

### **3. Ergebnisse**

#### **1. Einfluss von AGEs auf die Vernetzung von $\beta$ -A4**

Die Rolle von  $\beta$ A4 in der Ätiologie der Alzheimer'schen Demenz gründet sich hauptsächlich auf die direkte Neurotoxizität des Peptids *in vitro* (Pollard et al., 1995). Dafür ist es jedoch nötig,  $\beta$ A4 in einer niedermolaren Lösung vorzueinkubieren, wobei Aggregate mit vorwiegend  $\beta$ -Faltblattstruktur entstehen. Trotzdem sind von dem präaggregierten Peptid millimolare Konzentrationen zur Auslösung des Zelltods erforderlich, was zu Zweifeln an der alleinigen pathophysiologischen Rolle von  $\beta$ A4 in der AD führte (Beyreuther & Masters 1997). Es ist daher zu vermuten, dass  $\beta$ A4 Ablagerungen ein notwendiger und unterstützender, aber nicht der allein ursächliche Faktor für den neuronalen Zelltod in der AD sind. Vermutlich sind weitere Faktoren wie z.B. AGEs, an der  $\beta$ A4 Toxizität beteiligt.

##### **1.1 Vernetzung und Glykierung von $\beta$ A4**

Die Anwesenheit von AGEs in Amyloidplaques im Gehirn von AD Patienten gibt noch keine Antwort auf die Frage, ob die Selbstaggregationstendenz des Amyloids zur Bildung unlöslicher Plaques ausreicht und AGEs sich nur opportunistisch auf den Plaques bilden oder ob AGEs aktiv die Vernetzung des Amyloids beschleunigen.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Glykierung von  $\beta$ A4 *in vitro* die Aggregation von monomerem  $\beta$ A4 zu kovalent vernetzten  $\beta$ A4-Aggregaten beschleunigt (Münch, 1997).

Es wurde nun gezeigt dass bei der Inkubation von  $\beta$ A4 mit Zuckern  $\beta$ A4-AGE entsteht, das über die zunehmende OD<sub>400nm</sub> und die charakteristische AGE-Fluoreszenz (Exc. 370nm / Em. 440nm) nachzuweisen ist.

Als Maß zur Bestimmung der Vernetzungsgeschwindigkeit von  $\beta$ A4 wurde der Verlust an Peptidmonomer im Reaktionsansatz gewählt und über SDS-Tricin PAGE verfolgt (Harper & Lansbury, 1997). Es entstehen höhermolekulare, glykierte  $\beta$ A4 Oligomere, die als Fibrillen nach 72h auch makroskopisch sichtbar sind.

Mit dem Verlust des Monomers nehmen die OD<sub>400nm</sub> und die Fluoreszenz zu (Abb. 1 und 2). Obwohl die Reaktion von Proteinen mit Glukose und Fruktose ähnlich verläuft, wurde aus praktischen Gründen bevorzugt Fruktose verwendet, da die Reaktion hier deutlich schneller abläuft.

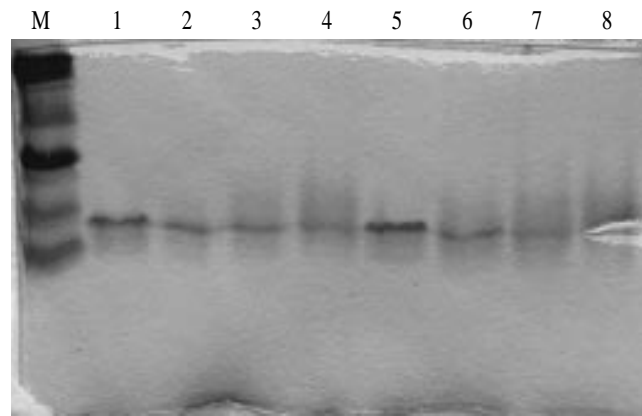


Abb 1: Verlust von monomerem  $\beta$ A4 bei der Inkubation von  $60\mu\text{M}$   $\beta$ A4 mit 50mM Glukose (Spuren 1-4) oder 50mM Fruktose (Spuren 5-8) in 1x PBS.

Alle 24 h wurden je  $5\mu\text{g}$  Amyloid aus dem Reaktionsansatz entnommen und die Ansätze im Tricin/SDS-Gel aufgetrennt. 1; 5 : 0h 2; 6 : 24h 3; 7 : 48h 4; 8 : 72h

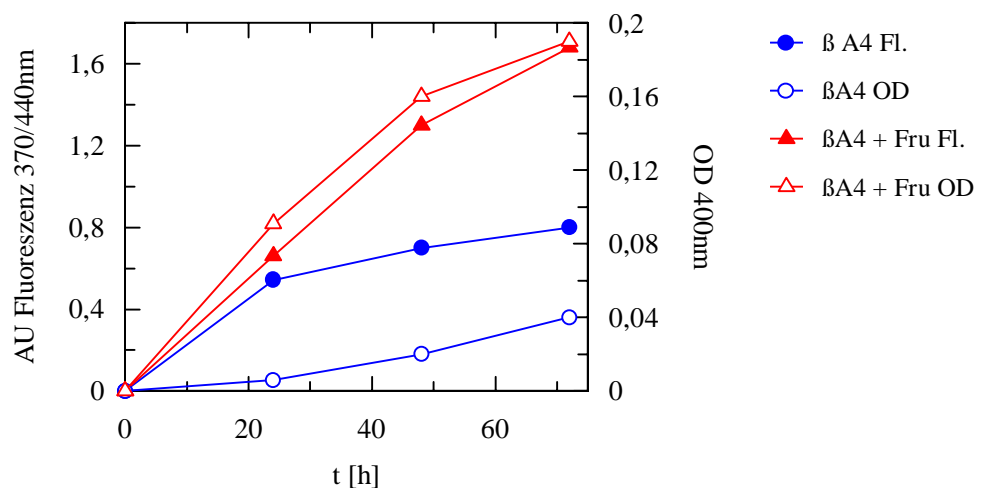


Abb 2.: Bildung von glykiertem Amyloid bei der Inkubation von  $60\mu\text{M}$   $\beta$ A4 mit 50mM Fruktose in 1x PBS. Bei dem Ansatz  $\beta$ A4 + Fruktose (rote Kurven) kommt es zu AGE-spezifischer Fluoreszenz und zur Zunahme der  $\text{OD}_{400\text{nm}}$ .

## 1.2. Abhängigkeit der $\beta$ -A4-Vernetzung vom Inkubationspuffer

Die Geschwindigkeit der  $\beta$ A4 Vernetzung ist abhängig von den Reaktionsbedingungen. Eine wichtige Rolle spielt neben der Inkubationstemperatur der verwendete Puffer.

In A.dest ist die Vernetzungsreaktion im Vergleich zu PBS oder PB deutlich verlangsamt. Mit steigender Phosphatkonzentration im Inkubationspuffer wird die Vernetzung beschleunigt, d.h.  $\beta$ A4 aggregiert in 50mM Phosphatpuffer schneller als in 1x PBS (10mM Phosphat). Dies deutet darauf hin, dass im Puffer als Verunreinigung enthaltenen Metallionen für die AGE-

vermittelte  $\beta$ A4-Vernetzung notwendig sein könnten. Weiter beschleunigt eine höhere Salzkonzentration im Puffer die Aggregatbildung von  $\beta$ A4 möglicherweise auch über hydrophobe Wechselwirkungen.

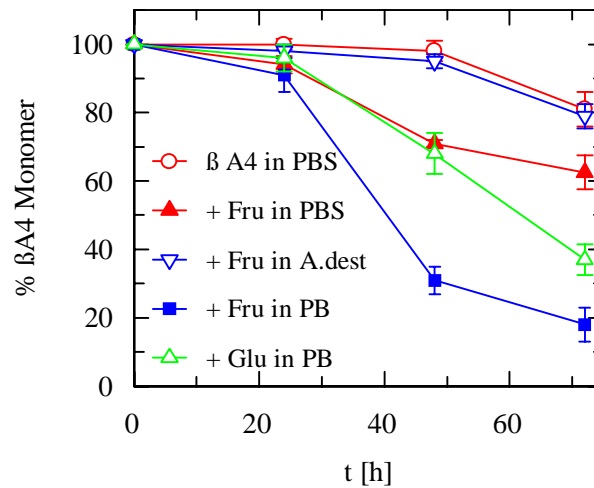


Abb. 3: "Crosslinking"-Geschwindigkeit von  $\beta$ A4 in Abhängigkeit von verschiedenen Inkubationspuffern. 60 $\mu$ M  $\beta$ A4 wurde in Wasser, PBS oder 50mM Phosphatpuffer mit 50mM Zucker inkubiert und als Maß für die Vernetzungsgeschwindigkeit der Verlust an  $\beta$ A4-Monomer im Tricin/SDS-Gel verfolgt. (n=2)

### 1.3. Untersuchungen zu Reaktionsmechanismus und -Kinetik der $\beta$ A4 Vernetzung durch Einbau von [ $^{14}$ C]-Zuckern

Bei der Glykierung von  $\beta$ A4 stellt sich die Frage nach dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion. Bei einer Glykoxydation wäre dies die Oxidation der Amadori- oder Heyn's Produkte, bei der autoxidativen Glykosylierung ist die Oxidation des Zuckers in Lösung die schrittmachende Reaktion.

Um die Kinetik des Zuckereinbaus in  $\beta$ A4 zu untersuchen, wurde der Einbau von [ $^{14}$ C]-Glukose oder Fruktose in  $\beta$ A4 bestimmt. Dazu wurde einem Reaktionsansatz von 60 $\mu$ M  $\beta$ A4 in Phosphatpuffer [ $^{14}$ C]-markierter Zucker und unmarkierter Zucker im Verhältnis 1:137 zugesetzt (Endkonzentration 50mM) und der Ansatz bei 50°C inkubiert. Um zu testen, ob für die Reaktion freie Zucker notwendig waren, wurde nicht eingebauter Zucker nach 48h über eine Sephadex G10 Säule entfernt und der Ansatz noch 2 Tage weiterinkubiert. Die Auswertung erfolgte über die Intensität der [ $^{14}$ C]-Signale im Gel auf einem Röntgenfilm sowie über die densitometrische Messung des verbleibenden  $\beta$ A4-Monomers im Gel.

Es zeigte sich, dass der Einbau von Glukose oder Fruktose in das  $\beta$ A4-Monomer nach 24h nahezu und nach 48h vollständig abgeschlossen ist, obwohl zu dieser Zeit noch etwa 80% des Amyloids als Monomer vorliegen. Das Entfernen des Zuckers nach diesem Zeitpunkt beeinflusst nicht die  $\beta$ A4 Vernetzung. Offenbar stellt die Oxidation der Amadori-Produkte

tatsächlich den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Peptidvernetzung dar. Zuckermodifiziertes  $\beta$ A4 liegt anfänglich als glykiertes Monomer im Reaktionsansatz vor bevor sich höhermolekular Aggregate bilden.

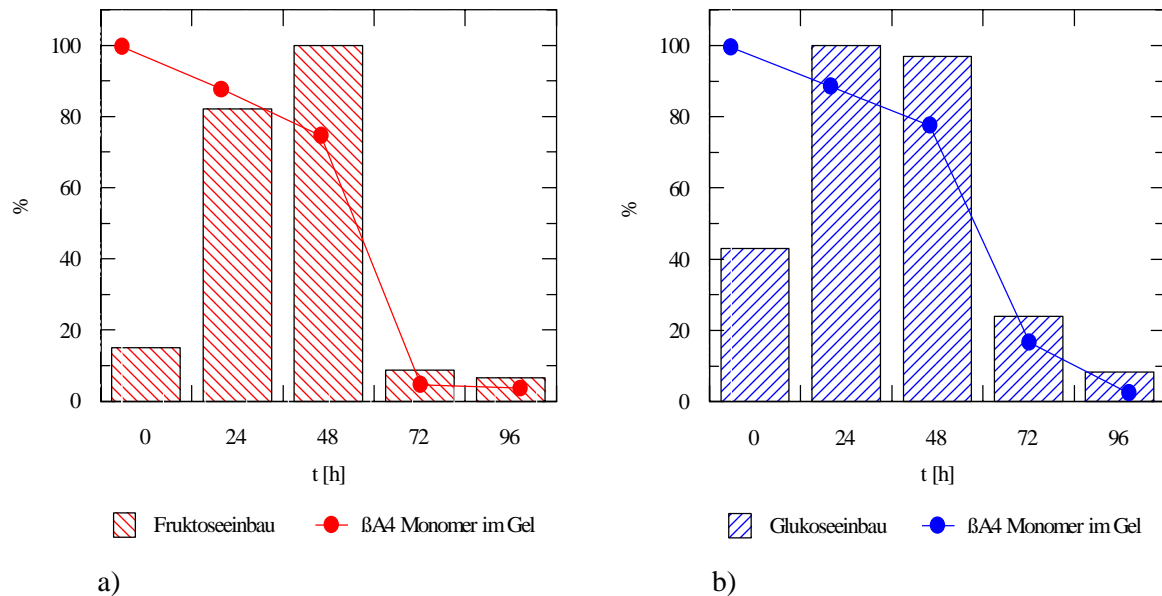


Abb. 4: Einbau von [ $^{14}$ C] - Fructose (a) und -Glukose (b) in  $\beta$ A4.

Je  $60\mu\text{M}$   $\beta$ A4 in PB wurden mit 50mM Glukose oder Fruktose bei  $50^\circ\text{C}$  inkubiert. Nicht eingebaute Zucker wurden nach 48h durch Gelfiltration entfernt und die Ansätze weiterinkubiert.  $5\mu\text{g}$  Aliquots wurden im Tricin / SDS Gel auf die Menge an  $\beta$ A4 Monomer analysiert, der Einbau markierter Zucker in die Peptidaggregate wurde durch densitometrische Analyse der Röntgenfilme erfasst.

#### 1.4. Beschleunigung der Amyloidvernetzung durch Übergangsmetalle

In Amyloid Plaques von AD Patienten liegen redox-aktive Eisenionen vor (Sayre et al. 1999). Diese können als Elektronenakzeptor bei der Oxidation von Amadori Produkten zu AGEs dienen, dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der oxidativen AGE-Bildung und Proteinvernetzung. Deshalb wurde getestet, ob die Zugabe mikromolarer Mengen an Metallionen wie Eisen und Kupfer zu einem Inkubationsansatz mit niedriger Phosphatkonzentration die kovalente Vernetzung von Amyloidpeptid beschleunigt.

Es wurden Eisen und Kupferionen verschiedener Oxidationsstufen verwendet. Die Experimente wurden in 1x PBS (10mM Phosphat) über einen Zeitraum von 72h bei  $50^\circ\text{C}$  durchgeführt. Die AGE - Bildung wurde über die Messung der  $\text{OD}_{360\text{nm}}$  und  $\text{OD}_{400\text{nm}}$  und der charakteristischen AGE-Fluoreszenz (Exc. 370nm / Em. 440nm) verfolgt. Der Verlust an monomerem  $\beta$ A4 als Maß für die Geschwindigkeit der Vernetzungsreaktion wurde über SDS-PAGE im Tricin-Gel bestimmt und densitometrisch ausgewertet. Die Bildung fibrillärer Aggregate wurde ausserdem mittels ThioT-Fluoreszenz erfasst (Abb. 7b).

Durch die Zugabe von Übergangsmetallen konnte die Vernetzung und Glykierung von  $\beta$ A4 deutlich beschleunigt werden, wie der Verlust an  $\beta$ A4 Monomer im Gel zeigt (Abb. 5 und 6) sowie die zunehmende AGE - Fluoreszenz (Exc. 370nm/Em. 440nm) (Abb. 7a) .

Im Vergleich zeigte sich, dass Metalle höherer Oxidationsstufen schneller reagieren, wobei Kupfer dem Eisen überlegen ist. Die Reaktivität lässt sich in der folgenden Reihenfolge ordnen:  $\text{Cu}^{2+} > \text{Cu}^+ > \text{Fe}^{3+} > \text{Fe}^{2+}$

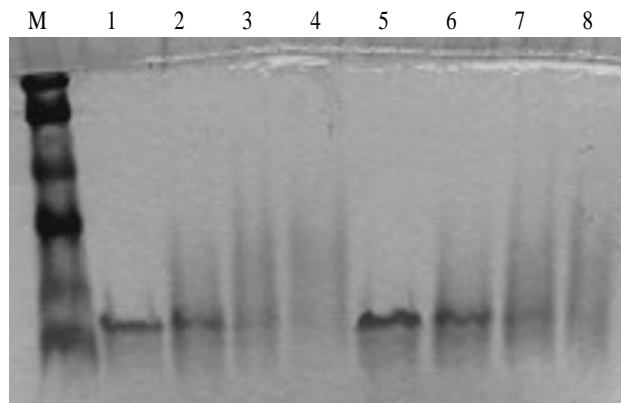


Abb. 5: Verlust von  $\beta$ A4-Monomer bei Inkubation von  $60\mu\text{M}$   $\beta$ A4 /  $50\text{mM}$  Fruktose mit je  $10\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  (Spur 1-4) oder  $10\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$  (Spur 5-8) in  $1\times$  PBS. Alle 24 h wurden je  $5\mu\text{g}$  Amyloid aus dem Reaktionsansatz entnommen und die Ansätze im Tricin/SDS-Gel aufgetrennt.

1; 5 : 0h      2; 6 : 24h      3; 7 : 48h      4; 8 : 72h

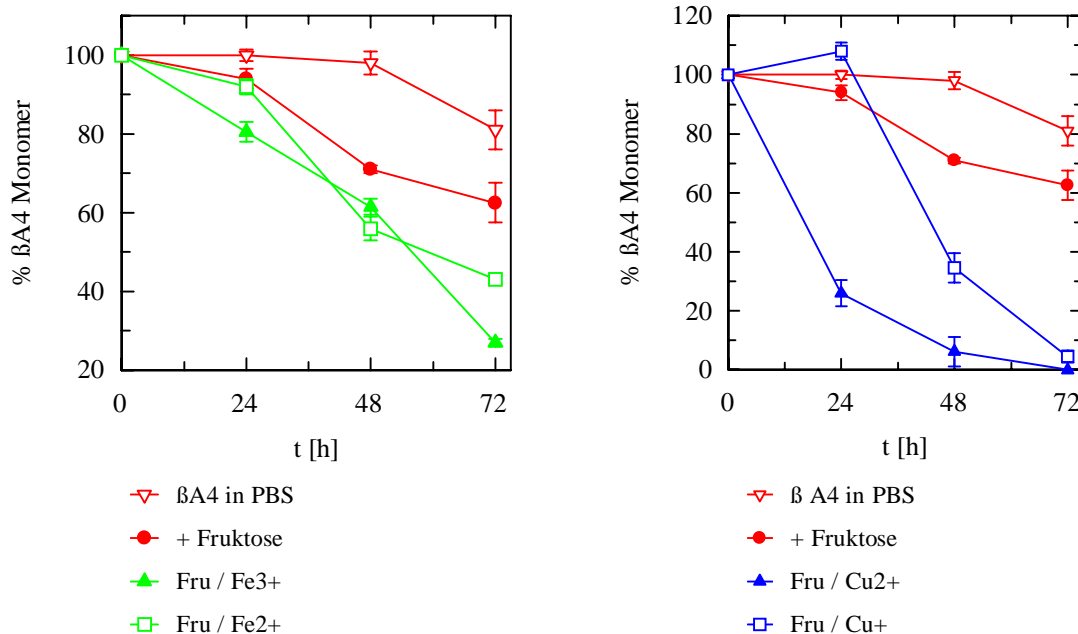


Abb. 6: Beschleunigung der  $\beta$ A4-Vernetzung durch Übergangsmetalle.

Zugabe von je  $10\mu\text{M}$  Metallionen zu Reaktionsansätzen mit je  $60\mu\text{M}$   $\beta$ A4 /  $50\text{mM}$  Fruktose.  $5\mu\text{g}$  Aliquots wurden im SDS/Tricin Gel aufgetrennt und der Verlust an  $\beta$ A4-Monomer densitometrisch bestimmt. (n=3)

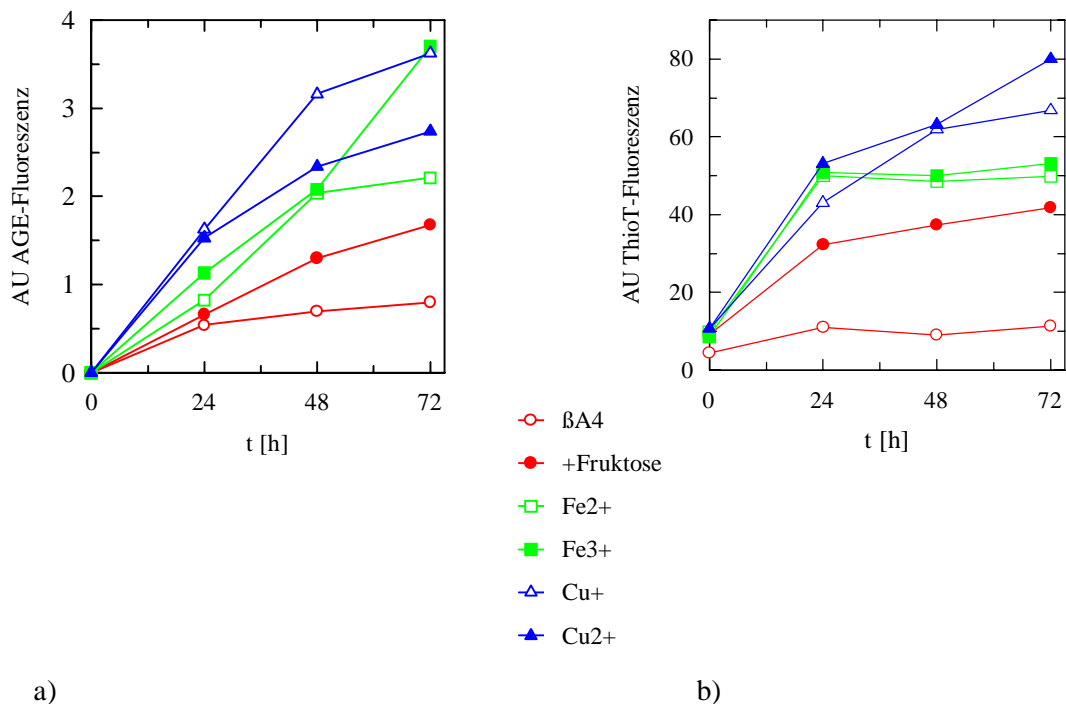


Abb. 7.: AGE-Fluoreszenz (a) und ThioT-Fluoreszenz (b) der "Crosslinking"-ansätze in PBS. Zugabe von je 10 $\mu$ M Metallionen zu Inkubationsansätzen von 60 $\mu$ M  $\beta$ A4 / 50mM Fruktose beschleunigt die Bildung von fibrillärem  $\beta$ A4 (b), die AGE-Fluoreszenz (Exc. 370nm/Em. 440nm) nimmt zu (a).

### 1.5. Auftrennung der $\beta$ A4 Aggregate über FPLC

Obwohl bei der Vernetzung des Amyloids hochmolekulare Peptidaggregate entstehen, sind im Gel allenfalls Di- und Trimere nachzuweisen. Im Westernblot mit  $\beta$ A4-Antikörpern erscheinen grössere Aggregate als diffuse Proteinbanden (nicht gezeigt). Ausserdem entstehen bei der Inkubation von  $\beta$ A4 mit Zuckern und Metallionen über freie Radikale möglicherweise auch Degradationsprodukte von  $\beta$ A4, die ebenfalls im Gel nicht detektiert werden. Daher wurden Reaktionsansätze mit 60 $\mu$ M  $\beta$ A4, 50mM Fruktose und je 10 $\mu$ M Eisen- oder Kupferionen nach 72-stündiger Inkubation bei 50°C mittels FPLC über eine Sephadex Säule des Trennbereichs 3 kDa - 70 kDa aufgetrennt, die Monomere von höhermolekularen Aggregaten trennt.

