine hydrophobe Transmembranregion und eine stark geladene zytoplasmatische Region an.

Neben AGEs bindet RAGE auch  $\beta$ -Amyloid sowie Amphoterin, dies reguliert den Auswuchs der Neuriten während der Nervenzellentwicklung (Huttunen et al., 1999).

Die Aktivierung von RAGE durch AGEs und  $\beta$ A4 scheint auch in der Pathogenese der AD von Bedeutung zu sein. AGEs können hier zwei verschiedene Signalwege aktivieren, zum einen eine mitogene Signalkaskade über p21 / MAP- Kinase (Simm et al, 1997; Lander et al. 1997), zum anderen den redox-sensitiven Weg über die Aktivierung von NF $\kappa$ B (Yan et al., 1996).

Der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B wird unter anderem durch Zytokine,  $\beta$ -Amyloid und oxidativen Stress aktiviert und führt zur Aktivierung von Makrophagen und Mikroglia. In Neuronen kommt es zur Expression antiapoptotischer Gene wie MnSOD und IAP, neuronale Apoptose kann so durch NF $\kappa$ B verhindert werden, die Basisaktivität von NF $\kappa$ B in Neuronen ist daher meist hoch (Mattson et al., 2000). Es sind jedoch auch Szenarien denkbar, in denen NF $\kappa$ B nicht protektiv ist, die Rolle von NF $\kappa$ B ist abhängig von Umfeld.

Eine verstärkte Aktivierung von NF $\kappa$ B findet sich bei akuten und chronischen neurodegenerativen Erkrankungen, u.a. auch in der Alzheimer'schen Demenz (Boissiere et al., 1997; Kaltschmidt et al., 1997).

Die Erkenntnis, dass AGEs an der Pathologie der AD beteiligt sein könnten, hat eine Vielzahl neuer Möglichkeiten zu Verständnis und Therapie dieses Krankheitsbildes eröffnet. AGEs könnten demnach nicht nur statische Beiprodukte des Alterns sein, sondern auch selbst biologische Effekte ausüben. Dies fokussiert das Interesse zukünftiger Forschung auf die von AGEs ausgelösten metabolischen Störungen und deren Grundlagen, denn ein besseres Verständnis der Rolle der AGEs könnte auch zur Entwicklung alternativer Therapieansätze in der AD führen.

Ob AGEs tatsächlich aktiv an der Pathogenese der AD beteiligt sind, ist derzeit noch nicht genau geklärt. Glykierungs- und Oxidationsreaktionen spielen vermutlich bei der Umwandlung von diffusen in neuritische Plaques eine Rolle, damit hängen AGE-Spiegel und die Vernetzung von  $\beta$ A4 zusammen. Ein Ziel dieser Arbeit war daher, zu untersuchen, ob die AGE-Bildung die Vernetzung von  $\beta$ A4 begünstigen kann und wie dieser Prozess gegebenenfalls inhibiert oder verlangsamt werden kann.

Ausserdem sollte untersucht werden, ob AGEs eine direkte toxische Wirkung auf Neuronen haben. Da bisher zur Untersuchung biologischer Effekte von AGEs vor allem Endothelzellen verwendet wurden, sollte in dieser Arbeit der Einfluss von AGEs auf verschiedene Stoffwechsel-Parameter einer humanen, neuronalen Zelllinie getestet werden.

Da AGEs eine sehr heterogene Substanzklasse darstellen, wurden ausserdem verschiedene Modell-AGEs hergestellt und in Bezug auf AGE-Gehalt, Toxizität und Radikalproduktion charakterisiert. Dies sollte Aufschluss darüber geben, welche Faktoren die Toxizität von AGEs beeinflussen und auch eine erste Aussage über die Art der AGE-vermittelten Zytotoxizität ermöglichen.

Durch die Zugabe verschiedener Substanzen wie Antioxidantien oder AGE-Inhibitoren, sollte versucht werden, AGE-induzierte Stoffwechselveränderungen zu verhindern. Dies sollte auch Aufschluss darüber ermöglichen, welche Substanzen bzw. welches Wirkprinzip therapeutisch wirksam sein könnte.