Beim Vernetzen von  $\beta$ A4 mit Fruktose entstanden höhermolekulare Aggregate, die wegen der Ausschlussgrenze der Säule zusammen als Peak bei ca. 70 kDa erscheinen, während die Menge des Monomers abnimmt. Sowohl mit Cu<sup>2+</sup> als auch mit Fe<sup>3+</sup> entstehen Oligomere ähnlicher Grösse, zusätzlich finden sich bei dem mit Eisen inkubierten Ansatz jedoch auch Produkte, die kleiner sind als das Ausgangspeptid. Dies deutet auf eine radikalinduzierte Degradation des Peptids durch Eisen, weniger durch Kupfer hin. Fügt man einem Testansatz mit Cu<sup>2+</sup> bei

Beginn der Inkubation den Metallchelator DTPA zu (1mM), ist die Proteinvernetzung deutlich verlangsamt.

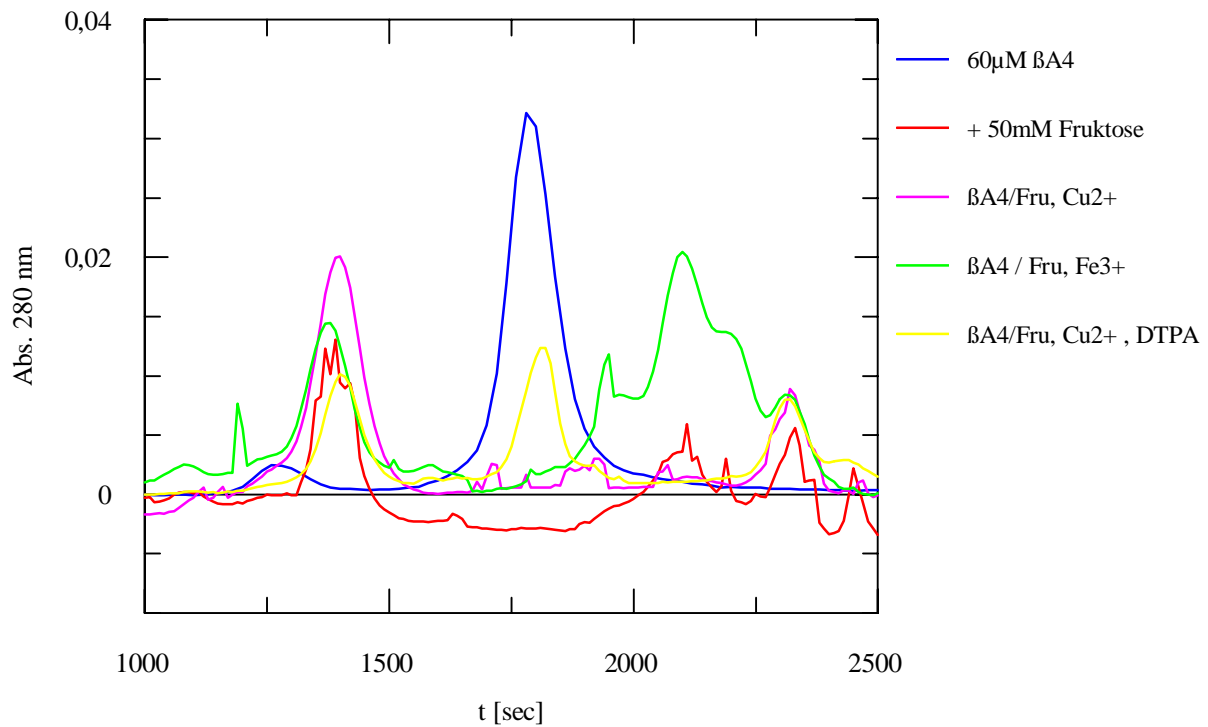


Abb. 8 : Auftrennung von "Crosslinking"-ansätzen über FPLC.

Je 250µg/ml βA4 wurden über eine Sephadexsäule aufgetrennt, die Säule wurde in PBS äquilibriert, die Flussrate war 0,5ml / min.

### **1.6. Inhibition der Peptidvernetzung durch Metallchelatoren und Antioxidantien**

Um die Wirksamkeit von Metallchelatoren und Antioxidantien als Inhibitoren der Peptidvernetzung zu untersuchen, wurde 60µM βA4 mit 50mM Fruktose und den zu testenden Substanzen in 50mM PB bei 50°C inkubiert.

Durch Zugabe von Metallchelatoren kann die βA4-Vernetzung wie unter 1.5. bereits erwähnt, deutlich verlangsamt werden, was eine übergangsmetallkatalysierte Oxidation des glykierten Proteins nahelegt. Die Effektivität der Chelatoren wird vermutlich durch die verbleibende Redoxaktivität der chelierten Metalle bestimmt.

Penicillamin bindet Kupfer, Eisen und Aluminium, die Metalle bleiben aber in ihrer redox-aktiven Form und können zwischen zwei Oxidationsstufen hin- und herwechseln. DTPA cheliert Metallionen dagegen in ihrer redox-inaktiven Form. Während Penicillamin nahezu unwirksam ist, verhindert die Zugabe von 1mM DTPA die Bildung von glykiertem Amyloid fast vollständig (Abb. 9a)

Thiolantioxidantien wie N-Acetylcystein (NAC) haben neben ihren antioxidativen Eigenschaften die Fähigkeit, Metalle zu chelieren und reaktive Carbonyle abzufangen und können daher erfolgreich als Inhibitoren der  $\beta$ A4-Vernetzung eingesetzt werden.

Acetylsalicylsäure (ASS) wird zum Absättigen nukleophiler Seitenketten von Proteinen eingesetzt. Da solche Seitengruppen wie z.B. Lysin, Cystein oder Arginin für die AGE-Bildung notwendig sind, wurde auch die Wirkung von ASS auf die Peptidvernetzung untersucht.

Wie erwartet, hemmt auch die Zugabe von Acetylsalicylsäure zum Reaktionsansatz die  $\beta$ A4 - Vernetzung, vermutlich durch eine kovalente Modifikation der Lysinseitenkette. (Abb. 9b)

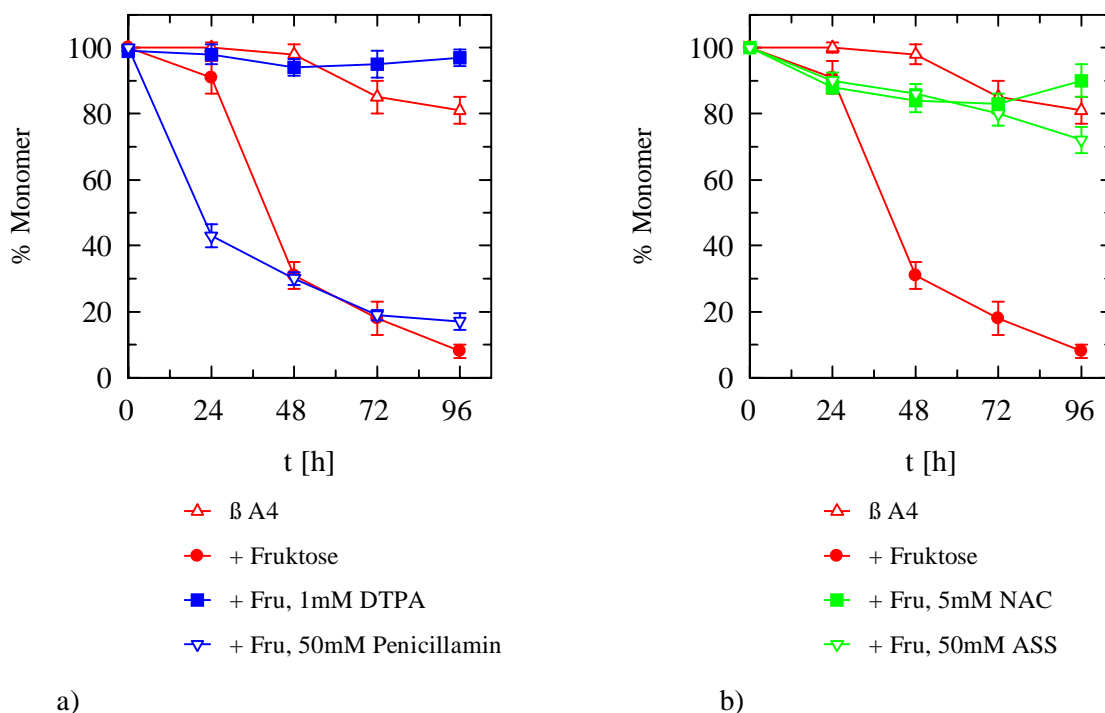


Abb. 9: Inhibition der Peptidvernetzung durch Metallchelatoren und Antioxidantien.

$60\mu\text{M}$   $\beta$ A4 in PB wurden mit 50mM Fruktose und Inhibitoren in den angegebenen Konzentrationen bei  $50^\circ\text{C}$  inkubiert. Der Verlust an  $\beta$ A4-Monomer wurde nach SDS-PAGE von je  $5\mu\text{g}$  Peptid pro Zeitpunkt densitometrisch bestimmt. (n=3)



## 2. Zytotoxizität von "Advanced Glycation Endproducts"

### 2.1. Herstellung und Charakterisierung verschiedener Protein - AGEs

AGEs stellen eine sehr heterogene Substanzklasse dar, nur wenige Einzelkomponenten sind strukturell analysiert. Durch die Herstellung verschiedener Protein-AGEs sollte versucht werden, reproduzierbar Modell-AGEs für Toxizitätsversuche herzustellen. Ausserdem sollte untersucht werden, ob die chemischen Charakteristika der AGEs möglicherweise mit der Zytotoxizität, d.h. der LD<sub>50</sub> der AGEs korrelieren.

Es wurden 7 BSA-AGEs und 5 Ovalbumin-AGE Präparationen hergestellt und auf AGE-Gehalt pro Milligramm Protein, Fluoreszenz<sub>370/440nm</sub>, OD<sub>360nm</sub> und OD<sub>400nm</sub>, Produktion von Radikalen *in vitro*, Toxizität und Gehalt an N-ε-Carboxymethyl-Lysin (CML) getestet.

Zusammensetzung und Charakteristika dieser AGE Präparationen sind in den nachfolgenden Tabellen zusammengefasst:

Tab.1 : Ovalbumin-AGEs

Nr.	3	6	7	10	11
Zucker	Glu + Fru	Fruktose	Fruktose	Glu + Fru	Glukose
[t] Wochen	8	7	7	6	8
OD <sub>360</sub>	9,3	21,7	16,6	5,6	2,5
OD <sub>400</sub>	5	10,5	8	3,5	1,3
Protein [mg/ml]	10,56	17,12	16,8	1,3	17
OD <sub>360</sub> /mg	0,88	1,26	1	4,3	0,36
OD <sub>400</sub> /mg	0,47	0,61	0,47	2,7	0,08
Fluoreszenz [AU/mg]	3,74·10 <sup>6</sup>	2,2·10 <sup>7</sup>	9,8·10 <sup>6</sup>	6,2·10 <sup>5</sup>	2,1·10 <sup>6</sup>
LD <sub>50</sub> [μM] MTT	50	30	40	20	80
LD <sub>50</sub> NR	50	n.t.	40	30	n.t.
LD <sub>50</sub> LDH	n.t.	n.t.	40	n.t.	n.t.
O <sup>2-</sup> [mol/mg]	4,4·10 <sup>-7</sup>	5,9·10 <sup>-7</sup>	7,55·10 <sup>-7</sup>	9·10 <sup>-7</sup>	2,15·10 <sup>-7</sup>
CML [ng/mg]	4,258·10 <sup>5</sup>	n.t.	61,577·10 <sup>5</sup>	19,256·10 <sup>5</sup>	2,8215·10 <sup>5</sup>
Anmer- kungen				2mM Ovalbumin	0,5M Glukose

Tab. 2: BSA-AGEs

Nr.	1	2	4	5	8	9	12
Zucker	Glu + Fru	Glu + Fru	Glu + Fru	Fruktose	Glu + Fru	Glukose	Glukose
[t] Wochen	6	6	8	6	6	7	9
OD <sub>360</sub>	12,3	10,9	9,6	9	28,6	29	9
OD <sub>400</sub>	7	6	5,5	4	14,5	15	4,8
Protein [mg/ml]	11,54	14	15,3	11,17	24	25	20,6
OD <sub>360</sub> / mg	1,06	0,7	0,63	0,8	1,43	1,12	0,45
OD <sub>400</sub> / mg	0,6	0,43	0,36	0,36	0,6	0,56	0,24
Fluores- zenz [AU/mg]	$5,48 \cdot 10^6$	$1,86 \cdot 10^7$	$3,8 \cdot 10^6$	$5,74 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^7$	$8 \cdot 10^6$	$9,4 \cdot 10^6$
LD <sub>50</sub> [ $\mu$ M]							
MTT	100	110	115	120	120	160	<200 $\mu$ M
LD <sub>50</sub> NR	110	115	110	125	130	150	"
LD <sub>50</sub> LDH							"
	75	90	105	110	120	150	
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> [mol/mg]	$4,3 \cdot 10^{-7}$	$5,91 \cdot 10^{-7}$	$6,13 \cdot 10^{-7}$	$5,05 \cdot 10^{-7}$	$1,36 \cdot 10^{-6}$	$1,25 \cdot 10^{-6}$	$4,4 \cdot 10^{-7}$
CML [ng/mg]	$4,38 \cdot 10^5$	$28,19 \cdot 10^5$	$5,146 \cdot 10^5$	$24,71 \cdot 10^5$	$26,38 \cdot 10^5$	$4,4 \cdot 10^5$	$1,44 \cdot 10^5$
Anmer- kungen						nur 0,5 M Glukose	bei 37°C inkubiert

Es zeigte sich, dass sich die AGE-Präparationen untereinander auch bei gleichen Reaktionsbedingungen stark unterscheiden. Reproduzierbare Ergebnisse in den Zellkulturexperimenten liessen sich jeweils nur mit der gleichen AGE-Präparation erzielen. Ein zuverlässiger Rückschluss von den verwendeten Reaktionsbedingungen auf die Toxizität der AGEs erwies sich als schwierig. Durch die Auswahl des Zuckers und der Inkubationstemperatur lässt sich die Bildung toxischer AGEs allerdings unterstützen.

Zusammenfassend lässt sich folgendes feststellen :

1.) Die Toxizität der Modell-AGEs ist abhängig vom verwendeten Protein. Die LD<sub>50</sub> aller Ovalbumin-AGEs liegen deutlich unter denen der BSA-AGEs.

2.) Die Toxizität der Modell-AGEs ist abhängig vom verwendeten Zucker.

Fruktose- oder Fruktose-Glukose AGEs sind bei ähnlichem AGE-Gehalt, Fluoreszenz und CML-Gehalt toxischer als nur mit Glukose hergestellte AGEs (vgl. z.B. AGEs Nr.1 + 9).

3.) Die Toxizität verschiedener AGE-Präparationen steigt mit dem Grad der AGE Modifikation, d.h. mit steigender OD pro mg Protein.

Sie korreliert mit der Inkubationszeit der AGEs.

Korrelationskoeffizient für BSA-AGEs:

LD<sub>50</sub> MTT / Inkubationszeit [Wochen] : r = 0,784\* (p < 0,05)

4.) Die direkte Radikalproduktion der AGE-Präparationen, gemessen über die Reduktion von Cyt c durch AGEs, korreliert mit der direkten Zytotoxizität, der OD und dem Proteingehalt der Präparationen und kann daher als Maß zur Beurteilung der Toxizität herangezogen werden.

Korrelationskoeffizienten für BSA-AGE:

Radikalproduktion / LD<sub>50</sub> MTT : r = 0,866 \* (p < 0,05)

Radikalproduktion / OD<sub>360nm</sub> : r = 0,924 \* (p < 0,05)

Radikalproduktion / Proteingehalt : r = 0,962 \*\* (p < 0,001)

5.) Die Menge des AGEs N-ε-Carboxymethyllysin (CML) in den AGE-Präparationen korreliert mit der Fluoreszenz (Exc. 370nm / Em. 440nm), hat aber keine Bedeutung für die direkte Toxizität des jeweiligen AGEs.

Korrelationskoeffizienten für BSA-AGE:

CML-Gehalt / Fluoreszenz : r = 0,792 \* (p < 0,05)

CML-Gehalt / LD<sub>50</sub> MTT : nicht signifikant

## **2.2. Direkte Toxizität von AGEs**

Die direkte Toxizität von AGEs auf Zellen wurde mit zwei klonalen Zelllinien getestet: BHK 21 Fibroblasten und SH-SY5Y Neuroblastoma Zellen.

Um auszuschliessen, dass die beobachteten Effekte von Modell-AGEs auf Zellen durch LPS-Kontamination der AGE-Präparationen zurückzuführen sind, wurden im Folgenden ausschliesslich AGEs verwendet, die im Limulustest als Endotoxinfrei charakterisiert wurden, d.h. der Endotoxingehalt der Präparationen lag unter der Nachweisgrenze des Tests.

Die Zellvitalität wurde mit drei verschiedenen Assays bestimmt. Der MTT Test erfasst die Aktivität von Enzymen der mitochondrialen Atmungskette und cytosolischer, NADH-abhängiger Enzyme, die Aufnahme von Neutralrot dient als Marker für die aktive Phagozytose. Das Erscheinen des zytoplasmatischen Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) im Kulturüberstand weist auf Zell- und Membranschäden hin.

Wenn nicht anders angegeben, erfolgten die Testansätze dreifach, aufgetragen wurden die Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Assays.

### **2.2.1. Toxizität von BSA- und Ovalbumin-AGEs**

SH-SY5Y-Zellen und BHK21-Zellen wurden mit AGEs in verschiedenen Konzentrationen inkubiert und der Prozentsatz vitaler Zellen nach 24 h mit dem MTT-Assay (MTT), dem LDH-Assay (LDH) oder durch die Aufnahme von Neutralrot (Neutralrot) bestimmt.

BSA - und Ovalbumin - AGE führten dosisabhängig zum Absterben vom BHK 21 Fibroblasten und SH-SY5Y Neuroblastoma Zellen, beide Zelllinien reagierten ähnlich empfindlich. Die unmodifizierten Proteine waren nicht toxisch (Abb. 10-12).

Alle Viabilitätsassays lieferten vergleichbare Ergebnisse mit ähnlichen LD<sub>50</sub> Werten, was darauf hindeutet, dass eine definierte Fraktion der Zellen tatsächlich zerstört ist. Auf den Mechanismus des Zelltods ergibt sich daraus kein Hinweis.

Die LD<sub>50</sub> Werte differierten zwischen den einzelnen AGE - Präparationen (Abb. 10, 11; siehe auch 2.1.). Für BSA-AGE bewegt sich der LD<sub>50</sub> Wert nach 24-stündiger Inkubation von Zellen mit dem Toxin zwischen 100µM und 180µM (Abb. 11), für Ovalbumin-AGE mit 20µM bis 80µM deutlich darunter (Abb. 12). Anhand verschiedener AGE Präparationen konnte gezeigt werden, dass die Toxizität von AGEs mit dem Grad der AGE Modifikation steigt. Dabei erwiesen sich Fruktose- oder Fruktose / Glukose AGEs als toxischer als nur mit Glukose hergestellte AGEs (siehe auch 2.1).

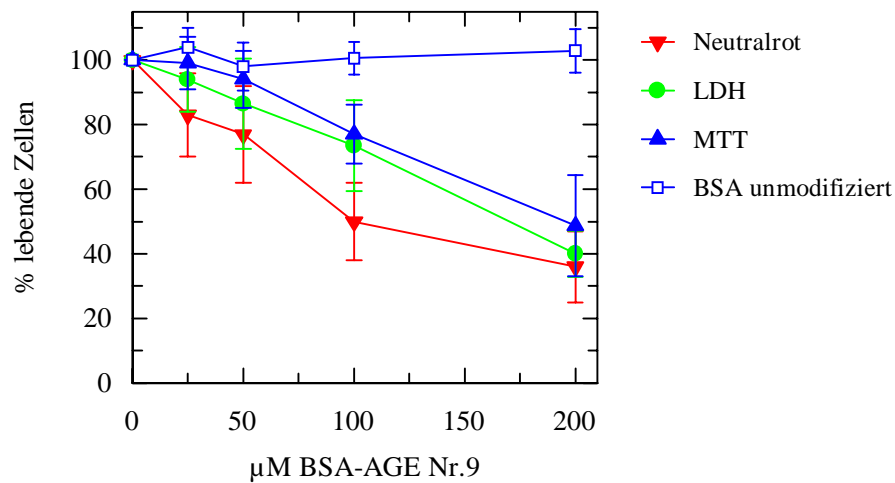


Abb.10: Toxizität von Glukose-BSA-AGE Nr.9 auf SH-SY5Y Neuroblastoma Zellen. Die Zellen wurden für 24h mit BSA-AGE und unmodifiziertem BSA (nur MTT-Assay) in verschiedenen Konzentrationen inkubiert, die Vitalität der Zellen wurde mit 3 verschiedenen Assays getestet die ähnliche Ergebnisse zeigten. (n=5)

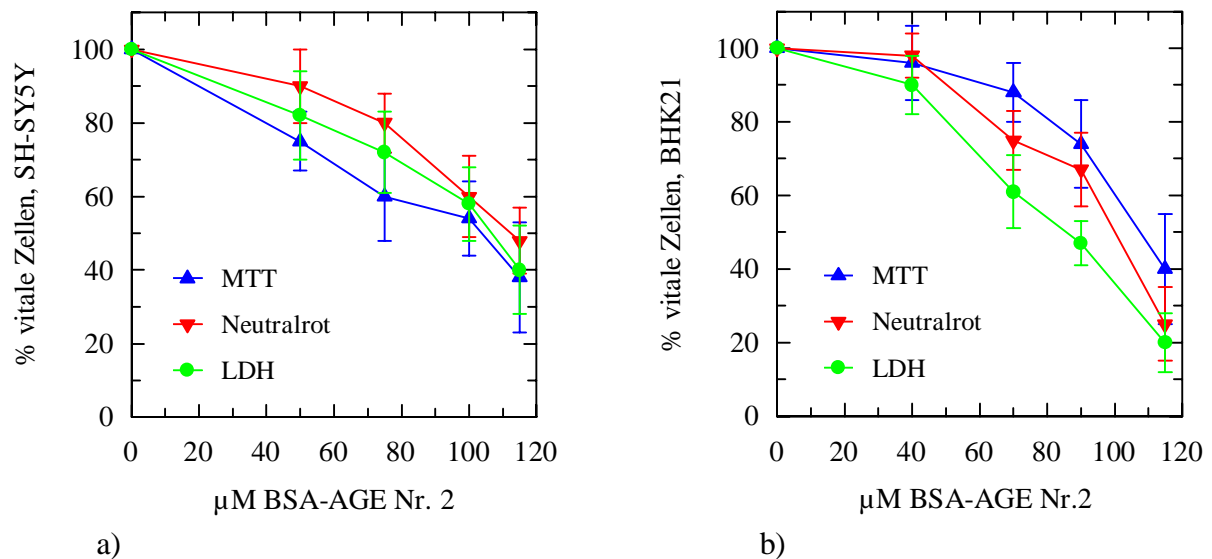


Abb. 11: Toxizität von Glukose/Fruktose-BSA- AGE Nr. 2 auf SH-SY5Y Zellen (a) und BHK21 Zellen (b)

Die Zellen wurden mit BSA-AGE in verschiedene Konzentrationen für 24h inkubiert und der Prozentsatz lebender Zellen mit 3 verschiedenen Assays bestimmt. (n=4)

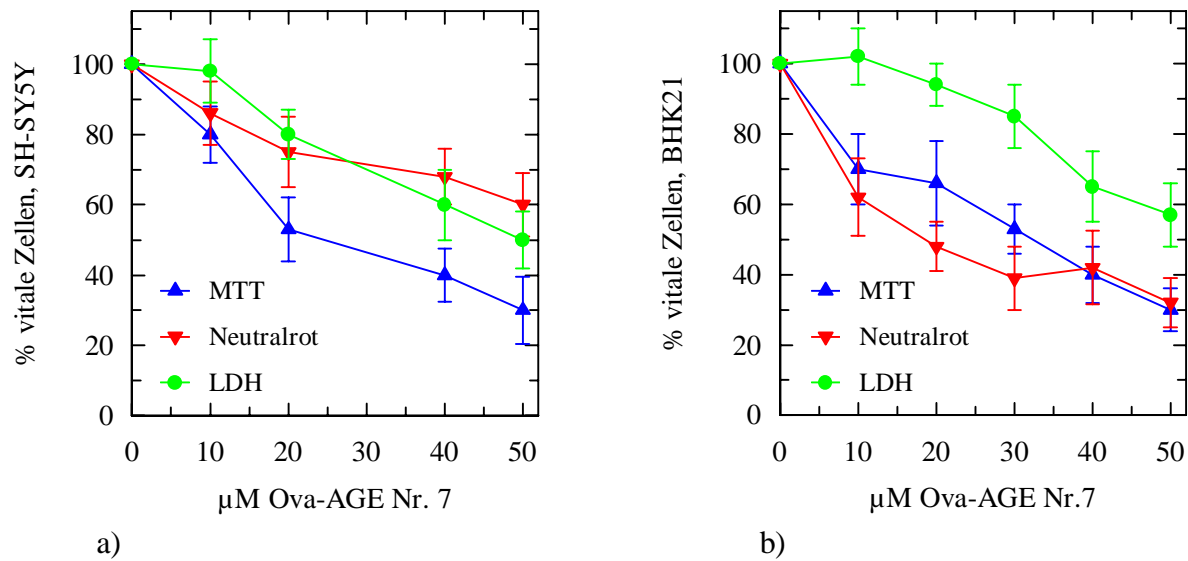


Abb. 12: Toxizität von Fruktose-Ovalbumin AGE Nr.7 auf SH-SY5Y Zellen (a) und BHK21 Zellen (b) Die Zellen wurden mit Ovalbumin AGE in verschiedenen Konzentrationen für 24h inkubiert und der Prozentsatz lebender Zellen mit 3 verschiedenen Assays bestimmt. (n=4)

### 2.2.2. Dosis-Zeit-Abhängigkeit der Toxizität

AGEs führen nicht nur dosis- sondern auch zeitabhängig zur Inhibition der mitochondrialen Respiration. SH-SY5Y Zellen wurden mit 50µM, 100µM oder 180µM BSA-AGE Nr.9 für 6 bis 72 h inkubiert und die Zellvitalität mit dem MTT-Test bestimmt. 180µM AGEs entsprechen dabei der LD<sub>50</sub> für t=24h. Nach 6h Inkubation mit AGEs konnte keine Funktionseinbuße der mitochondrialen Respiration festgestellt werden. Nach 24 h kam es mit allen getesteten AGE-Konzentrationen zu einer Inhibition der mitochondrialen Funktion und zum Absterben von Zellen, bei längerer Inkubation verstärkt sich der Effekt. Bei Inkubation von SH-SY5Y Zellen mit 180µM BSA-AGE sind nach 48 h 60% der Zellen abgestorben. Nach 72-stündiger Inkubation ist die Zahl vitaler Zellen auf >5% gesunken (Abb.13).

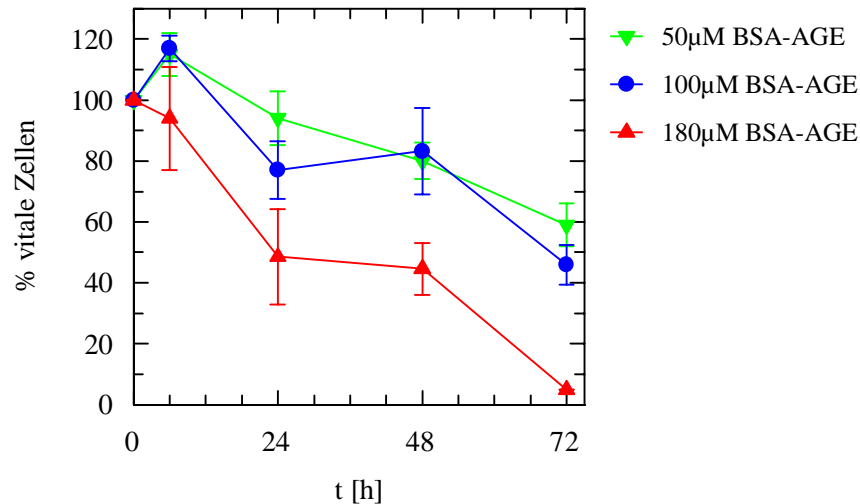


Abb. 13: Die Toxizität von AGEs ist zeit- und dosisabhängig.

SY5Y-Zellen wurden mit 50µM, 100µM oder 180µM ( $LD_{50}$  für  $t=24h$ ) BSA-AGE Nr.9 für die angegebenen Zeiten inkubiert und die Zahl vitaler Zellen im MTT-Assay bestimmt.

### 2.2.3. Zeitverlauf der AGE Bildung

Um eine Kinetik der BSA-AGE Bildung aufzunehmen, wurde von aus dem Reaktionsansatz für das Glukose/BSA-AGE Nr.9 im Laufe der Inkubation jede Woche ein Aliquot entnommen. Die Aliquots wurden aufgearbeitet wie unter "Methoden" beschrieben und die chemischen Charakteristika der unterschiedlich modifizierten Proben bestimmt (Tabelle 3).

Alle getesteten Parameter nahmen zeitabhängig zu, zytotoxische Wirkung zeigte jedoch erst das nach 5 Wochen nahezu maximal modifizierte BSA-AGE bei einer  $LD_{50}$  von 200µM im MTT-Test (Abb.14). BSA, das nach 1 bis 3-wöchiger Inkubation nur wenig AGE-modifiziert ist, ist in den getesteten Konzentrationen nicht zytotoxisch.

Tab. 3

	t1	t2	t3	t4	t5
Inkubationszeit	1 Woche	2 Wochen	3 Wochen	4 Wochen	5 Wochen
OD360	3,6	4,6	5,9	15,3	18,3
OD400	1,7	2,2	2,8	6,5	8,2
Protein[mg/ml]	20	20	21	22	24
OD360/mg	0,18	0,23	0,28	0,69	0,76
OD400/mg	0,085	0,11	0,13	0,29	0,34
Fluoreszenz [AU/mg]	$3,67 \cdot 10^5$	$1,62 \cdot 10^6$	$2,68 \cdot 10^6$	$9,6 \cdot 10^6$	$9,72 \cdot 10^6$
O <sup>2-</sup> [mol/mg]	$5,37 \cdot 10^{-7}$	$6,45 \cdot 10^{-7}$	$7,52 \cdot 10^{-7}$	$1,29 \cdot 10^{-6}$	$1,18 \cdot 10^{-6}$
CML [ng/mg]	150,65	267,15	353,3	917,5	1758

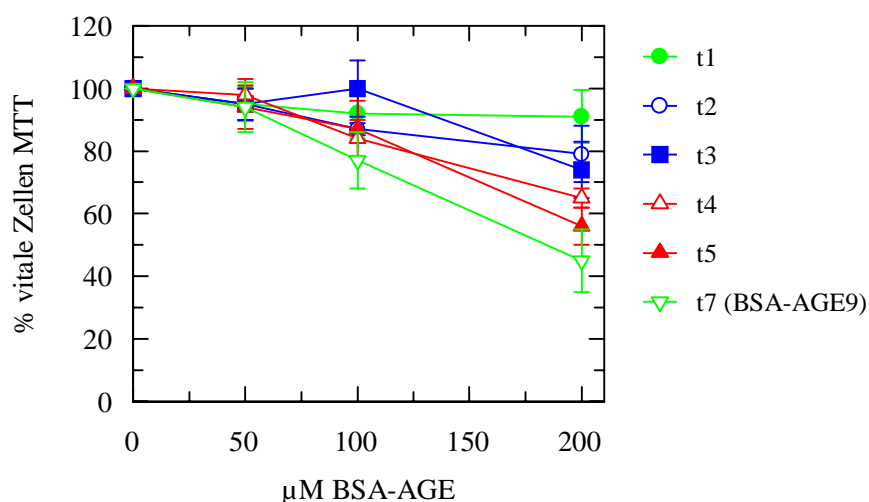


Abb. 14: Abhängigkeit der Toxizität einer BSA-AGE Präparation vom Grad der AGE-Modifikation. Für 1-5 Wochen AGE-modifiziertes BSA wurde im MTT-Assay auf Zytotoxizität getestet (t=24h), zum Vergleich wurde maximal modifiziertes BSA-AGE Nr.9 (t= 7Wochen) mitaufgetragen.

#### 2.2.4.Toxizität von $\beta$ A4 und $\beta$ A4 -AGE-AGE

Eine zentrale Rolle des Amyloids bei der Pathogenese der AD ist wahrscheinlich, die einfache Hypothese direkter Neurotoxizität ist jedoch umstritten. Histochemische Untersuchungen zeigen eine hohe AGE-Beladung von Amyloidplaques im Gehirn von AD Patienten. Deshalb wurde getestet, ob Amyloid-AGE ( $\beta$ A4-AGE) toxischer auf SH-SY5Y Zellen ist als fibrilläres (=gealtertes)  $\beta$ A4. Fibrilläres  $\beta$ A4 wurde durch 4-tägige Inkubation von A $\beta$ (1-40) in PBS bei 50°C hergestellt.  $\beta$ A4-AGE wurde durch 10-wöchige Inkubation von  $\beta$ A4 mit Glukose hergestellt und aufgearbeitet wie beschrieben.

Die chemischen Charakteristika der  $\beta$ A4-AGE Präparation sind in Tab. 4 zusammengefasst:

Tab.4

$\beta$ A4-AGE	
Protein [mg/ml]	2
OD <sub>360nm</sub>	0,72
OD <sub>400nm</sub>	0,63
OD <sub>360nm</sub> /mg	0,36
OD <sub>400nm</sub> /mg	0,315
Fluoreszenz <sub>370/440nm</sub> [AU/mg]	3,16·10 <sup>6</sup>
CML ng/mg	20



Die Neurotoxizität von  $\beta$ A4-AGE wurde mit dem MTT-Assay bestimmt. SH-SY5Y Zellen wurden für 24h, 48h und 72h mit präaggregiertem  $\beta$ A4 oder  $\beta$ A4-AGE in 2 verschiedenen Konzentrationen inkubiert (50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M). Bei Inkubationszeiten unter 24h konnte weder für fibrilläres  $\beta$ A4 noch für  $\beta$ A4-AGE eine toxische Wirkung festgestellt werden (nicht gezeigt). Frisch gelöstes, nicht aggregiertes Amyloid ist nicht toxisch, das nach 5-tägiger Präaggregation bei 50°C gebildete, fibrilläre Amyloid führt zu Einbußen in der mitochondrialen Respiration der Zellen um maximal 10% (50 $\mu$ M) bzw. 25% (100 $\mu$ M). Im Vergleich dazu ist  $\beta$ A4-AGE reaktiver. Während bei Inkubation mit fibrillärem Amyloid nach 48h noch etwa 85% der Zellen vital sind, sind es bei  $\beta$ A4-AGE nur noch 70% (Abb.15). Eine toxische Wirkung wird erst im mikromolaren Bereich erreicht. Diese Konzentration ist etwa 1000x höher als im CSF des Menschen, kann aber im Amyloidplaque möglicherweise lokal erreicht werden.

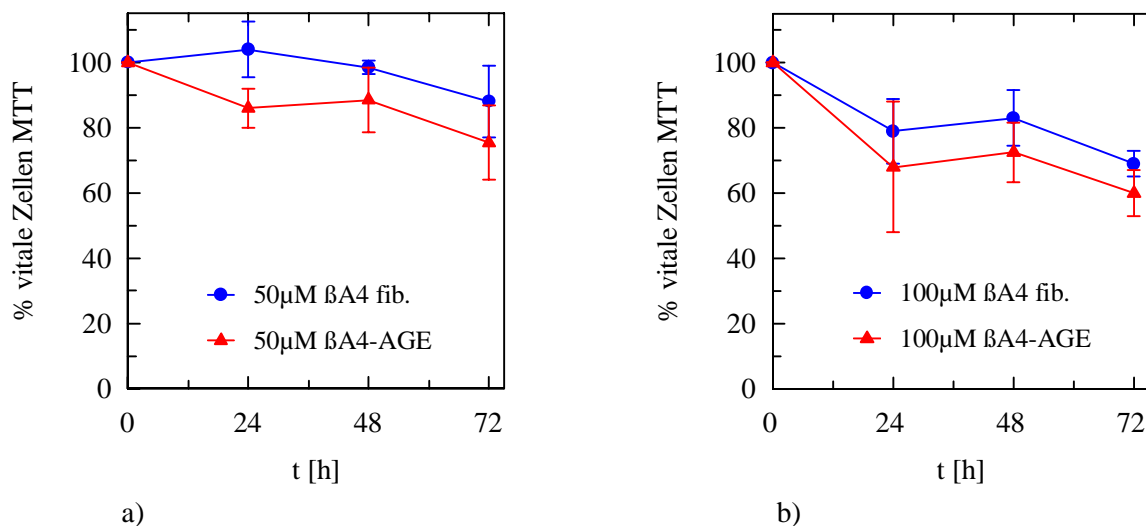


Abb. 15: Toxizität von fibrillärem  $\beta$ A4 und  $\beta$ A4-AGE.

Es wurden 50 $\mu$ M (a) und 100 $\mu$ M (b)  $\beta$ A4 und  $\beta$ A4-AGE eingesetzt und die Zellvitalität nach 24, 48 und 72h im MTT-Assay bestimmt.  $\beta$ A4-AGE führt dosis- und zeitabhängig zu verminderter mitochondrialer Respiration und zum Zelltod von SY5Y Zellen. Im Vergleich dazu ist fibrilläres  $\beta$ A4 weniger toxisch.

Das 10-mer  $\beta$ A4 (25-35) gilt als reaktiver Teil von  $\beta$ A4 und hat die Fähigkeit, schnell Aggregate zu bilden. Die Toxizität dieses Fragments auf SH-SY5Y Zellen wurde im MTT-Assay getestet und mit einem Kontrollpeptid zufälliger Sequenz verglichen.

Nach 24 - 48 h Inkubation mit je 100 $\mu$ M der verschiedenen Peptide zeigte sich, dass die getesteten 10-mer Ergebnisse lieferten, die dem nicht glykierten, präaggregierten Amyloid ähnelten. Das 25-35 Fragment war im MTT-Test jedoch nicht toxischer als das Kontrollpeptid (25-35 scrambled).

Zusätzlich wurde ein Kontrollpeptid getestet, das für 6 Wochen mit 50mM Glukose inkubiert wurde (25-35 scr. glykiert). Im Gegensatz zum Ursprungspeptid war das glykierte 10-mer toxisch. Auch die Glykierung von  $\beta$ A4(25-35) führte zu einer Steigerung der Toxizität (Abb. 16).

Dies bestätigt, dass Glykierung zur Toxizität eines Proteins beiträgt bzw. dazu führt, dass Proteine zytotoxisch wirken.

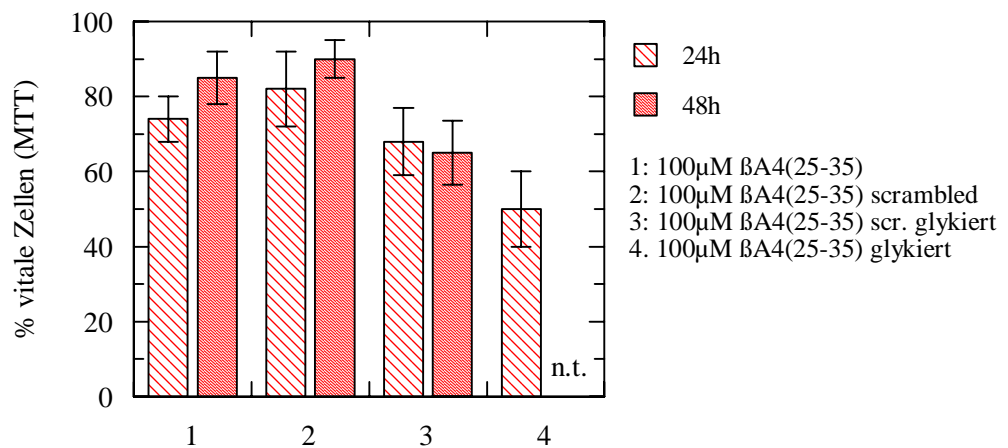


Abb. 16: Toxizität von  $\beta$ A4 (25-35)

SH-SY5Y Zellen wurden mit je 100µM  $\beta$ A4 (25-35), Kontrollpeptid (25-35 scrambled) oder den glykierten Peptiden inkubiert. Im MTT-Assay zeigte sich, daß die  $\beta$ A4 (25-35) Toxizität etwa der von fibrillärem  $\beta$ A4 entspricht. Die Glykierung führt zu einer deutlichen Zunahme der Toxizität aller Peptide.

### **2.3. Abschwächung der AGE Toxizität**

Zum Verständnis der Prozesse, die der AGE vermittelten Zytotoxizität zu Grunde liegen, wurde versucht, den Zelltod durch die Zugabe verschiedener Substanzen, die mit AGEs oder den durch sie ausgelösten Signalwegen interagieren, zu verhindern.

Dafür wurden Intermediate des Zitratzyklus, verschiedene Antioxidantien sowie AGE-Inhibitoren eingesetzt. Ausserdem wurden zwei verschiedene, polyklonale RAGE-Antikörper und RAGE antisense-Oligos auf ihren protektiven Effekt auf die Toxizität getestet, um einen ersten Einblick in die Rolle RAGE-vermittelter Signalwege bei der AGE-Toxizität zu erhalten. Es wurden BHK21 Zellen mit BSA-AGE Nr.1 sowie SH-SY5Y Zellen mit BSA-AGE Nr.9 verwendet, es wurde jeweils die unter 2.1. ermittelte LD<sub>50</sub> der BSA-AGE Präparationen eingesetzt.

Soweit nicht anders angegeben wurde die Zellvitalität im MTT-Assay getestet. Dieser hat sich als sensitiv und reproduzierbar erwiesen. Der LDH-Assay zeigte sich als nur bedingt geeignet, da zahlreiche Substanzen, z.B. N-Acetylcystein, mit der Indikatorreaktion interferieren.

### **2.3.1. Antioxidantien, Radikalfänger und Stoffwechselintermediate**

#### **a) Stoffwechselintermediate**

Pyruvat als Endprodukt der Glykolyse und Substrat für die oxidative Decarboxylierung wurde verwendet, um den Energiestatus der AGE-gestressten Zellen zu unterstützen und ggf. anzuheben. Nach 1-stündiger Vorinkubation von Zellen mit 2mM Pyruvat fanden sich nach Inkubation mit Pyruvat und der LD<sub>50</sub> BSA-AGEs etwa 20% mehr vitale Zellen als ohne Pyruvat (MTT-Assay). Auch 5mM  $\alpha$ -Ketoglutarat hatte nach 1-stündiger Vorinkubation protektive Wirkung. Da  $\alpha$ -Ketocarbonsäuren auch als Radikalscavenger wirken können, wurde getestet, ob die  $\alpha$ -Ketocarbonsäure NPGA, die nicht verstoffwechselt werden kann, aber ein Radikalfänger ist, protektiv wirkt (Abb.17). Die Tatsache, dass NPGA (5mM, 1h vor AGE-Gabe) weniger gut gegen AGE-Toxizität schützt, deutet darauf hin, dass Pyruvat und  $\alpha$ -Ketoglutarat tatsächlich auch stoffwechsel-supplementierend und nicht ausschliesslich antioxidativ wirken. Ein weiterer Hinweis darauf ist die Beobachtung, dass Pyruvat und  $\alpha$ -Ketoglutarat weniger effektiv gegen AGE-vermittelte Toxizität schützen, wenn sie nicht vor den AGEs sondern gleichzeitig mit ihnen gegeben werden.

#### **b) Aminoguanidin**

Auch die 1-stündige Vorinkubation der Zellen mit 5mM Aminoguanidin ist protektiv und führt zu etwa 30% mehr vitalen Zellen im Vergleich zu Zellen, die nur mit der LD<sub>50</sub> BSA-AGE inkubiert wurden (Abb.17). Aminoguanidin reagiert mit reaktiven Dicarbonylverbindungen und ist damit ein Inhibitor der AGE-Bildung. Es ist jedoch auch ein Inhibitor der NO-Synthase. Die protektive Wirkung von Aminoguanidin kann daher sowohl auf das Abfangen reaktiver Carbonylverbindungen als auch auf die Verminderung der NO-Produktion und die daraus resultierende Verringerung der Peroxynitritbildung (aus  $\text{NO} + \text{O}_2^{\cdot -} = \text{ONOO}$ ) zurückzuführen sein.

#### **c) Thiolantioxidantien**

Das Thiol-Antioxidans Liponsäure ist, besonders in der reduzierten Form Dihydrolipoat, ein potentes Antioxidans. Durch Redox-Cycling trägt es zur Regeneration anderer Antioxidantien wie Vitamin E, reduziertem Glutathion und Vitamin C bei. Liponamid ist ausserdem ein wichtiger Cofaktor verschiedener Enzymsysteme so z.B. bei der oxidativen Decarboxylierung in der Pyruvat-Dehydrogenase.

Von allen getesteten Substanzen erwies sich Liponsäure als am wirksamsten (Abb.17). Bereits bei gleichzeitiger Gabe von AGEs und (R+)  $\alpha$ -Liponsäure zeigt sich im MTT Assay ein protektiver Effekt, der durch mehrstündige Vorinkubation der Zellen mit dem Antioxidans deutlich verstärkt werden konnte.

Nach 6 -stündiger Präinkubation mit 100 $\mu$ M (R+)  $\alpha$ -Liponsäure waren bis zu 90% der AGE behandelten Zellen vital. Da die Gabe von Liponsäure in der oxidierten, weniger aktiven Form erfolgte, lässt sich der Erfolg der Preinkubation u.a. damit erklären, dass die Liponsäure erst von der Zelle aufgenommen und in Dihydroliponsäure überführt wird.

Um zu testen, ob in der Wirksamkeit der beiden Enantiomere der Liponsäure ein Unterschied besteht, wurden BHK21-Zellen für 16h mit je 20 $\mu$ M (R+) oder (S-)  $\alpha$ -Liponsäure vorinkubiert oder  $\alpha$ -Liponsäure wurde ohne Vorinkubation zusammen mit 100 $\mu$ M BSA-AGE Nr.1 zugegeben und die Zahl lebender Zellen nach 24h im MTT-Assay bestimmt. Ein Unterschied zwischen (R+)- und (S-)-Form konnte nicht festgestellt werden (Abb.18). Dies deutet darauf hin, dass der protektiver Effekt hier in der Hauptsache auf die antioxidativen Eigenschaften der Liponsäure zurückzuführen ist.

Als weiteres Thiol-Antioxidans wurde N-Acetylcystein (NAC, 10mM) getestet. Auch NAC ist zytotoxisch (Abb. 17), im Gegensatz zur Liponsäure verstärkt eine Präinkubation aber nicht den protektiven Effekt, da vermutlich die reaktive -SH Gruppe sofort verbraucht und nicht regeneriert wird.

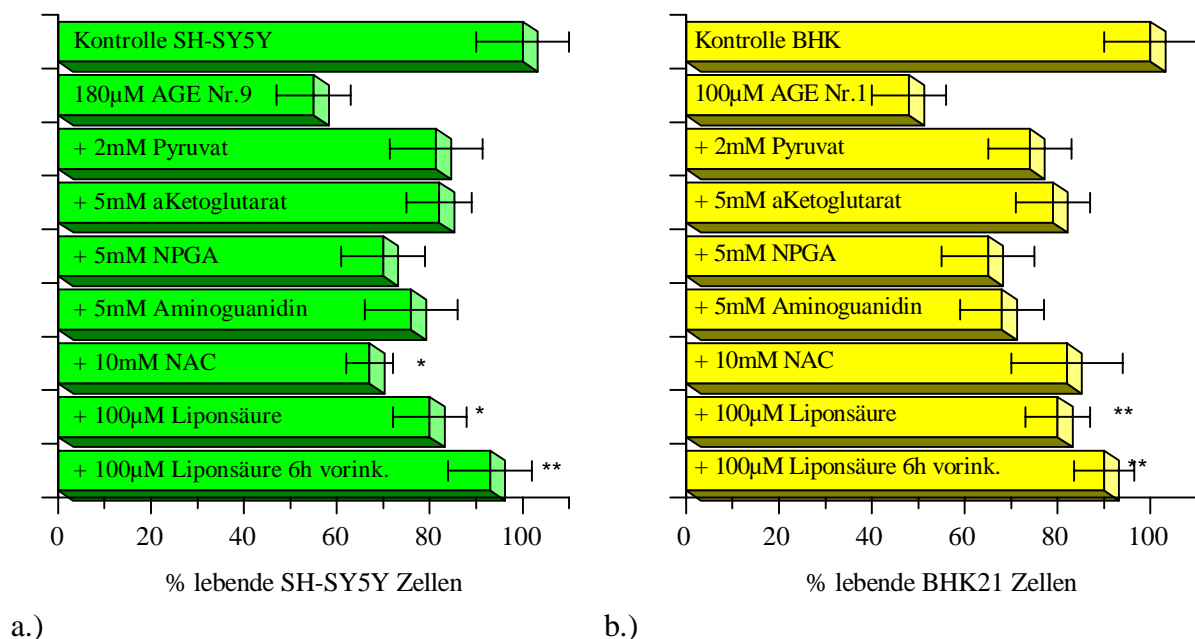


Abb. 17: Abschwächung der AGE-Toxizität durch Antioxidantien und Stoffwechselintermediate. SH-SY5Y Zellen (a) oder BHK21-Zellen (b) wurden mit BSA-AGE (LD<sub>50</sub>) und Antioxidantien oder Stoffwechselintermediaten in den angegebenen Konzentrationen 24h inkubiert. Die Vitalität der Zellen wurde danach mit dem MTT-Assay bestimmt. (\*\*:p<0,001; \*:p<0,05; n=5)

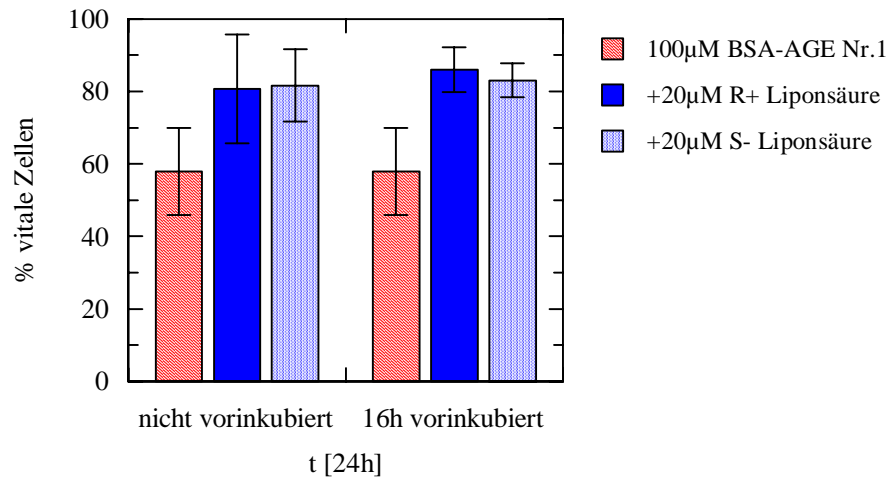


Abb.18: Vergleich der Wirkung von (R+) und (S-) Enantiomer der  $\alpha$ -Liponsäure auf AGE-gestresste BHK21 Zellen. Im MTT-Assay zeigte sich nach 24h kein Unterschied in der protektiven Wirkung von R-oder S-Form der Liponsäure. (n=2)

#### d) Östrogenderivate und andere Radikalfänger

Auch das Östrogen  $17\beta$ -Estradiol hat durch das phenolische Ringsystem antioxidative Eigenschaften. Die Gabe von  $10\mu\text{M}$   $17\beta$ -Estradiol 60min vor den AGEs führte zu einer Steigerung der Zahl lebender SH-SY5Y Zellen um 20%. Die Gabe von  $10\mu\text{M}$  J861, einem hormon-inaktivem Östrogenderivat, ist im Vergleich dazu weniger effektiv. Der Radikalscavenger PBN ( $500\mu\text{M}$ ) führt, ähnlich der  $\alpha$ -Liponsäure, zu einer fast vollständigen Abschwächung der AGE-Toxizität, eine Vorinkubation steigert die Wirksamkeit dieser Substanzen nicht (Abb.19).

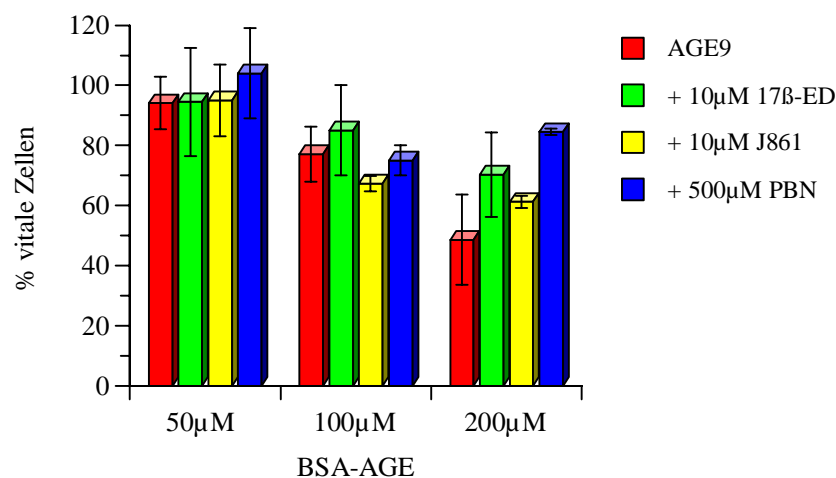


Abb. 19: Abschwächung der AGE-Toxizität im MTT-Assay durch Östrogene oder Radikalfänger bei SH-SY5Y-Zellen.  $17\beta$ -Estradiol wurde 60min vor AGE-Gabe appliziert, die anderen Substanzen gleichzeitig mit dem BSA-AGE. (n=4)

#### d) Zytoprotektion durch Katalase und Superoxid-Dismutase

Da in der AD ein Missverhältnis der Enzyme Katalase und Superoxiddismutase (SOD) besteht, wurde im MTT-Assay getestet, ob auch die zusätzlich Gabe von Katalase, SOD oder die Kombination SOD / Katalase zytoprotektiv ist.

Das Hämprotein Katalase katalysiert die Spaltung von Wasserstoffperoxid in Wasser und molekularen Sauerstoff. Katalase (400µg/ml) wirkte deutlich protektiv, ein Unterschied zwischen halbstündiger Vorinkubation und gleichzeitiger Gabe des Enzyms mit den AGEs besteht nicht. Im Gegensatz zu anderen Antioxidantien wirkte Katalase auch dann noch protektiv, wenn die Gabe 30 min nach AGE Zusatz erfolgt (Abb.20).

Die Gabe von Superoxiddismutase allein (1µg/ml oder 500ng/ml) war nicht protektiv, vermutlich, weil das von ihr gebildete  $H_2O_2$  ohne Katalase nicht entgiftet werden kann bzw. durch AGE weniger  $O_2^-$  als  $H_2O_2$  entsteht.

Die Kombination SOD / Katalase (1µg SOD/400µg Katalase/ml oder 500ng SOD/200µg Katalase / ml) war nicht wirksamer in der Protektion gegen AGE-vermittelte Zytotoxizität als Katalase allein (Abb.21).

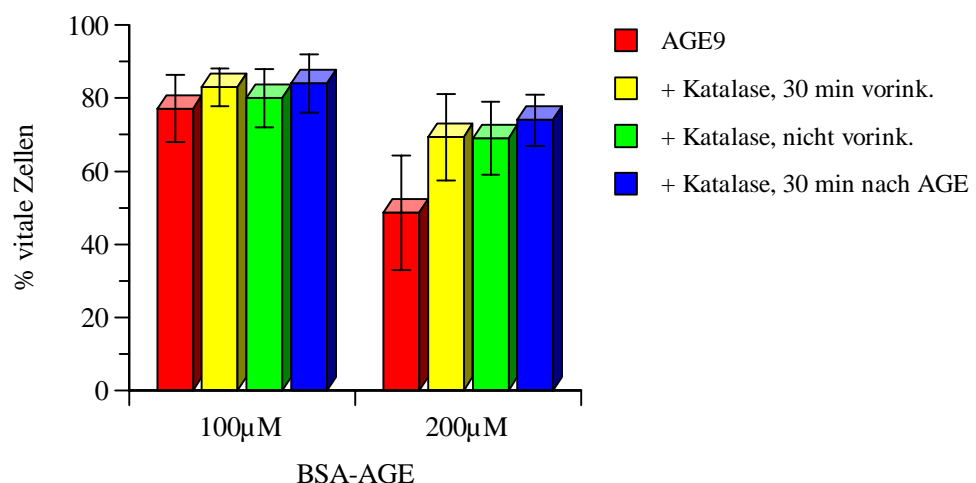


Abb. 20: Protektiver Effekt von Katalase gegen AGE-Toxizität

SH-SY5Y-Zellen wurden 24h mit BSA-AGE oder mit BSA-AGE und Katalase (400µg/ml) inkubiert und die Zahl vitaler Zellen mit dem MTT-Assay bestimmt. Katalase wurde entweder gleichzeitig mit, 30min. vor oder 30min. nach AGE-Gabe zugegeben. (n=4)

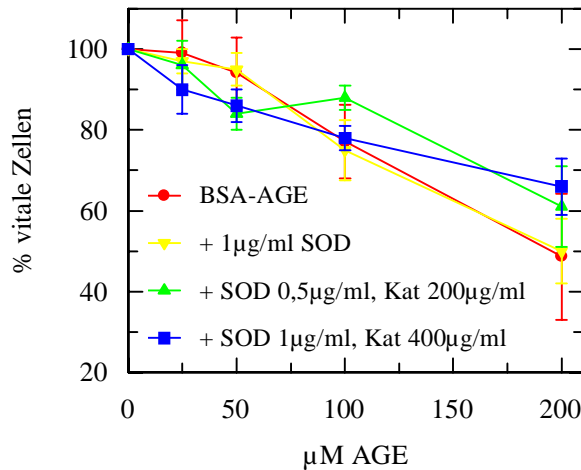


Abb. 21: Zytoprotektion von SH-SY5Y-Zellen durch Kombination von Katalase und SOD. Zellen wurden mit Katalase und SOD oder SOD allein und BSA-AGE inkubiert und die Zahl vitaler Zellen im MTT-Assay bestimmt. (n=3)

### 2.3.2. Abschwächung der Zytotoxizität von $\beta$ A4 und $\beta$ A4-AGE durch Liponsäure

Durch (R+)  $\alpha$ -Liponsäure konnte auch die  $\beta$ A4-AGE vermittelte Toxizität abgeschwächt werden. Zellen wurden 2h mit 100 $\mu$ M Liponsäure vorinkubiert und dann für 48h mit je 100 $\mu$ M fibrillärem  $\beta$ A4 bzw.  $\beta$ A4-AGE und Liponsäure inkubiert, dies entspricht der LD<sub>50</sub> von  $\beta$ A4. Die Zellvitalität wurde im MTT-Assay bestimmt. Es zeigte sich, dass Liponsäure lediglich bei  $\beta$ A4-AGE protektiv wirkt und nicht bei Zellen, die mit fibrillärem  $\beta$ A4 inkubiert wurden (Abb.22). Dies lässt vermuten, dass ROS nur bei  $\beta$ A4-AGE, weniger jedoch bei fibrillärem  $\beta$ A4 an der Inhibition der mitochondrialen Respiration beteiligt sein könnten.

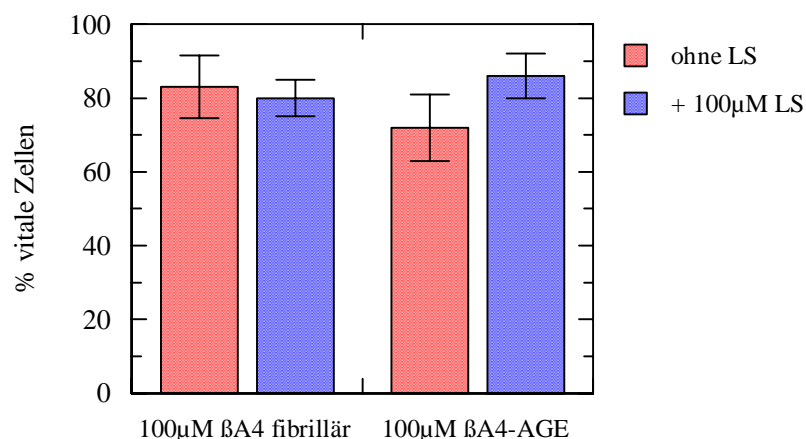


Abb. 22: Zytoprotektion gegen  $\beta$ A4-AGE vermittelte Toxizität  
Durch Liponsäure (100 $\mu$ M, 1h vorinkubiert) wird die  $\beta$ A4-AGE Toxizität abgeschwächt, bei fibrillärem  $\beta$ A4 wirkt Liponsäure nicht protektiv. (n=2)

### **2.3.3. Zytoprotektion durch Blockieren von RAGE**

Auch die Bindung von AGE an den RAGE Rezeptor und dadurch ausgelöste Signalwege könnten zur direkten Toxizität von AGEs beitragen. Durch Blockieren des RAGE-Rezeptors mit spezifischen Antikörpern oder durch Herabregulation der RAGE-Expression durch antisense Oligos sollte getestet werden, ob der Rezeptor bei der Vermittlung der direkten AGE-Toxizität eine Rolle spielt.

#### **2.3.2.1 Nachweis von RAGE ( Receptor of Advanced Glycation Endproducts ) in SH-SY5Y Zellen**

Die Expression von RAGE, einem Mitglied der Immunglobulin Superfamilie, ist in zahlreichen Zellen und Geweben nachgewiesen, unter anderem in Lunge, Muskel und neuralem Gewebe. Zusammen mit 2 N- terminal gebundenen Polysacchariden hat RAGE eine Masse von 47 kDa (Neeper et al., 1992), der extrazelluläre Teil des Rezeptors ist 35kDa gross und wird als "soluble RAGE" (sRAGE) bezeichnet.

Für die in dieser Arbeit verwendete, neurotypische Zelllinie SH-SY5Y lagen keine Informationen über die RAGE-Expression vor. Um zu bestätigen, dass der Rezeptor tatsächlich exprimiert wird, wurden Zellysate im Westernblot mit zwei verschiedenen Antikörpern gegen RAGE inkubiert. Beide Antikörper sind gegen sRAGE gerichtet.

Es standen 2 verschiedene RAGE Antikörper zur Verfügung:

	erhalten von	erzeugt gegen	eingesetzte Menge
- $\alpha$ RAGE goat	MSD	soluble RAGE; rekomb. in E.coli	1:500
- $\alpha$ RAGE rabbit	Dr. J. Li (New York)	synth. Peptid aus hSequenz, (Neeper et al, 1992)	0,25mg / ml



### a) Nachweis von RAGE im Westernblot

Mit beiden getesteten Antikörpern konnte im Westernblot die Expression von RAGE in SH-SY5Y-Zellen nachgewiesen werden. Ein Unterschied im Blotmuster zwischen den Antikörpern ist nicht zu erkennen (Abb. 23). Zusätzlich zu der sRAGE Bande bei 35 kDa erscheint auch eine Bande bei etwa 50kDa, dies könnte der ganze Rezeptor mit einer Grösse von 47kDa sein. Um zu bestätigen, dass die Banden RAGE-spezifisch sind, wurden Zellen für 1 Woche mit 8 $\mu$ M RAGE-antisense Oligo (Dr. A. Bierhaus, Tübingen) inkubiert. Medium und Oligos wurden dabei täglich erneuert, um eine gleichmässig hohe Oligo-Konzentration zu gewährleisten. Im Westernblot zeigte sich in diesen Zellen eine Herabregulation der Protein-Expression sowohl bei 35 kDa als auch bei 50 kDa, beide Banden sind also RAGE-spezifisch (Abb. 24).

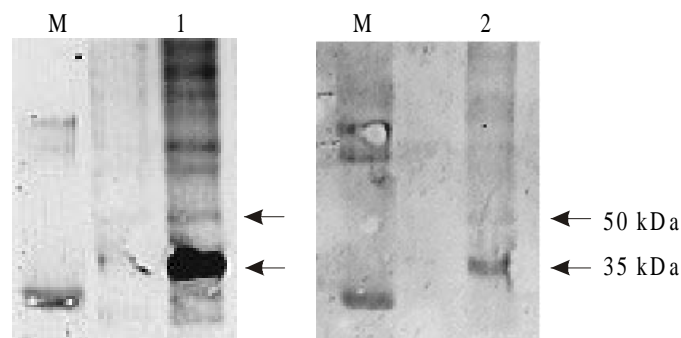


Abb. 23: Westernblot mit zwei verschiedenen RAGE Antikörpern. Neben der spezifischen RAGE Bande bei 35kDa werden noch weitere Banden erkannt. Es wurden je 5 $\mu$ g Protein aufgetragen.

a)  $\alpha$ RAGE goat 1:10 000

b)  $\alpha$ RAGE rabbit 1mg/ml 1:10 000

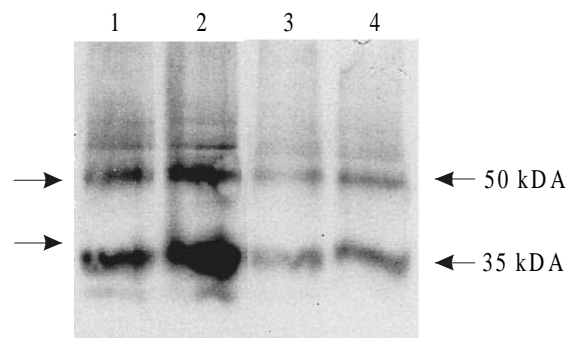


Abb. 24: Die Inkubation mit RAGE-antisense Oligos (8 $\mu$ M, 7 Tage) verringert die Expression von RAGE in SH-SY5Y Zellen.

Es wurden je 5 $\mu$ g Protein aufgetragen, als 1. Antikörper wurde eingesetzt:  $\alpha$ RAGE goat 1:10 000

1: Kontrolle    2: + 50 $\mu$ M AGE, 24h    3: Kontrolle + antisense    4: antisense + AGE

### b) Hemmung der AGE-Aufnahme durch RAGE-antisense-Oligos

Um zu testen, ob durch antisense-Oligos die Aufnahme von AGEs in die Zelle bzw. die intrazelluläre Bildung von AGEs beeinflusst wird, wurden Zellen 1 Woche mit 8µM RAGE antisense Oligo inkubiert, 48h mit 50µM BSA-AGE inkubiert, 4 mal gewaschen und die intrazelluläre AGE-Fluoreszenz der Zellysate gemessen.

Zellen, die mit antisense Oligos behandelt waren, zeigten eine verringerte AGE-Fluoreszenz im Vergleich zu nur AGE-behandelten Zellen (Abb.24). Durch die verminderte RAGE-Expression wird vermutlich weniger AGE gebunden und gelangt in die Zelle.

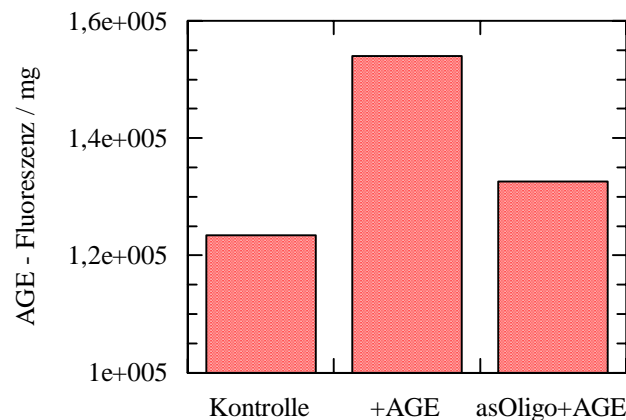


Abb. 24: Abnahme der AGE-Fluoreszenz in Lysaten von SY5Y-Zellen, die 1 Woche mit 8µM RAGE-antisense-Oligo inkubiert wurden

### c) Nachweis von RAGE durch RT-PCR

Die Expression von RAGE in BSA-AGE-stimulierten (24h, 50µM) und nicht stimulierten SY5Y Zellen wurde zusätzlich mit RT-PCR nachgewiesen. Weiter sollte auf mRNA-Ebene getestet werden, ob die Expression von RAGE unter AGE-Stress hochreguliert wird. Es wurde ein 484 bp Fragment aus dem 5'Ende (Spuren 1 und 3) und ein 446 bp Fragment aus dem 3'-Ende (Spuren 2 und 4) der humanen RAGE-Sequenz amplifiziert (Abb. 25).

Unter den gegebenen Kulturbedingungen wird RAGE in SH-SY5Y-Zellen konstitutiv exprimiert, eine Stimulation der Expression durch AGEs wie z.B. für Endothelzellen beschrieben ist (Bierhaus et al., 1997) wurde nicht gefunden.

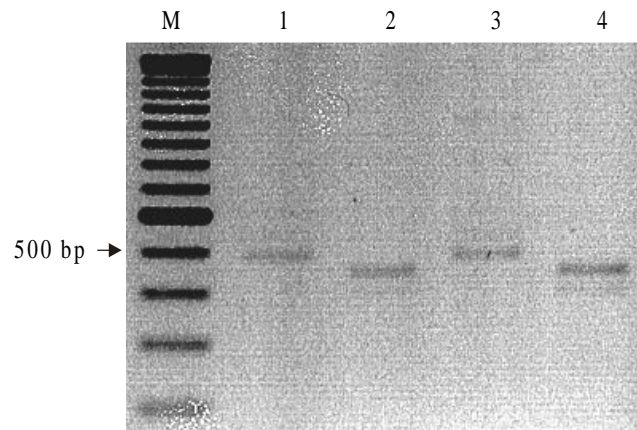


Abb. 25: RT-PCR mit hRAGE-Primern aus nicht stimulierten (Spuren 1, 2) und für 24h mit 50 $\mu$ M BSA-AGE stimulierten SH-SY5Y Zellen (Spuren 3, 4). Je 10 $\mu$ l der PCR-Ansätze wurden im 1,2% igen Agarose/TAE Gel aufgetrennt, mit EtBr gefärbt und photographiert.

M: Marker      1: Kontrolle, 484bp-Fragment

2: Kontrolle, 446bp-Fragment

3: 50 $\mu$ M BSA-AGE, 24h, 484bp-Fragment

4: 50 $\mu$ M BSA-AGE, 24h, 446bp-Fragment

### **2.3.3.2. Abschwächung der AGE-Toxizität durch Inkubation der Zellen mit RAGE-Antisense-Oligos**

Wie im Westernblot bereits gezeigt, kommt es nach Inkubation von Zellen mit RAGE antisense-Oligos zu einer Verminderung der RAGE-Expression. Der Effekt einer verringerten RAGE-Expression auf die AGE-Toxizität wurde daher getestet.

Neuroblastoma Zellen wurden 8 Tage mit 8 $\mu$ M RAGE antisense-Oligos inkubiert. Zur Kontrolle wurden sense-Oligos in derselben Konzentration eingesetzt. Medium und Oligos wurden alle 24 h ersetzt. Diese Zellen wurden für 24h mit BSA-AGE inkubiert und der Prozentsatz vitaler Zellen mit dem MTT-Assay bestimmt.

Es zeigte sich, dass die Inkubation mit antisense-Oligos lediglich zu einem Anstieg der Menge vitaler Zellen um 15% führt (Abb. 26).

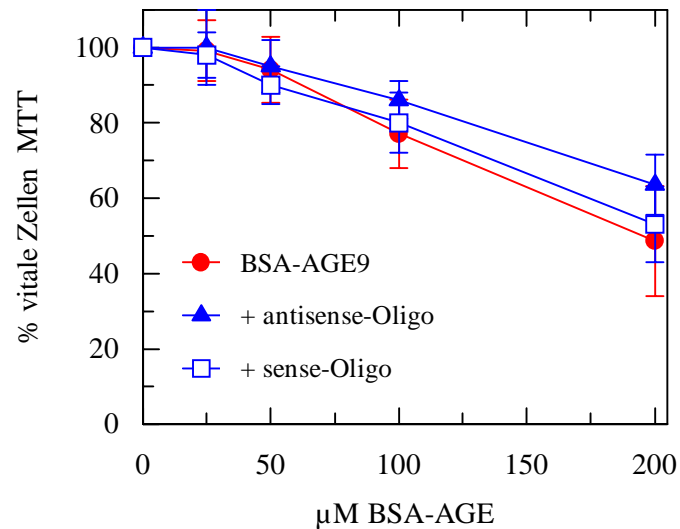


Abb. 26: Zytoprotektion durch Herabregulation der RAGE-Expression mit antisense-Oligos. SH-SY5Y-Zellen wurden 1 Woche mit 8μM RAGE-antisense-Oligo oder sense-Oligo vorinkubiert und danach für 24h mit BSA-AGE inkubiert. Die Menge vitaler Zellen wurde im MTT-Assay erfasst. (n=2)

### **2.3.3.3. Abschwächung der AGE-Toxizität durch Blockieren von RAGE mit RAGE-Antikörpern**

Nachdem die Ergebnisse aus 2.3.3.2. auf eine Rolle von RAGE bei der direkten AGE-Toxizität hinweisen, wurde versucht, die AGE Toxizität durch Blockieren des Rezeptors mit RAGE-Antikörpern weiter abzuschwächen. SH-SY5Y-Zellen wurden 1h mit den RAGE-Antikörpern vorinkubiert. Die Zellen wurden dann 24 h mit BSA-AGE inkubiert und die Zellvitalität im MTT Assay bestimmt. Durch Blockieren des Rezeptors mit beiden Antikörpern konnte der Prozentsatz überlebender Zellen erhöht werden (Abb. 27), der RAGE-Rezeptor ist offenbar an der Vermittlung der AGE-Toxizität beteiligt.

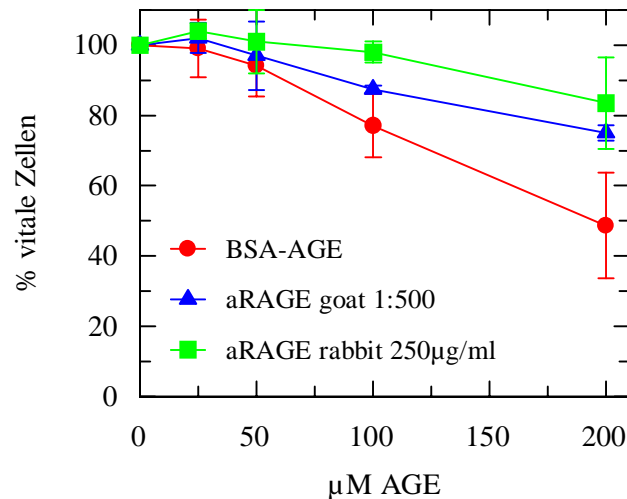


Abb. 27: Abschwächung der AGE-Toxizität durch Blockieren von RAGE. SH-SY5Y-Zellen wurden 1h mit RAGE-Antikörper vorinkubiert, 24h mit BSA-AGE inkubiert und die Zahl lebender Zellen im MTT-Assay bestimmt. (n=4)

#### **2.3.3.4. Zytoprotektion durch Kombination von Antioxidantien und RAGE-Antikörpern**

Durch die Kombination verschiedener Antioxidantien mit neutralisierenden Antikörpern wurde versucht, den Prozentsatz vitaler Zellen weiter zu erhöhen.

SH-SY5Y Zellen wurden 1h mit RAGE-Antikörper (goat) 1:500, vorinkubiert. Gleichzeitig mit den AGEs wurde noch 400μg/ml Katalase zugegeben. Diese Kombination erwies sich als optimal, so behandelte Zellen zeigten im MTT-Assay keine Einschränkung der mitochondrialen Respiration mehr, die zytotoxische Wirkung der AGEs konnte vollständig abgeblockt werden. Die Kombination intra- und extrazellulär wirksamer Antioxidantien (50μM Liponsäure, 1h vorinkubiert, und 400μg/ml Katalase) hatte dagegen in etwa denselben protektiven Effekt wie die Einzelsubstanzen oder der RAGE-Antikörper allein, was auf einen Anteil nicht-radikal vermittelter AGE-Toxizität hinweist.

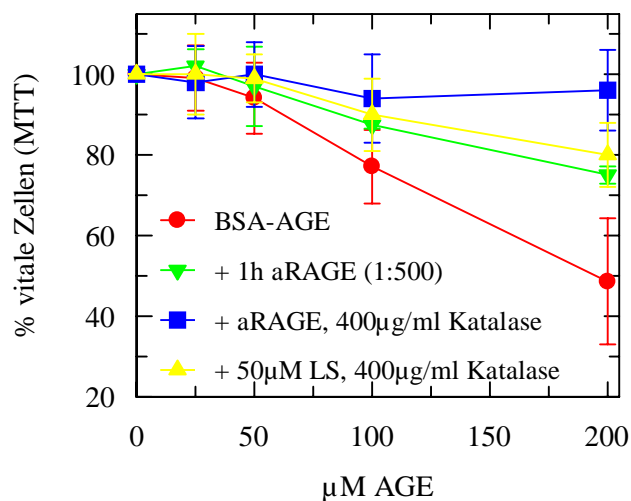


Abb. 28: Abschwächung der AGE-Toxizität durch die Kombination von Antioxidantien und RAGE-Antikörper. SH-SY5Y Zellen wurden mit Antioxidantien u. Antikörper in den angegebenen Konzentrationen 24h inkubiert und die Vitalität der Zellen im MTT-Assay bestimmt.

## 2.4.Toxizität von Methylglyoxal

In der Maillard Reaktion der Glukose treten neben Glukoson und Deoxglukoson auch reaktive Dicarbonyle wie Glyoxal und Methylglyoxal (MG) als Intermediate auf. Methylglyoxal entsteht nichtenzymatisch durch die autoxidative Fragmentierung von Zuckern sowie als Nebenprodukt aus Triosephosphaten der Glykolyse. Weiter wird es im Ketonkörper-Metabolismus aus Aceton gebildet sowie beim Abbau von Threonin. Methylglyoxal reagiert rasch mit Amino-Guanidino- und Thiolgruppen von Proteinen und führt so zu Crosslinking und Denaturierung.  $\alpha$ -Oxoaldehyde wie Methylglyoxal und Glyoxal können durch das Glyoxalase System aus Glyoxylase I und II mit GSH als Cofaktor abgebaut werden, um Schäden für die Zelle zu vermeiden. Ein Überschuss an  $\alpha$ -Oxoaldehyden führt zur Bildung von AGEs. Daher wurde die Neurotoxizität dieses Zuckerfragmentationsprodukts und AGE- Vorläufers getestet.

Im MTT-Assay zeigte sich, dass Methylglyoxal mit einer LD<sub>50</sub> von 1,25mM toxisch auf SH-SY5Y-Zellen ist (Abb. 29).

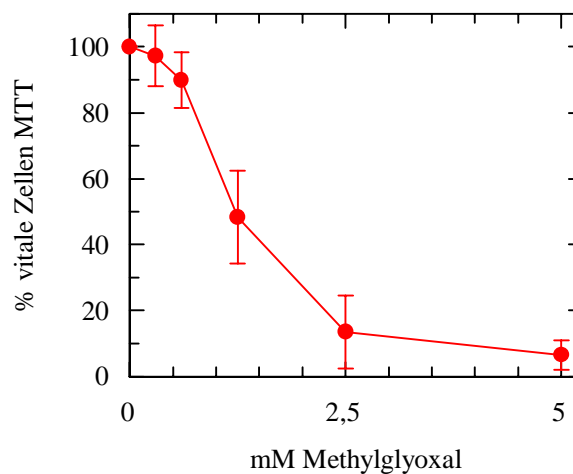


Abb. 29: Neurotoxizität von Methylglyoxal.

SH-SY5Y Zellen wurden 24h mit Methylglyoxal in den angegebenen Konzentrationen inkubiert, im MTT-Assay ergab sich eine LD<sub>50</sub> von 1,25mM Methylglyoxal. (n=4)

### 2.4.1. Protektion gegen Methylglyoxal-vermittelte Toxizität

#### a. Antioxidantien und Stoffwechselintermediate

Im Gegensatz zu der AGE-vermittelten Toxizität gelingt eine Protektion der Zellen gegen Methylglyoxal mit den meisten der getesteten Antioxidantien nicht (Abb. 30).

Im MTT-Assay versagen bei einer Methylglyoxal-Konzentration von 2,5mM nach 24-stündiger Inkubation alle getesteten Antioxidantien.

Das Überleben von Zellen, die mit 1,25mM Methylglyoxal inkubiert wurden ( $LD_{50}$ ), konnte durch Vorinkubation mit 100 $\mu$ M (R+)  $\alpha$ -Liponsäure um 15% gesteigert werden, dies ist vermutlich weniger auf die antioxidativen als auf die pro-energetischen Eigenschaften der Substanz zurückzuführen, da 10 $\mu$ M 17 $\beta$  Estradiol nur schwach protektiv wirkte und N-Acetylcystein sich als unwirksam erwies.

Durch die Gabe von Katalase oder Superoxid-Dismutase gleichzeitig mit Methylglyoxal liess sich der Prozentsatz vitaler Zellen lediglich um etwa 10% steigern.

Mit Aminoguanidin, das  $\alpha$ -Oxoaldehyde wirksam abfangen kann, ließ sich die Zahl überlebender SH-SY5Y Zellen nach Inkubation mit 2,5mM Methylglyoxal deutlich von 13% auf 59% steigern. Auch bei Gabe von 1,25mM Methylglyoxal wurden die Zellen durch Aminoguanidin geschützt, der Prozentsatz vitaler Zellen stieg von 48% auf 70%.

Eine Substitution des Stoffwechsels durch Pyruvat oder  $\alpha$ -Ketoglutarat zeigte keine Wirkung, NPGA war ebenfalls unwirksam (nicht gezeigt). Da Methylglyoxal nicht an den RAGE-Rezeptor binden sollte, wurde die Wirkung neutralisierender Antikörper nicht getestet.

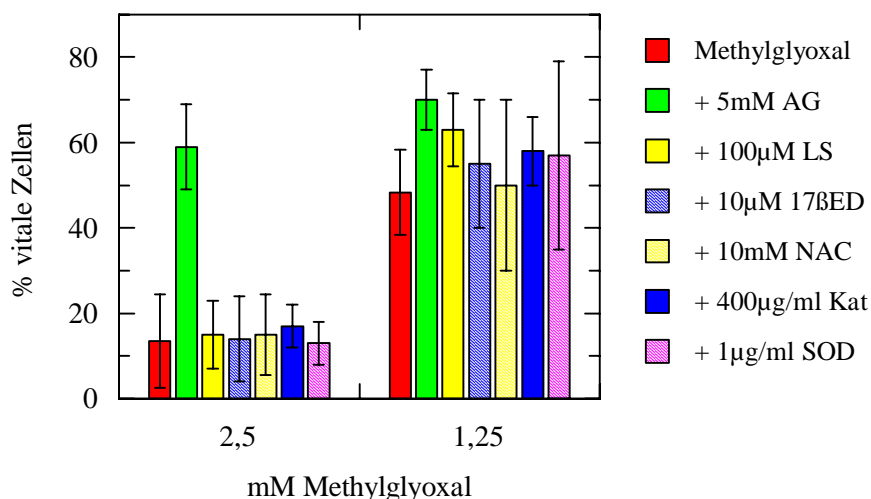


Abb. 30: Protektion vor Methylglyoxal-vermittelter Toxizität durch Antioxidantien.

SH-Y5Y Zellen wurden mit Antioxidantien und Methylglyoxal in den o.g. Konzentrationen 24h inkubiert und die Zellvitalität im MTT-Assay bestimmt. LS, 17ED und AG wurden 1h vorinkubiert, die Gabe von NAC, Katalase und SOD erfolgte gleichzeitig mit Methylglyoxal (n=3)



### b. Modifikation von Methylglyoxal mit Aminoguanidin oder Tenilsetam

Durch die Inkubation von Methylglyoxal mit den AGE-Inhibitoren und Carbonyl-Fängern Aminoguanidin oder Tenilsetam konnte die Toxizität von Methylglyoxal auf SH-SY5Y Neuroblastomazellen vollständig aufgehoben werden. 100mM Methylglyoxal wurde durch Inkubation mit je 100mM Aminoguanidin oder Tenilsetam bei 50°C modifiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, sterilfiltriert und im MTT-Assay auf ihre Neurotoxizität getestet (Abb. 31).

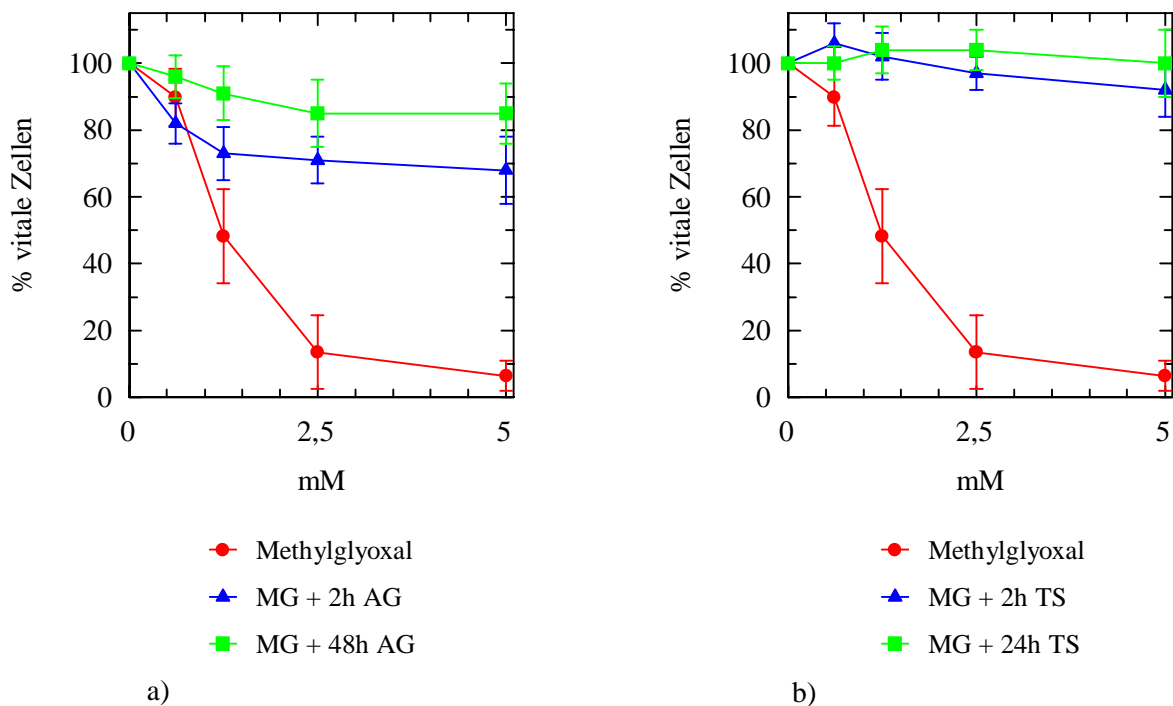


Abb. 31: Abschwächung der Methylglyoxal-Toxizität durch Modifikation des Dicarbonyls mit Aminoguanidin oder Tenilsetam.

Methylglyoxal, das vor der Zugabe zur Zellkultur 2h oder 48h mit Aminoguanidin (a) oder Tenilsetam (b) modifiziert wurde, ist im MTT-Assay nicht mehr toxisch auf SH-SY5Y Zellen.

### 3. Aktivierung von NFκB durch AGEs

Durch freie Radikale und oxidativen Stress wird unter anderem der Transkriptionsfaktor NFκB aktiviert. Die inaktive Form des Transkriptionsfaktors ist im Zytoplasma lokalisiert und besteht aus einem p50/p65 Heterodimer und der inhibitorischen Untereinheit IκB. Durch Dissoziation von IκB wird NFκB aktiviert und in den Nukleus transloziert. Die Bindung von NFκB an regulatorische Elemente in entsprechenden Genen führt nicht nur zur Expression von Zytokinen und Molekülen wie VCAM und ICAM, sondern kann auch apoptotische Ereignisse beeinflussen.

Um die Aktivierung von NfκB zu untersuchen, wurden SY5Y Zellen mit AGEs und den zu testenden Agenzien inkubiert und Kernextrakte der Zellen hergestellt. Die Translokation von NfκB in den Zellkern wurde mittels EMSA nachgewiesen.

Um Serumeffekte auszuschliessen, wurden die Experimente zum NFκB-Nachweis in Medium mit 1% FKS durchgeführt, zusätzliche Vergleiche mit Zellen in 10% FKS ergaben keine Aufregulierung von NFκB.

Die Zuordnung der einzelnen Banden ließ sich durch Supershiftexperimente mit p50-Antikörpern und p65-Antikörpern nicht eindeutig klären, die Spezifität der NfκB Banden konnte aber durch Konkurrenz mit "kaltem", unmarkiertem Oligo bestätigt werden (Abb. 32).

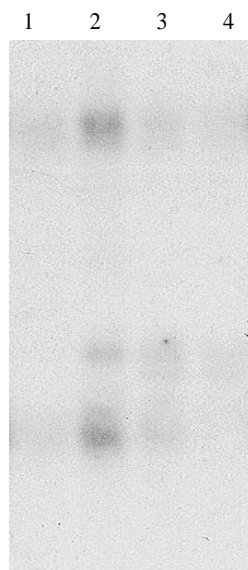


Abb. 32: EMSA von Kernextrakten aus SY5Y Zellen mit [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-markiertem NFκB-Oligonukleotid, Konkurrenz mit 1µl oder 2µl nichtmarkiertem NFκB-Oligo

Zellen wurden für 6h mit je 5µg/ml LPS induziert, geerntet und die Kernextrakte über EMSA aufgetrennt. Zur Konkurrenz wurde den Bindungsreaktionen der Ansätze 3 und 4 nicht-markiertes NFκB-Oligonukleotid zugegeben.

1: Kontrolle    2: 5µg/ml LPS, 6h    3: 5µg/ml LPS, 6h + 1µl Oligo    4: 0,5µg/ml LPS + 2µl Oligo

Während nichtglykiertes BSA nicht zu einer Aktivierung von NFκB führte (nicht gezeigt), war nach 24-stündiger Inkubation mit 10μM und 20μM BSA-AGE NFκB im Nukleus nachzuweisen. Die durch 20μM AGE induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors war bis zu 72h lang nachzuweisen. Auch fibrilläres und glykiertes βA4 (je 10μM, 24h) aktivierten NFκB (Abb. 33).

Das Blockieren des RAGE Rezeptors mit RAGE-Antikörpern führte zu einer Abschwächung der NFκB-Aktivierung, auch die Antioxidantien (R+) α-Liponsäure (100μM, 1h vor AGE) und 17β-Estradiol (10μM, 30min vor AGE) verhinderten die Aktivierung von NFκB teilweise. Dies weist sowohl auf die Beteiligung Rezeptor-vermittelter Signalwege bei der AGE-Toxizität hin als auch auf eine Rolle von ROS. Durch AGEs könnte die Expression antiapoptotischer Gene wie IAP oder auch SOD induziert werden, dafür spricht auch die Abschwächung der NFκB Aktivierung durch Antioxidantien.

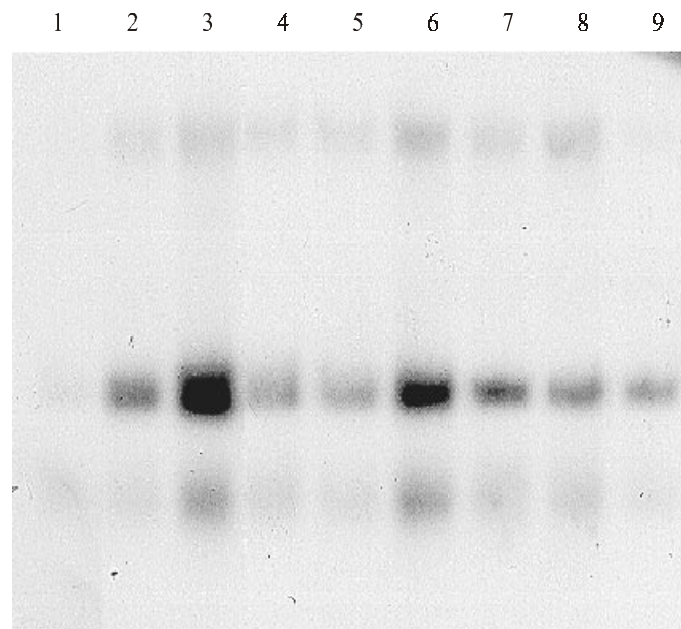


Abb.33: Aktivierung von NfκB in SH-SY5Y-Zellen durch AGEs, Abschwächung durch Antioxidantien und RAGE-Antikörper. Je 8μg Kernextrakt wurden aufgetragen und durch EMSA aufgetrennt.

- |                            |                                    |                      |
|----------------------------|------------------------------------|----------------------|
| 1: Kontrolle               | 2: 10μM BSA-AGE, 24h               |                      |
| 3: 20μM BSA-AGE, 24h       | 4: 10μM 17ED + 20μM AGE, 24h       |                      |
| 5: 100μM LS, 20μM AGE, 24h | 6: 1h RAGE-AK 1:500, 20μM AGE, 24h |                      |
| 7: 20μM BSA-AGE, 72h       | 8: 10μM βA4-AGE, 24h               | 9: 10μM βA4 fib. 24h |

#### 4. Nachweis von TBARS in AGE-gestressten Zellen

Weitere Marker für intrazellulären oxidativen Stress sind die sogenannten Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS). Der Nachweis erhöhter Mengen dieser Lipidperoxiationsprodukte wie z.B. Malondialdehyd (MDA) ist u.a. auch charakteristisch für die AD (Marcus et al., 1998). Durch die Messung wurden sowohl freie als auch proteingebundene TBARS erfasst und die Menge TBARS pro mg Protein anhand des Extinktionskoeffizienten der MDA errechnet. In der verwendeten BSA-AGE-Präparation selbst wurden keine TBARS nachgewiesen.

Es zeigte sich, dass extrazellulär angebotene AGEs die Bildung intrazellulärer TBARS induzieren, nach 24-stündiger Inkubation von SH-SY5Y Zellen mit verschiedenen Konzentrationen BSA-AGE sind bis zu 4-fach erhöhte Mengen an TBARS nachzuweisen. Das  $\alpha$ -Oxoaldehyd Methylglyoxal führt ebenfalls zu einer verstärkten Lipidperoxidation (Abb. 34a).

Auch in Zellen, die 24h mit Amyloid-AGE inkubiert wurden, konnte eine im Vergleich zur Kontrolle um den Faktor 3 gesteigerte Menge intrazellulärer Lipidperoxidationsprodukte nachgewiesen werden. Nichtglykiertes, fibrilläres Amyloid sowie nichtfibrilläres Amyloid führten dagegen nur zu einem Anstieg der nachweisbaren TBARS um etwa 50%. Ein Unterschied zwischen aggregiertem und nichtaggregiertem  $\beta$ A4 in der Fähigkeit, die Bildung von TBARS zu induzieren, besteht offenbar nicht (Abb. 34b).

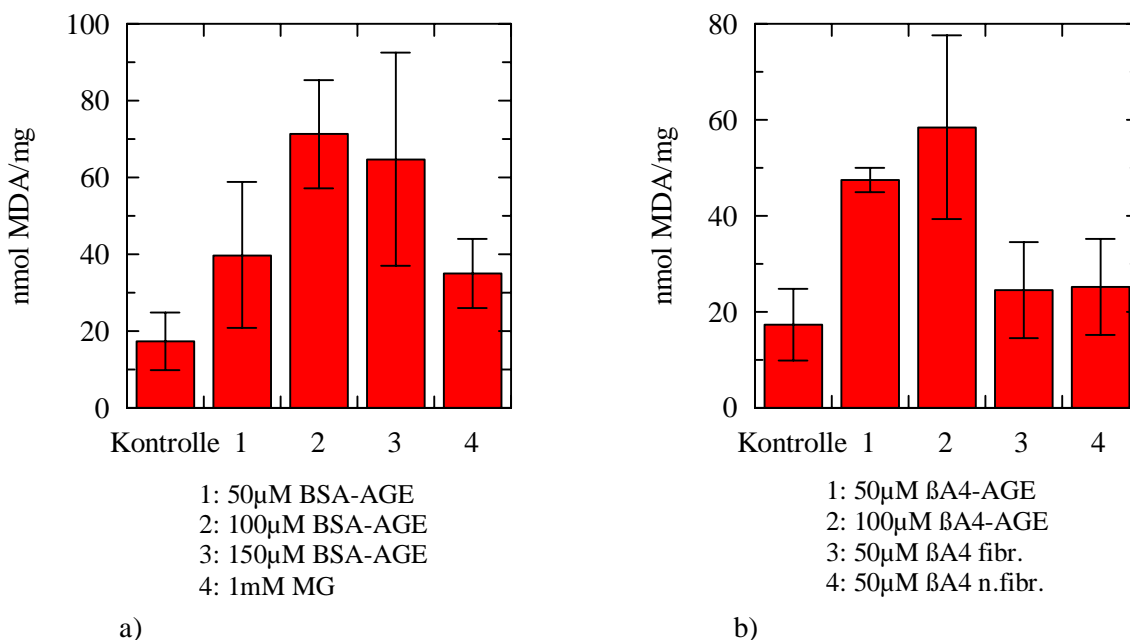


Abb. 34: Nachweis von TBARS in SH-SY5Y-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit BSA-AGE und Methylglyoxal (a) oder mit fibrillärem  $\beta$ A4 und  $\beta$ A4-AGE (b) (n=3)

#### 4.1. Verringerung der TBARS-Bildung durch Antioxidantien und andere Substanzen

Die Lipidperoxidation kann durch die Gabe von Antioxidantien verhindert oder verringert werden. Auch durch Vorinkubation der Zellen mit RAGE-Antikörpern konnte die Bildung intrazellulärer TBARS abgeschwächt werden (Abb. 35).

(R+)  $\alpha$ -Liponsäure und  $17\beta$ -Estradiol erwiesen sich erneut als die wirksamsten Substanzen. In Zellen, die vor der Gabe von  $100\mu\text{M}$  BSA-AGE entweder  $100\mu\text{M}$  Liponsäure oder  $10\mu\text{M}$  Estradiol erhalten hatten, konnte die Bildung von Lipidperoxidationsprodukten durch AGEs weitgehend verhindert werden. Einen ähnlichen Effekt hatte die Gabe von  $5\text{mM}$  Aminoguanidin  $30\text{min.}$  vor AGE-Zusatz. Die Menge TBARS in diesen Zellen ist im Vergleich zur Kontrolle um etwa  $50\%$  erhöht und entspricht somit in etwa den Werten nach Inkubation von Zellen mit nichtglykiertem  $\beta\text{A4}$ .

Auch durch N-Acetylcystein ( $10\text{mM}$ , nicht vorinkubiert) ließ sich die Lipidperoxidation abschwächen, im Vergleich mit den anderen getesteten Antioxidantien war NAC allerdings weniger effektiv. Ausserdem stellte sich heraus, dass die Applikation von  $10\text{mM}$  NAC allein bereits zu einem leichten Anstieg der TBARS führte. Dies gilt auch für Zellen, die mit RAGE Antikörper (Peptid-AK, 1:500) inkubiert wurden. Trotzdem führte auch das Blockieren des RAGE-Rezeptors zu einer insgesamt deutlich verminderten Lipidperoxidation durch AGEs.

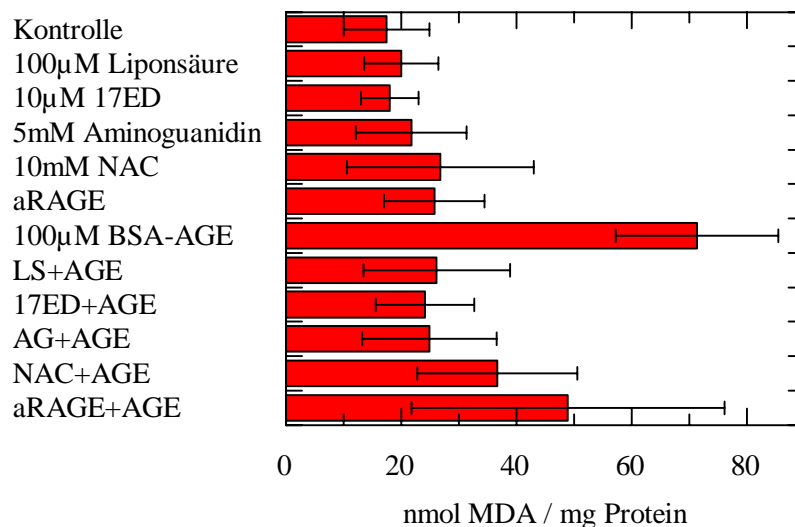


Abb. 35: Abschwächung der TBARS-Bildung durch Antioxidantien oder RAGE-Antikörper

Nach Vorinkubation von SH-SY5Y-Zellen mit  $100\mu\text{M}$  Liponsäure,  $10\mu\text{M}$   $17\beta$  Estradiol oder  $5\text{mM}$  Aminoguanidin ( $60\text{min.}$ ) wurden die Zellen  $24\text{h}$  mit  $100\mu\text{M}$  BSA-AGE inkubiert.  $10\text{mM}$  N-Acetylcystein wurde gleichzeitig mit BSA-AGE appliziert. RAGE Antikörper (1:500) wurde  $1\text{h}$  vor der AGE-Gabe zugegeben.

## 5. Glutathiongehalt von Zellen unter AGE-Stress

Dem Glutathion kommt, insbesondere im Gehirn, eine wichtige Rolle beim Schutz der Zelle vor oxidativem Stress zu. Deshalb wurde untersucht, ob der AGE-induzierte oxidative Stress den intrazellulären Glutathionspiegel beeinflusst.

Für einen effektiven Schutz vor oxidativem Stress ist nicht nur die Gesamtmenge an Glutathion ausschlaggebend, sondern auch das Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Glutathion (GSH / GSSG), da dadurch die Verfügbarkeit von GSH bestimmt wird. Es ist darüberhinaus auch ein Maß für die Effizienz und das Funktionieren des Glutathion-Redoxzyklus.

### 5.1. Veränderungen im Glutathionspiegel BSA-AGE-gestresster Zellen

Der Glutathionspiegel BSA-AGE oder  $\beta$ A4-gestresster Zellen wurde über eine Modifikation der Methode von Baker et al. (1990) bestimmt, Gesamtglutathion und GSSG werden dabei direkt gemessen, der Gehalt an GSH ergibt sich aus der Differenz  $GS_x - GSSG$ . Die Messungen wurden dreifach durchgeführt.

Die Inkubation von SH-SY5Y-Zellen mit BSA-AGE führte dosisabhängig zu einer Verschiebung des GSH / GSSG-Verhältnisses hin zum Glutathiondisulfid. Während in ungestressten Kontrollzellen nur etwa 1% des Glutathions als Disulfid vorliegt, steigt dieser Prozentsatz in Zellen, die 6h mit 100 $\mu$ M BSA-AGE inkubiert wurden bereits auf etwa 6%. Nach 24h finden sich 8% GSSG, ein Hinweis auf permanenten oxidativen Stress (Abb. 36).

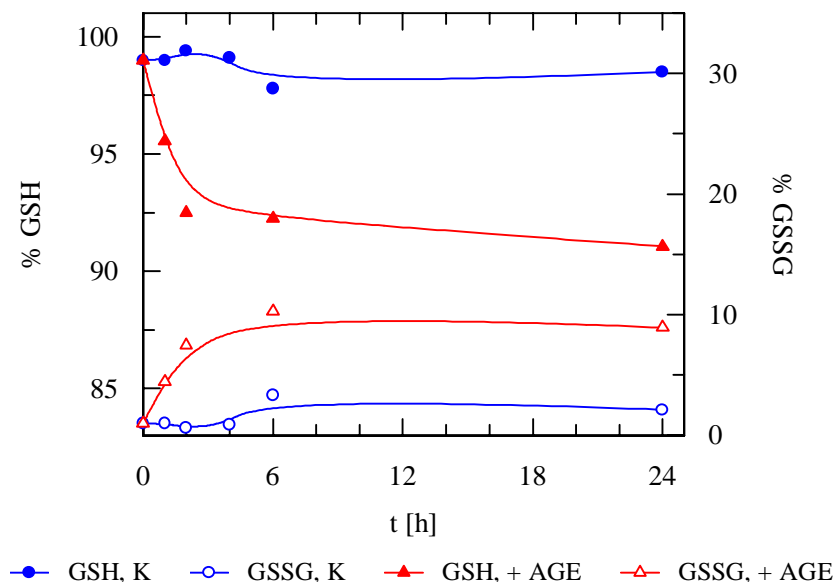


Abb. 36: Verschiebung des GSH / GSSG Verhältnisses durch AGE-Stress in SH-SY5Y-Zellen  
Der Gesamtglutathiongehalt sowie der GSSG-Gehalt von Zellen, die für die angegebenen Zeiten mit 100 $\mu$ M BSA-AGE (rote Kurven) oder ohne AGE (blaue Kurven) inkubiert wurden, wurde gemessen und der GSH Gehalt rechnerisch ermittelt.

Bei der Inkubation von SY5Y-Zellen mit BSA-AGE kommt es auch zu einer Abnahme des Gehalts an GSH pro mg Zellprotein.

Dieser Effekt ist dosisabhängig und setzt bei AGE-Mengen über  $50\mu\text{M}$  ein. Nach 6-stündiger Inkubation von SY5Y-Zellen mit  $50\mu\text{M}$  oder  $100\mu\text{M}$  BSA-AGE kommt zu einer Abnahme der GSH-Menge / mg. Während Zellen, die mit  $50\mu\text{M}$  BSA-AGE inkubiert wurden, dies nach 24h kompensiert haben und bei hohem GSH / GSSG-Verhältnis nur noch ein leichter GSH-Verlust pro mg Zellprotein nachzuweisen ist, führt  $100\mu\text{M}$  BSA-AGE neben einer deutlicheren GSH Depletion auch zur Zunahme der GSSG-Menge und damit zu einer deutlichen Verschiebung in der Redoxabwehr der Zelle. Werden Zellen für 24h mit  $150\mu\text{M}$  BSA-AGE inkubiert, findet sich verglichen mit Kontrollzellen lediglich noch ein Drittel der Menge GSH pro mg Protein (Abb. 37b). Der GSH-Spiegel folgt damit unter AGE-Stress einer ähnlichen Dosis-Wirkungskurve wie die Inhibierung der mitochondrialen Respiration (Abb. 37a).

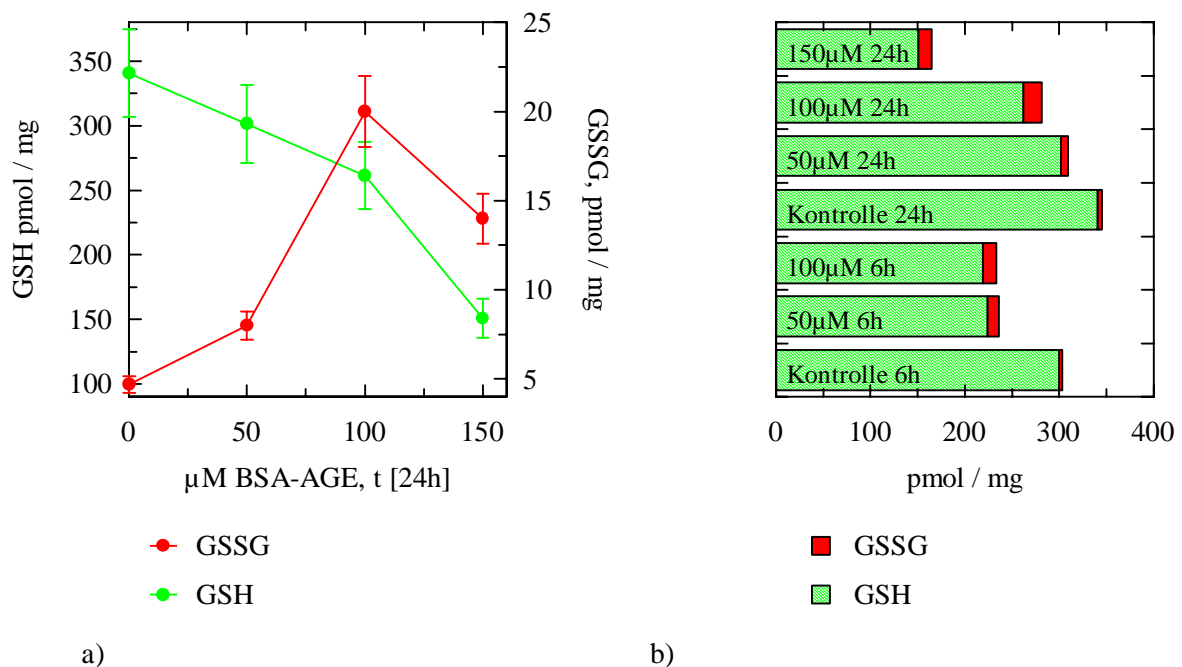


Abb. 37: Abnahme des GSH-Gehalts pro mg Zellprotein unter AGE-Stress

SH-SY5Y-Zellen wurden mit  $50\mu\text{M}$ ,  $100\mu\text{M}$  oder  $150\mu\text{M}$  BSA-AGE inkubiert und der Gehalt an reduziertem Glutathion und Glutathiondisulfid pro mg Protein zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt.

Die durch AGEs ausgelöste Repression des GSH Spiegels ist auch nach Entfernen des AGEs noch nachzuweisen.

Zellen wurden für 2h mit  $100\mu\text{M}$  BSA-AGE induziert und das Medium durch Medium ohne AGEs ersetzt. Der Glutathionstatus der Zellen wurde sofort nach dem Ersetzen des Mediums ( $t=0\text{h}$ ), nach 1h, 3h, 6h und 24h bestimmt. Ausserdem wurde bei Zellen die 2h lang mit  $50\mu\text{M}$  und  $150\mu\text{M}$  BSA-AGE induziert wurden der Thiolstatus 24h nach Medienwechsel gemessen.

Erneut zeigte sich, dass 50 $\mu$ M BSA-AGE nicht zu einer dauerhaften Veränderung im Thiolstatus der Zellen führt, 150 $\mu$ M als Menge nahe der LD<sub>50</sub> hingegen verursachte auch bei nur kurzzeitiger Applikation länger andauernde Veränderungen des zellulären Redoxstatus (Abb. 38b). Mit 100 $\mu$ M BSA-AGE inkubierte Zellen zeigen einen schnellen Anstieg an Glutathiondisulfid, das nach Entfernen des AGEs offenbar wieder reduziert wird. Das anfänglich hohe GSSG / GSH Verhältnis sinkt, bleibt aber im Vergleich zur Kontrolle (t=0h) auch nach Entfernen des AGEs verändert (Abb.38a).

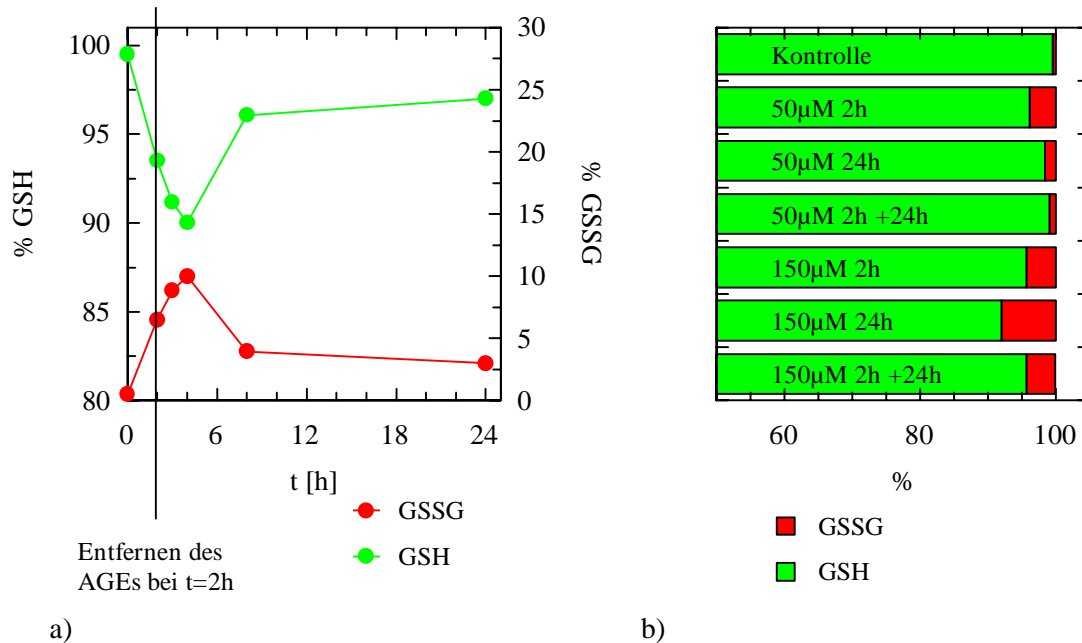


Abb.38: Veränderungen im Thiolspiegel von SH-SY5Y-Zellen nach 2-stündiger Applikation von BSA-AGE

a) Zellen wurden 2h mit 100 $\mu$ M BSA-AGE inkubiert und der Thiolstatus 2h, 6h und 24h nach Entfernen des AGEs bestimmt.

b) Zellen wurden 2h mit 50 $\mu$ M oder 150 $\mu$ M BSA-AGE induziert und der Thiolstatus 24h nach Entfernen des AGEs gemessen.



## 5.2 Veränderungen des Thiolstatus durch $\beta$ A4 und $\beta$ A4-AGE

Fibrilläres und AGE-modifiziertes  $\beta$ A4 (1-40) führte dosisabhängig ebenfalls zu GSH-Depletion. Das glykierte Peptid ist dabei das Wirksamere und führt zu einer, im Vergleich zum unmodifizierten Peptid verstärkten Thioldepletion und zu einem Anstieg von GSSG. Das 25-35 Fragment des Amyloids führt zu ähnlichen Einbußen im GSH-Gehalt der Zellen wie das fibrilläre  $\beta$ A4 (1-40).

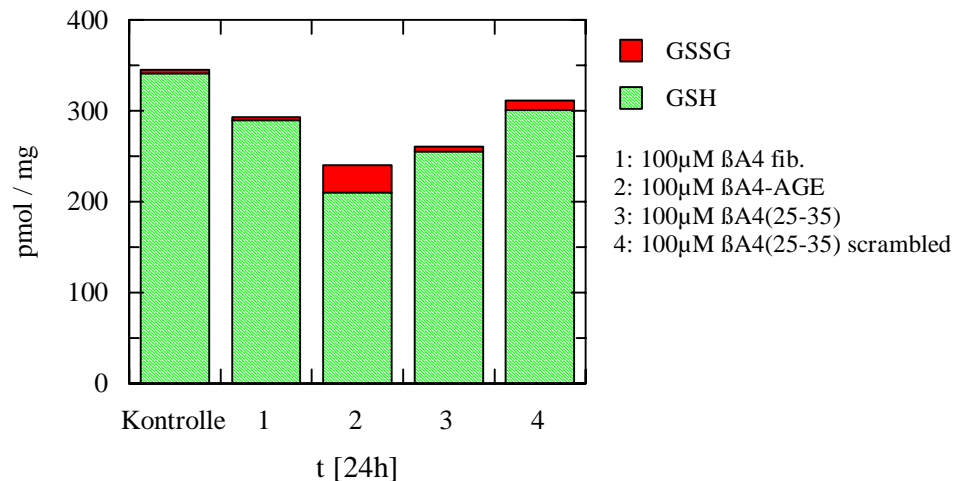


Abb. 39: Glutathionspiegel von SY5Y-Zellen nach Inkubation mit  $\beta$ A4 SH-SY5Y-Zellen wurden 24h mit je 100 $\mu$ M fibrillärem  $\beta$ A4,  $\beta$ A4-AGE,  $\beta$ A4 (25-35) oder Kontrollpeptid (scrambled) inkubiert und die Menge GSH und GSSG pro Milligramm Protein bestimmt.  $\beta$ A4 führt zu im Vergleich mit der Kontrolle erniedrigtem GSH-Gehalt der Zellen,  $\beta$ A4 -AGE behandelte Zellen haben den geringsten GSH-Gehalt bei maximaler Menge GSSG.

## 5.3. Wiederherstellung des Thiolstatus durch Antioxidantien

Der Thiolstatus AGE-gestresster Zellen liess sich durch Antioxidantien verbessern. Sowohl der Glutathiongehalt pro mg Zellprotein als auch das Verhältnis GSH / GSSG wird durch die Gabe von 100 $\mu$ M (R+)  $\alpha$ -Liponsäure oder 10 $\mu$ M 17 $\beta$ -Estradiol 60 min. vor der BSA-AGE-Gabe normalisiert. Auch die Gabe von 1mM N-Acetylcystein oder 400 $\mu$ g / ml Katalase gleichzeitig mit BSA-AGE wirkte protektiv.

Das Blocken des RAGE-Rezeptors mit neutralisierenden Antikörpern (1:500, 1h vorinkubiert) verbesserte das Verhältnis GSH / GSSG im Vergleich dazu nur wenig.

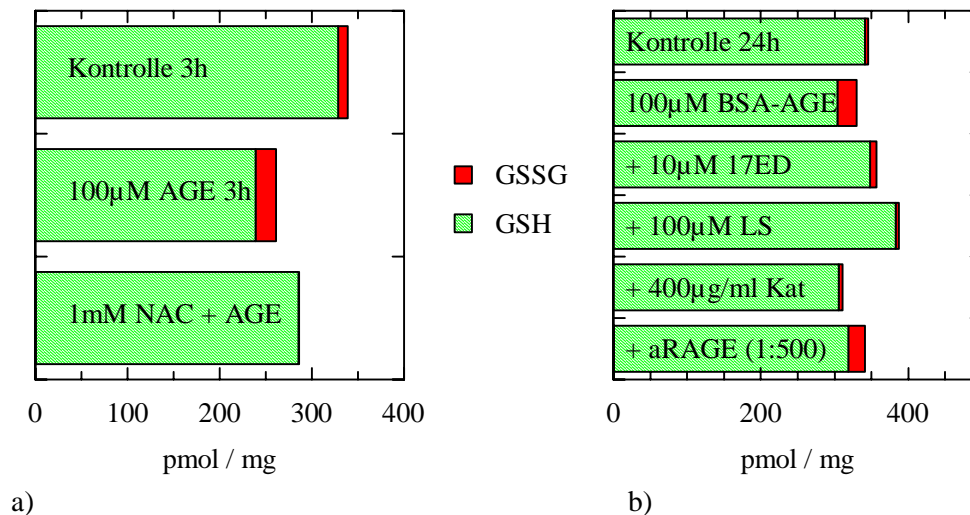


Abb. 40: Normalisierung des Thiolstatus von SY5Y-Zellen durch Antioxidantien

a) Zellen wurden 3h mit je 100µM BSA-AGE oder 100µM BSA-AGE und 1mM NAC inkubiert und der GSH- und GSSG-Gehalt pro mg Protein gemessen.

b) Zellen wurden 1h mit 100µM  $\alpha$ -Liponsäure, 10µM 17 $\beta$ -Estradiol oder RAGE-Antikörper (Peptid-AK, 1:500) inkubiert und je 100µM BSA-AGE zugegeben. Weiter wurden Zellen mit 400µg/ml Katalase und 100µM BSA-AGE behandelt. Nach 24h wurde der Gehalt an GSH und GSSG pro mg Protein gemessen.

## 6. Untersuchungen zur Art des AGE-vermittelten Zelltods

Die zwei Extrembeispiele des Zelltods sind Apoptose (kontrollierte Degradation der Zelle, Energiebedürftig) und Nekrose (Membranzerstörung, Zusammenbruch der Energieversorgung, entzündliche Reaktion), dazwischen existieren jedoch zahlreiche Misch- und Übergangsformen. Ausserdem ist der Übergang von einem anfänglich apoptotischen zu einem nekrotischen Zelltod, abhängig u.a. auch vom Energiestatus der Zelle, möglich.

Beim AGE-induzierten Zelltod von Neuroblastoma Zellen ist der Verlust von Axonen und Dendriten sowie eine Verkleinerung des Zellvolumens zu beobachten. Die Verkleinerung der Zelle kann Zeichen eines frühen Apoptosestadiums sein. Für BHK 21 Zellen wurde jedoch bereits durch Fluoreszenzfärbungen mit Propidiumiodid und Hoechst 33258 gezeigt, dass hier durch AGEs keine DNA-Fragmentierung als Zeichen einer Apoptose induziert wird (Geiger, 1997).

Frühe Stadien der Apoptose werden mit diesen Tests nicht erfasst, ausserdem können Fibroblasten und Neuroblastoma Zellen unterschiedlich reagieren. In einigen Zellen, z.B. HUVECS, können AGEs Apoptose auslösen (Cheolhong et al., 1999). Für SY5Y Zellen lagen keine Angaben vor, deshalb wurden frühe Marker der Apoptose wie das Auftauchen von Phosphatidylserin auf der extrazellulären Seite der Membran, die Freisetzung von

mitochondrialem Cytochrom c ins Zytosol und die Aktivierung von CPP32 in AGE-gestressten SH-SY5Y-Zellen untersucht.

### **6.1. Annexin-Fluorescein-Färbungen**

Als früher Marker der Apoptose wurde die Translokation von Phosphatidylserin (PS), einem integralen Membranprotein, untersucht. Dieses befindet sich in intakten Zellen auf der zytoplasmatischen Seite der Membran und gelangt in der Apoptose an die Membranaussenseite (Vermes et al., 1995). *In vivo* wird es dort von Makrophagen erkannt. Die betroffenen Zellen werden aus dem Organismus entfernt, um den Organismus vor der Exposition zellulärer Proteasen, die bei der Nekrose freigesetzt werden und Entzündungsreaktionen auslösen, zu schützen. Die Translokation von Phosphatidylserin kann in apoptotischen Zellen bereits vor der Aktivierung von Caspasen nachgewiesen werden (Grub et al, 2000).

Phosphatidylserin wird spezifisch durch Annexin V, einem kalzium-abhängigen, Phospholipid-bindenden Protein erkannt, das daher in FACS-Messungen als Marker dienen kann. Nekrotische Zellen, die durch den Verlust der Membranintegrität ebenfalls Annexin binden, werden durch Gegenfärbung mit dem nicht membrangängigen DNA-Interkalator 7-Aminoantimycin (7-AAD) von den nur Annexin-positiven Zellen unterschieden.

SH-SY5Y-Zellen wurden für 24h mit verschiedenen Konzentrationen BSA-AGE inkubiert und der Prozentsatz apoptotischer und nekrotischer Zellen durch Annexin-V-Fluos / 7-AAD Färbung und FACS-Analyse bestimmt. Als Positivkontrolle für die Apoptose dienten Zellen, die mit 150nmol Staurosporin inkubiert wurden, hier fanden sich nach 24h 25,6% apoptotische und 12,6% nekrotische SY5Y-Zellen (Abb.41f).

Es zeigte sich, dass 50 $\mu$ M BSA-AGE zu einer Zunahme der Annexin-positiven, apoptotischen Zellfraktion von 11,4% bei unbehandelten Kontrollzellen auf 25,6% führte. Die Menge doppelt-positiver, d.h. nekrotischer Zellen blieb mit 6,4 % nahezu unverändert (Abb.41a, 41b). Die Inkubation mit 100 $\mu$ M BSA-AGE führte nicht zu einem Anstieg der Menge apoptotischer Zellen. Dafür stieg jedoch der Prozentsatz nekrotischer Zellen von 5,5% bei unbehandelten Zellen auf 30% an (Abb.41c). Nach 24h-stündiger Inkubation mit 200 $\mu$ M BSA-AGE waren im FACS 88% aller Zellen doppelt-positiv, d.h. nekrotisch (Abb.41d).

Durch (R+)  $\alpha$ -Liponsäure konnte der Prozentsatz nekrotischer Zellen verringert werden. Dazu wurde Liponsäure (100 $\mu$ M) 60 min vor der Gabe von 100 $\mu$ M BSA-AGE appliziert und die Zellen nach 24h im FACS analysiert. Der Prozentsatz apoptotischer Zellen blieb mit 25,8% etwa unverändert, die Population der nekrotischen Zellen sank jedoch deutlich von 30% auf 9,4% (Abb.41e).

Niedrige BSA-AGE Konzentrationen (50 $\mu$ M) führen zu einer leichten Erhöhung der apoptotischen Zellfraktion, mit Erhöhung der AGE-Menge kommt es jedoch zu einer Verschiebung hin zur Nekrose. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Zytotoxizitätsassays, bei denen Einschränkungen in der mitochondrialen Respiration und der Verlust der Membranintegrität erst bei AGE-Konzentrationen über 50 $\mu$ M nachgewiesen werden konnten.

Abb.41 (folgende Seite): FACS-Analyse AGE-gestresster Zellen.

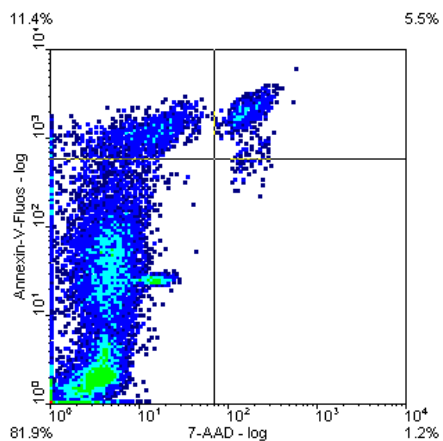
SH-SY5Y-Zellen wurden 24h mit BSA-AGE, Staurosporin oder BSA-AGE und Liponsäure inkubiert. Der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen an der Gesamtzellpopulation wurde durch Färbung mit Annexin-V und 7-AAD bestimmt.

Die Zellpopulationen verteilen sich wie folgt in den Quadranten:

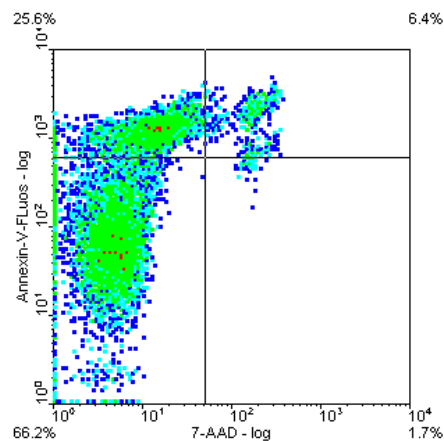
unten links: vitale Zellen; Annexin<sup>-</sup>, 7-AAD<sup>-</sup>

oben links: apoptotische Zellen; Annexin<sup>+</sup>, 7-AAD<sup>-</sup>

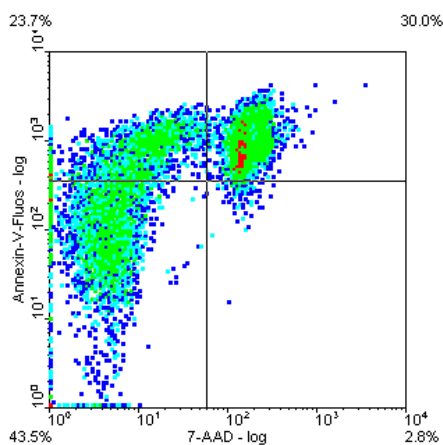
oben rechts: nekrotische Zellen; Annexin<sup>+</sup>, 7-AAD<sup>+</sup>



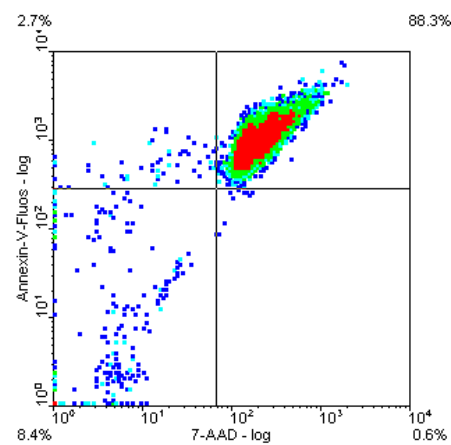
41a: Kontrolle



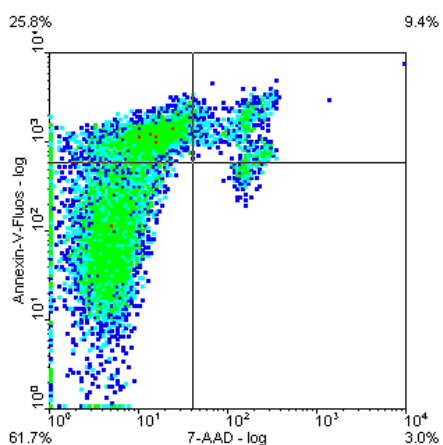
41b: 50µM BSA-AGE



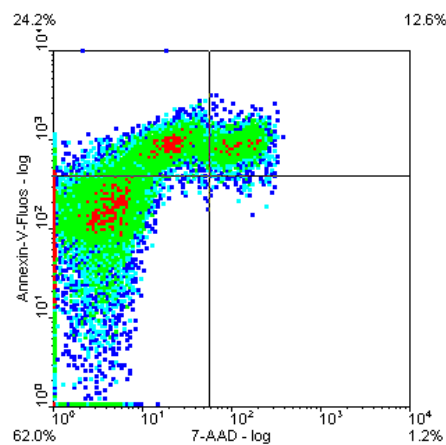
41c: 100µM BSA-AGE



41d: 200µM BSA-AGE



41e: 100µM BSA-AGE + 100µM LS



41f: 150nmol Staurosporin

## **6.2. Freisetzung von Cytochrom c ins Zytoplasma**

Auch Mitochondrien sind am Zelltod beteiligt. Beschädigte Mitochondrien setzen Cytochrom c ins Zytosol frei, danach kommt es zur Aktivierung der Caspase-3 und zu Apoptose. Da die Ergebnisse aus den MTT-Assays zeigen, dass der mitochondriale Elektronentransport bei AGE-gestressten Zellen gestört ist, wurde getestet, ob Cytochrom c im Zytosol nachzuweisen ist.

Für die Cytochrom c Bestimmung im Westernblot wurden Zellysate nach Digitonin-Lyse in Saccharose-haltigem Puffer benutzt. Dies stellt sicher, dass nur zytoplasmatisches Cytochrom c isoliert wird und die Mitochondrien intakt bleiben. Die maximal freisetzbare Menge des Proteins wurde durch Lyse der Zellen mit 1% TritonX-100 bestimmt.

Reduziertes Cytochrom c erscheint im Westernblot mit anti-Cytc Antikörpern als Bande von 15 kDa. Die nach Entwicklung des Westernblots mit ECL erhaltenen Banden wurden eingescannt, densitometrisch ausgewertet und die Ergebnisse graphisch aufgetragen.

SY5Y-Zellen wurden mit BSA-AGE oder BSA-AGE und Antioxidantien behandelt und auf die Freisetzung von Cytochrom c getestet. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die für 24h mit 250 nmol Staurosporin inkubiert wurden.

Während bei unbehandelten Kontrollzellen nur geringe Mengen Cytochrom c nachzuweisen waren (5%), nahm die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytosol nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M, oder 150 $\mu$ M BSA-AGE dosisabhängig zu. Wurden die Zellen vor und während der AGE-Behandlung mit 100 $\mu$ M  $\alpha$ -Liponsäure oder 10 $\mu$ M 17 $\beta$ -Estradiol inkubiert, wurde im Vergleich zu nicht-Antioxidans behandelten Zellen weniger Cyt c freigesetzt. Die Inkubation der Zellen mit Methylglyoxal (1mM, 24h) führte nicht zur Freisetzung von Cytochrom c (Abb. 42).

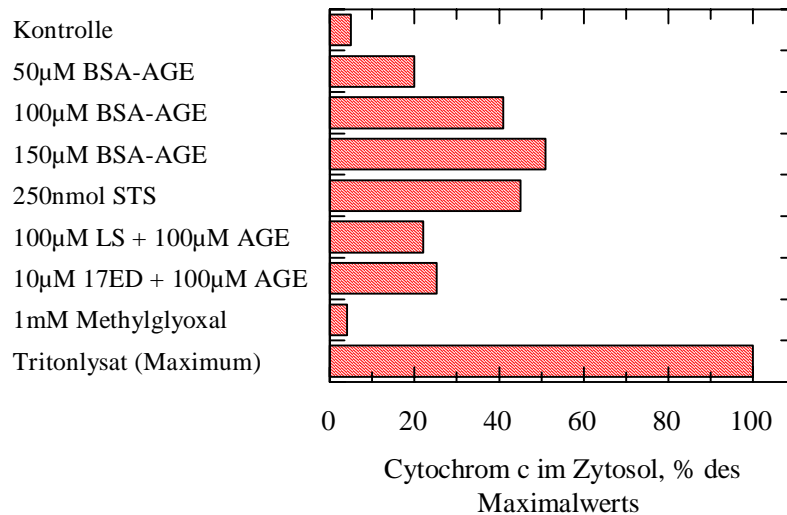


Abb. 42: Nachweis von Cyt c im Zytoplasma AGE-gestresster Zellen.

Lysate von SH-SY5Y Zellen, die 24h mit AGEs und Antioxidantien in den o.g. Konzentrationen inkubiert wurden, wurden im Westernblot mit anti-Cyt c Antikörper auf die Freisetzung von Cyt C ins Zytoplasma untersucht. Die Auswertung erfolgte densitometrisch.

AGEs induzieren die Freisetzung von Cytochrom c als proapoptisches Signal ins Zytoplasma. Cytochrom c kann von ATP-depletierten Zellen jedoch auch ohne die Aktivierung von Caspasen quasi " prä-nekrotisch " freigesetzt werden (Leist et al., 1999), das Auftauchen von Cytochrom c im Zytoplasma AGE-gestresster Zellen ist somit kein eindeutiger Hinweis auf Apoptose. Daher wurde als weiterer Schritt in der apoptotischen Signalkaskade die Spaltung von PARP als Zeichen für die Aktivierung der Caspase-3 untersucht.

### **6.3. Spaltung von PARP**

Die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) dient als Substrat für die Apoptose-spezifischen Proteasen der ICE-Familie, z.B. für Caspase-3 (CPP32). Die 113 kDa grosse PARP wird während der Apoptose in zwei 89 kDa und 24 kDa grosse Fragmente gespalten. Diese lassen sich im Westernblot mit PARP-Antikörpern nachweisen.

Es wurden Lysate von SH-SY5Y Zellen hergestellt, die mit 50µM und 100µM BSA-AGE 24h inkubiert wurden sowie Lysate von Zellen, die 6h und 24h mit 150µM BSA-AGE behandelt wurden. Als Positivkontrolle dienten Staurosporin-behandelte Zellen, bei denen nach 6h und 24h Inkubation mit 250nmol STS beide Spaltprodukte nachzuweisen waren.

Für BSA-AGE-behandelte Zellen konnte keine Spaltung der PARP gefunden werden (Abb. 43). Da dies jedoch als Marker für die Aktivierung der Caspase-3 anzusehen ist, ohne die eine

Apoptose nicht möglich ist, erscheint eine durch AGEs ausgelöste Apoptose in SH-SY5Y-Zellen trotz des leicht erhöhten Anteils von Phosphatidylserin auf der Membranaussenseite nach Inkubation mit 50 $\mu$ M BSA-AGE unwahrscheinlich.

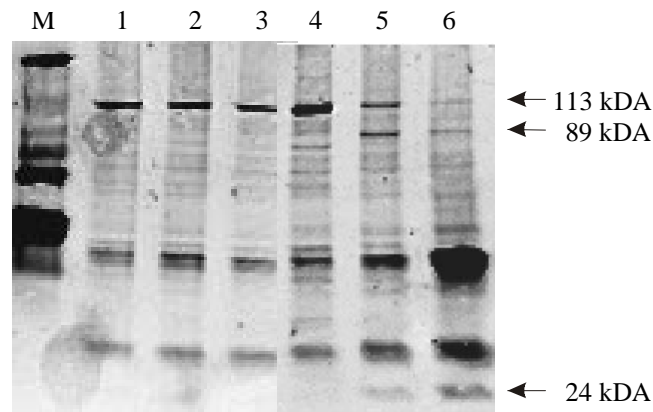


Abb. 43: Die Inkubation von SY5Y-Zellen mit BSA-AGE führt nicht zur Spaltung von PARP durch Caspase-3.

Zellen wurden für 24h mit 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M BSA-AGE oder 150 $\mu$ M BSA-AGE inkubiert. Je 10 $\mu$ g Protein wurden im SDS-Gel aufgetrennt und im Westernblot mit anti-PARP-Antikörper (1:5000) auf die Spaltung von PARP untersucht. Als Positivkontrolle dienten STS-behandelte Zellen, bei denen die Spaltprodukte der PARP nachgewiesen werden konnten.

M: Marker

1: Kontrolle

2: 50 $\mu$ M AGE, 24h

3: 100 $\mu$ M AGE, 24h

4: 150 $\mu$ M AGE, 24h

5: 250nmol STS, 6h

6: 250nmol STS, 24h



## **7. Untersuchungen zum Energiestatus AGE-behandelter Zellen**

### **7.1. ATP-Gehalt AGE-gestresster Zellen**

Da AGEs zytotoxisch sind, der durch sie ausgelöste Zelltod aber anscheinend nur im Anfangsstadium apoptotisch verläuft, wurde der ATP-Spiegel AGE-gestresster Zellen näher untersucht. Das Vorkommen von Cytochrom c im Zytoplasma ohne die Aktivierung von Caspase und auch die Inhibition des mitochondrialen Elektronentransports durch AGEs deuten auf eine Störung im Energiehaushalt der AGE-gestressten Zellen hin. Ein kontrollierter, apoptotischer Zelltod setzt u.a. auch ATP voraus. Kann der Energiemangel durch die eingeschränkte mitochondriale Funktion nicht anderweitig kompensiert werden und fällt der ATP-Spiegel unter eine kritische Grösse, ist Apoptose nicht möglich.

Deshalb wurde der ATP-Gehalt von Zellen, die mit verschiedenen AGE-Konzentrationen inkubiert wurden, mittels Luziferase vermittelter Chemilumineszenz gemessen und mit dem ungestresster Kontrollzellen verglichen.

Die Ansätze erfolgten als Doppelbestimmung, es wurden jeweils die Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen aufgetragen.

#### **7.1.1. ATP-Depletion durch BSA-AGE**

Entsprechend der Toxizität des verwendeten BSA-AGEs Nr.9 wurden 3 verschiedene Konzentrationen eingesetzt: 50 $\mu$ M als nicht-toxische Dosis, 100 $\mu$ M als sublethale Menge unterhalb der LD<sub>50</sub> Dosis und 150 $\mu$ M AGE als toxische Dosis.

Es zeigte sich, dass der ATP-Gehalt von SH-SY5Y-Zellen unter AGE-Stress zeit- und konzentrationsabhängig abnimmt (Ab. 44). Unmodifiziertes BSA hatte keine ATP-depletierende Wirkung.

Bei niedrigen Konzentrationen AGE wie 50 $\mu$ M ist der ATP-Verlust nur gering, in Übereinstimmung damit, dass im MTT-Assay mit 50 $\mu$ M weder nach 6h noch nach 24h eine deutliche Beeinflussung der mitochondrialen Respiration beobachtet werden konnte.

Verwendet man 100 $\mu$ M BSA-AGE, eine Menge bei der im MTT-Assay noch etwa 80% vitale Zellen nachzuweisen sind, ist nach 6h lediglich eine Abnahme des ATP-Spiegels pro Zelle um 5% zu beobachten, nach 24h fällt der ATP Gehalt pro Zelle jedoch auf 60% des Ausgangswertes. Diese Differenz zwischen MTT-Assay und ATP resultiert möglicherweise aus einer Inhibition glykolytischer Enzyme durch AGEs, die sich im ATP-Gehalt niederschlägt, aber im MTT-Assay nicht erfasst wird.

Wird die AGE-Gabe auf die LD<sub>50</sub>-Dosis erhöht, sinkt der ATP-Gehalt pro Zelle bereits nach 6h erkennbar auf knapp 80% ab, nach 24h beträgt er lediglich noch 40% der Kontrolle (Abb. 44a). Bezieht man den ATP-Gehalt auf den Proteingehalt der Zellen ergeben sich ähnliche Werte (Abb. 44b). Diese Daten zeigen, dass AGE-Stress das Verhältnis von Produktion und Verbrauch von ATP verschieben.

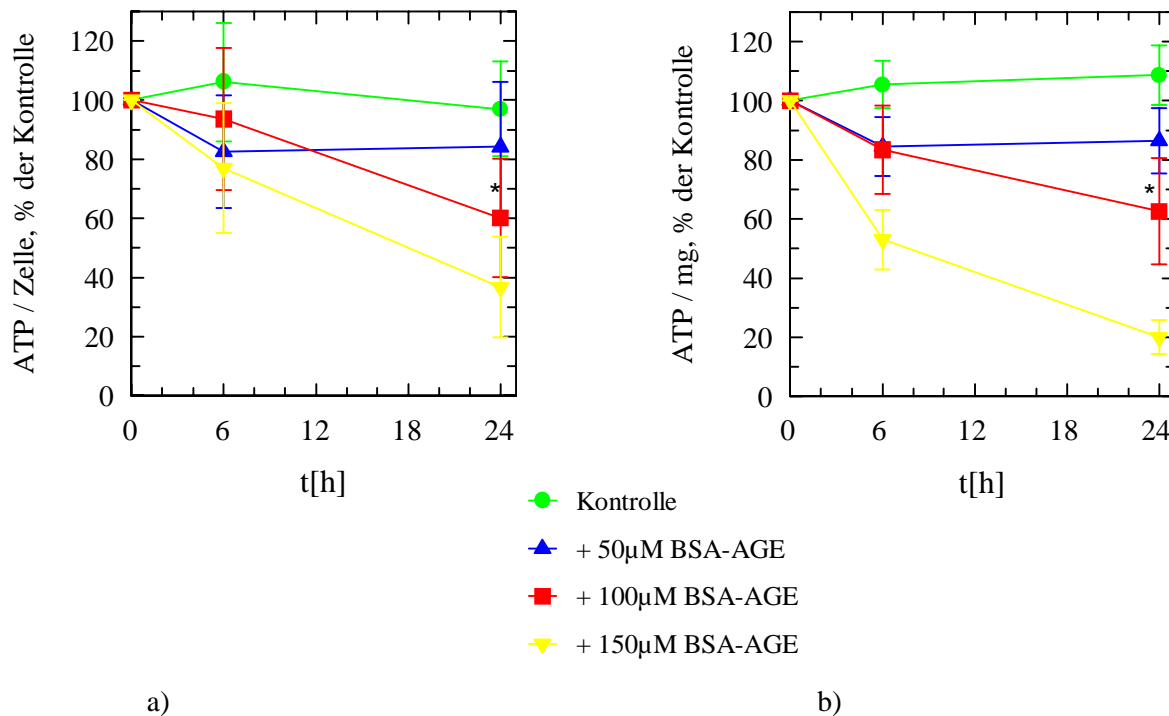


Abb. 44: AGE-Stress führt zeit- und dosisabhängig zur Depletion von intrazellulärem ATP. SH-SY5Y Zellen wurden mit BSA-AGE inkubiert und der ATP-Gehalt der Zellysate zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt. Der ATP-Gehalt unbehandelter Kontrollzellen pro Zelle (a) bzw. pro Milligramm Zellprotein (b) zum Zeitpunkt  $t = 0$ h wurde gleich 100% gesetzt. (\*  $p < 0,05$ ;  $n=9$ )

### 7.1.2. ATP-Depletion durch $\beta$ A4 und $\beta$ A4 -AGE

Auch  $\beta$ -A4 (1-40) kann Energiedepletion auslösen. Dabei zeigte sich, dass fibrilläres  $\beta$ A4 (1-40) zwar nur schwach toxisch ist (vgl. auch MTT-Assay) und zur Abnahme der Menge an intrazellulärem ATP führt, dieser Effekt aber durch Glykierung und AGE-Bildung um weitere 10 - 15 % verstärkt werden kann. Nach 24-stündiger Inkubation von Zellen mit 100µM fibrillärem  $\beta$ A4 beträgt der intrazelluläre ATP-Gehalt noch 80% der Kontrolle, mit  $\beta$ A4 - AGE sinkt der ATP-Spiegel auf 65% (Abb. 45). Da die AGE-Bildung bei  $\beta$ A4 (1-40) aufgrund des geringen Gehalts an Glykierungsstellen (es stehen 2 Lysine, 1 Arginin und der N-Terminus zur Verfügung) langsam vor sich geht, ist der AGE-Gehalt der verwendete  $\beta$ A4-AGE Präparation im Vergleich zum BSA-AGE gering, dies zeigt auch der geringe Gehalt an CML (vgl. 2.2.4.).

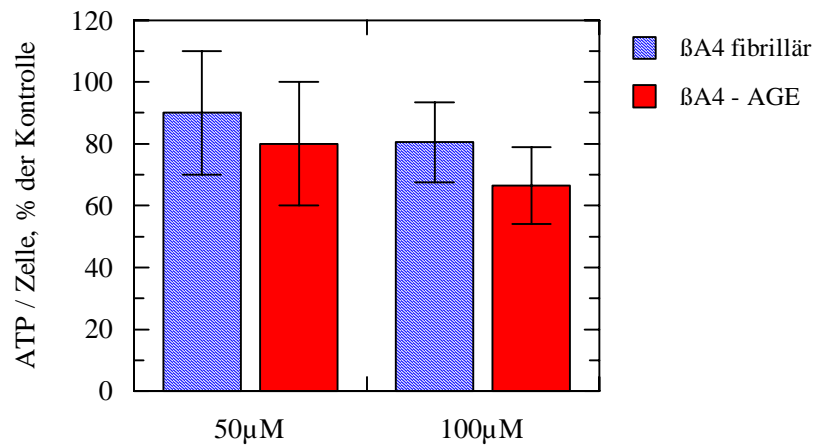


Abb. 45: ATP-Depletion durch  $\beta$ A4 - AGE

Die 24-stündige Inkubation von Zellen mit 50µM oder 100µM  $\beta$ A4 - AGE führt im Vergleich zu nichtglykiertem, fibrillärem  $\beta$ A4 zu einer verstärkten ATP-Depletion.

## 7.2. Änderungen im Glukoseverbrauch durch AGE-Stress

Neurale Zellen sind zur Energieversorgung besonders abhängig von der Glykolyse. Es ist bekannt, dass bei der Alzheimerschen Demenz der zerebrale Glukoseumsatz eingeschränkt ist. Um zu testen, welche Stoffwechselfunktionen neben den Enzymen der Atmungskette bei der Inkubation von Zellen mit AGEs beeinträchtigt sein können und zur ATP-Depletion beitragen, wurde als erster Schritt des Glukosemetabolismus in AGE-gestressten Zellen die Glukoseaufnahme aus dem Kulturmedium untersucht. Die Bestimmung erfolgte indirekt durch Messung des Glukosegehaltes des Zellkulturüberstandes. Der Glukoseverbrauch wurde aus der Differenz zwischen dem Glukosegehalt des Mediums zum Zeitpunkt  $t = 0$ h und dem Messpunkt ermittelt. Der Glukosegehalt von Kulturmedium, das 24h mit BSA-AGE ohne Zellen inkubiert wurde, blieb unverändert. Die unspezifische Bindung von Glukose an das maximal modifizierte AGE ist daher unwahrscheinlich.

### 7.2.1. Effekt von BSA-AGE

Die Aufnahme von Glukose aus dem Medium ist bei BSA-AGE-Konzentrationen bis 50µM unverändert. Wie bei unbehandelten Kontrollzellen nimmt die Glukosekonzentration im Medium kontinuierlich ab, d.h. Glukose wird verbraucht.

Bei Inkubation mit 100µM oder 150µM BSA-AGE kam es in den ersten 6h zu einem Abfall in der Glukosekonzentration des Kulturüberstandes, also zu einer Steigerung der Glukoseaufnahme der Zellen. Im weiteren Verlauf der Inkubation war die Glukoseaufnahme der AGE-

behandelten Zellen gegenüber den Kontrollzellen stark erniedrigt (Abb. 46), was auf eine Störung des Glukosetransports oder eine Produktinhibition hindeuten könnte.

Diese Veränderungen gehen der ATP-Depletion und den im MTT-Assay erfassten Einschränkungen in der mitochondrialen Respiration voraus.

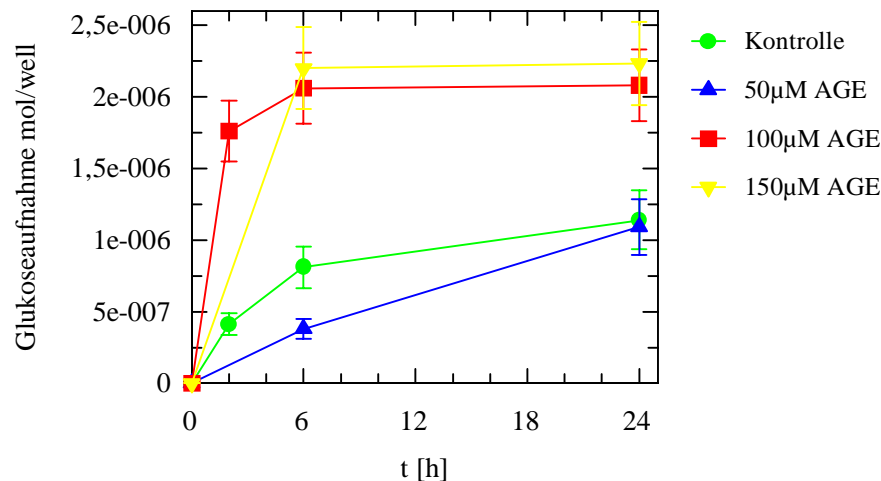


Abb. 46: Glukoseaufnahme von AGE-gestressten SH-SY5Y Zellen.

Die Zellen wurden mit BSA-AGE inkubiert und die Glukoseaufnahme indirekt durch Messung der Glukosekonzentration des Kulturmediums erfasst. Die Differenz der Glukosekonzentration  $t=0h$  und  $t=6h$  oder  $t=24h$  wurde errechnet und aufgetragen. (n=8)

### 7.2.2. Effekt von $\beta A4$ und $\beta A4$ -AGE

Auch  $\beta$ -Amyloid führt zu einem erhöhten Glukoseverbrauch der Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 47). Die Ergebnisse entsprechen in etwa denen mit 100µM BSA-AGE. Die Glukoseaufnahme von  $\beta A4$ -AGE behandelten Zellen ist im Vergleich zu  $\beta A4$  behandelten Zellen leicht erhöht, ein Unterschied zwischen glykiertem und fibrillärem  $\beta A4$  besteht jedoch nicht, was an der geringeren AGE-Modifikation des Amyloid-AGEs liegen könnte.

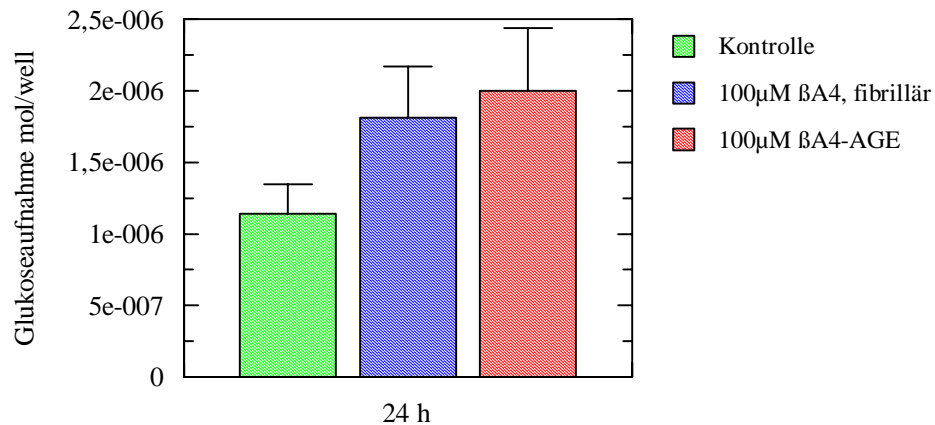


Abb. 47: Glukoseverbrauch von SH-SY5Y-Zellen, die 24h mit 100μM fibrillärem βA4 oder mit 100μM βA4 -AGE inkubiert wurden.

### **7.3. Laktatausschüttung AGE-gestresster Zellen**

Der Anstieg des Glukoseverbrauchs bei nachfolgendem Abfall des ATP-Spiegels lässt vermuten, dass es in AGE-behandelten Zellen durch die Inhibierung der mitochondrialen Atmungskette zur Anhäufung von Pyruvat kommt, das zu Laktat reduziert und ausgeschüttet wird. Es wäre dann im Kulturüberstand nachzuweisen. Auch für die AD ist eine Azidose des Hirngewebes postmortem nachgewiesen (Tsai et al, 97).

Ein Überschuss an extrazellulärem Laktat kann auch eine Inhibition der Glukoseaufnahme verursachen (Lombardi et al., 1999). Die Laktatausschüttung von AGE-gestressten SH-SY5Y-Zellen wurde daher zeit- und dosisabhängig verfolgt. Laktat wurde mit einer gekoppelten Enzymreaktion über Laktatdehydrogenase / Glutamat-Pyruvat-Transaminase gemessen.

#### **7.3.1. Effekt von BSA-AGE**

Erhöhte Laktatwerte im Kulturüberstand wurden erstmals 6h nach der BSA-AGE Gabe nachgewiesen. Während 50μM AGE nur zu einem Anstieg der Laktatproduktion um 50% führt, erreicht der Laktatwert für Zellen, die mit 100μM BSA-AGE behandelt wurden, nach 24h etwa das dreifache des Kontrollwerts (pro Zelle, pro Milligramm Protein ca. das 4-fache der Kontrolle). Höhere Dosen BSA-AGE im LD<sub>50</sub> Bereich (150μM) führen zu einer schwächeren Aktivierung, wobei von den Zellen immer noch doppelt soviel Laktat ausgeschüttet wird als von unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 48). Längere Inkubation mit 150μM AGE führt zu Einschränkungen in der mitochondrialen Respiration und der Glykolyse, die nicht mehr ausgeglichen werden können. AGE Stress bis zu einer Konzentration von 50μM kann offenbar durch die Zellen kompensiert werden. Durch Erhöhung des Glukoseverbrauchs bei steigender Laktatausschüttung kann auch dem ATP-Mangel, verursacht von 100μM AGE

noch entgegengewirkt werden. Mit  $150\mu\text{M}$  AGE sind die kompensatorischen Fähigkeiten der Zelle erschöpft, die Konsequenz ist Zelltod in Folge von Energiedepletion.

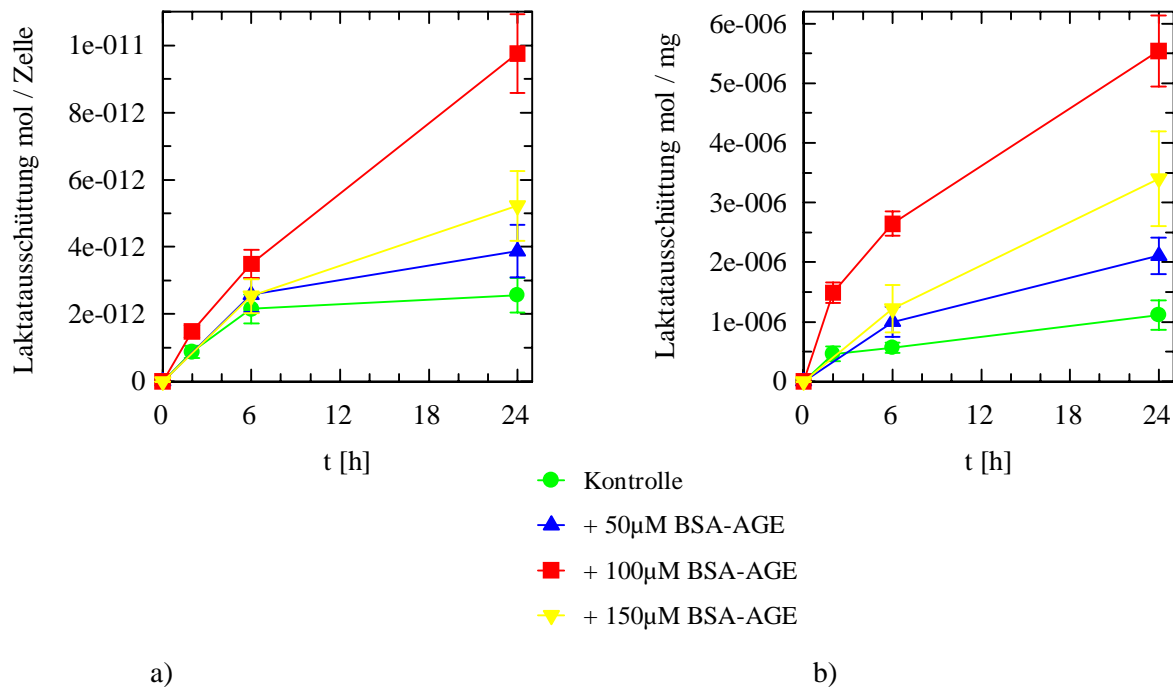


Abb. 48: Steigerung der Laktatausschüttung von SH-SY5Y-Zellen nach AGE-Stress

Die Laktatausschüttung BSA-AGE gestresster Zellen wurde sowohl pro Zelle (a) als auch pro mg Protein (b) bestimmt. (n=8)

### 7.3.2. Effekt von $\beta\text{A4}$ und $\beta\text{A4-AGE}$

Im Gegensatz zur Inkubation von SH-SY5Y-Zellen mit BSA-AGE führte die 24-stündige Inkubation mit je  $100\mu\text{M}$  fibrillärem  $\beta\text{A4}$  oder  $\beta\text{A4-AGE}$  nicht zu einer verstärkten Laktatausschüttung (Abb.49).

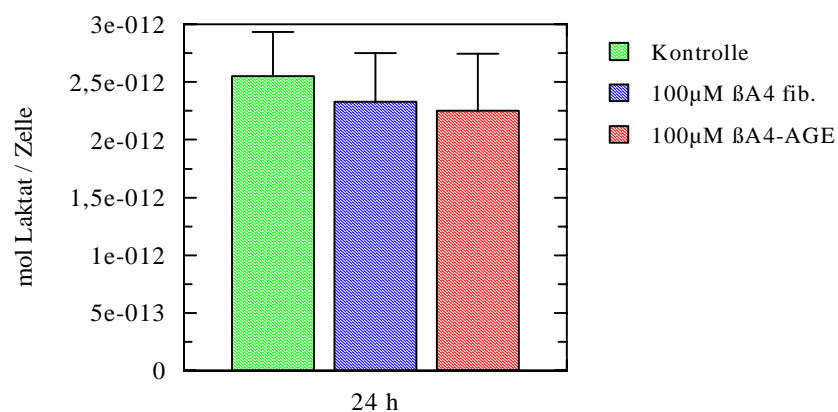


Abb. 49: Laktatausschüttung von SY5Y-Zellen nach Inkubation mit je  $100\mu\text{M}$   $\beta\text{A4}$  oder  $\beta\text{A4-AGE}$ .

## **7.4. Abschwächung der ATP-Depletion und Normalisierung der Glukoseaufnahme und Laktatausschüttung durch Antioxidantien und andere Substanzen**

Wie bereits im MTT-Test gezeigt, kann der AGE-induzierte Zelltod unter anderem durch die Gabe von Antioxidantien abgeschwächt werden. Es liegt daher nahe, dass Antioxidantien und andere, unter 2.3. getestete Substanzen auch die AGE-induzierten Veränderungen im Metabolismus der Zelle wie ATP-Depletion, Glukoseverbrauch und Laktatausschüttung beeinflussen und normalisieren können. Für diese Experimente wurde nicht die LD<sub>50</sub> von 150µM BSA-AGE sondern 100µM BSA-AGE verwendet, da vor allem untersucht werden sollte, ob durch AGEs in sublethalen Konzentrationen verursachte Veränderungen verhindert werden können.

### **7.4.1. Normalisierung des ATP-Spiegels**

#### **7.4.1.1. (R+) $\alpha$ -Liponsäure und 17 $\beta$ -Estradiol**

Durch die Gabe von 100µM (R+)  $\alpha$ -Liponsäure oder 10µM 17 $\beta$ -Estradiol 1h vor der Zugabe von 100µM BSA-AGE konnte der intrazelluläre ATP-Gehalt von SH-SY5Y Zellen im Vergleich zu Zellen, die nicht mit Antioxidantien behandelt wurden, deutlich erhöht werden. Die Inkubation der Zellen mit 100µM (R+)  $\alpha$ -Liponsäure oder 10µM 17 $\beta$ -Estradiol allein verursachte nach 24h keine Veränderungen des ATP-Gehalts, nach 6-stündiger Inkubation von Zellen mit 100µM Liponsäure war der ATP-Gehalt der Zellen im Vergleich zur Kontrolle jedoch um 30% erhöht.

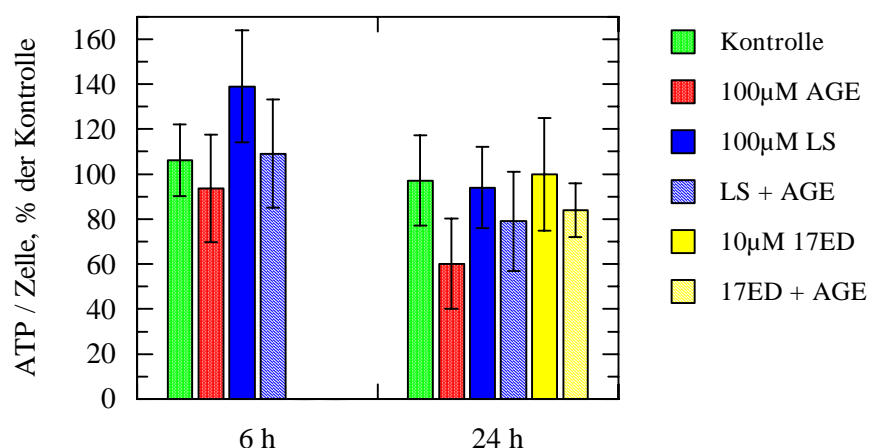


Abb. 50: Abschwächung der AGE-induzierten ATP-Depletion durch Antioxidantien

Zellen wurden 1h vor der AGE-Gabe (100µM) mit den Antioxidantien (R+)  $\alpha$ -Liponsäure (LS) und 17 $\beta$ -Estradiol (17ED) behandelt. Der ATP-Gehalt der Kontrolle t=0h wurde gleich 100% gesetzt. (n=4)

### 7.4.1.2. Andere Antioxidantien und Pyruvat

Protektiv wirkte auch die Gabe von Katalase (400µg/ml) und Aminoguanidin (5mM) gleichzeitig mit 100µM BSA-AGE, mit denen eine völlige Normalisierung des ATP-Spiegels von SH-SY5Y Zellen gelang (Abb. 51). Auch Pyruvat (2mM) führte zu einer Verminderung der ATP-Depletion (Erhöhung des ATP-Gehalts von 60% der Kontrolle auf 80% der Kontrolle), erwies sich jedoch als weniger effektiv als die Antioxidantien bzw. der Carbonyl-Scavenger Aminoguanidin.

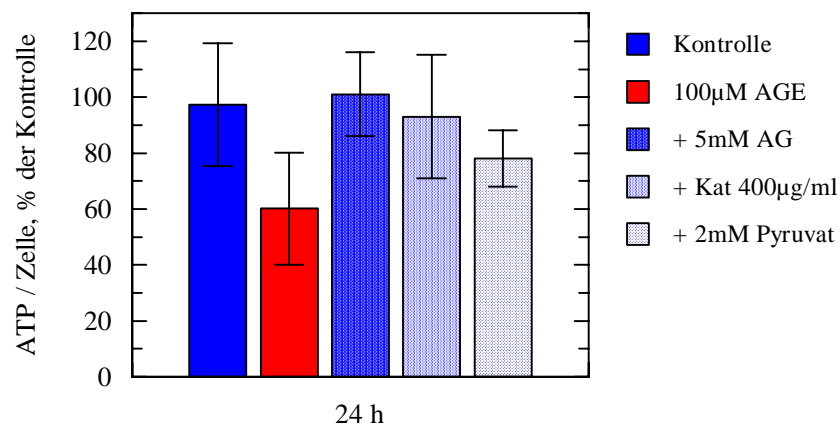


Abb. 51: Abschwächung der AGE-induzierten ATP-Depletion in SH-SY5Y Zellen durch Pyruvat, Aminoguanidin oder Katalase. Pyruvat wurde 2h vor der Gabe des AGEs appliziert, Aminoguanidin und Katalase wurden gleichzeitig mit 100µM BSA-AGE zugegeben.

### 7.4.2. Normalisierung der Glukoseaufnahme

Auch die Glukoseaufnahme von SH-SY5Y Zellen, die mit 100µM BSA-AGE inkubiert wurden, konnte durch Antioxidantien normalisiert werden (Abb.52a). Vorinkubation für 1h mit 100µM (R+)  $\alpha$ -Liponsäure, aber auch die gleichzeitige Gabe von 400µg/ml Katalase und BSA-AGE führten zu einer Angleichung der Glukoseaufnahme an die Kontrolle.

Auch Zellen, die 1h mit 10µM 17 $\beta$ -Estradiol vorinkubiert wurden, verbrauchen weniger Glukose als unbehandelte Zellen. Die Aufnahme bleibt jedoch im Vergleich zur Kontrolle erhöht.

Pyruvat als Stoffwechselintermediat und Radikalfänger normalisiert die Glukoseaufnahme, die Zellen wurden 2h mit 2mM Pyruvat vorinkubiert.

Für (R+)  $\alpha$ -Liponsäure konnte gezeigt werden, dass die Glukoseaufnahme kontinuierlich über 24h erfolgt und nicht, wie bei AGE-gestressten Zellen nach 6h ein Maximum erreicht um dann kaum noch anzusteigen (Abb.52b).



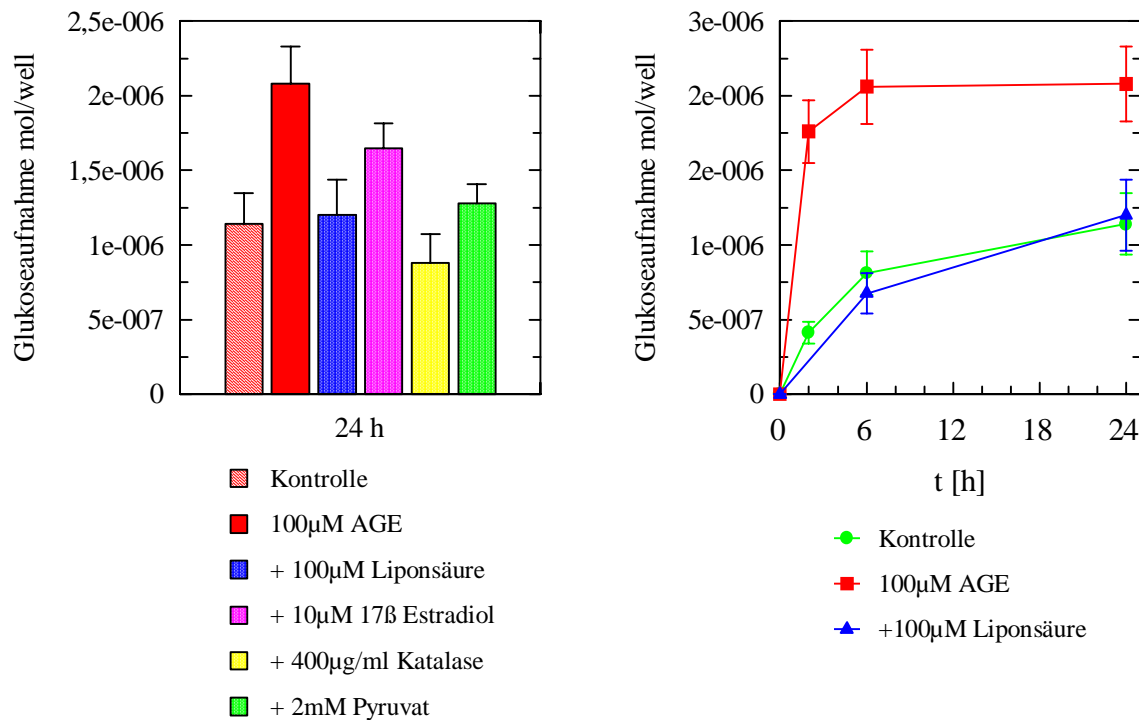


Abb. 52: Normalisierung der Glukoseaufnahme AGE-gestresster SY5Y Zellen durch Antioxidantien  
 Die Zellen wurden mit BSA-AGE und Antioxidantien inkubiert und die Glukoseaufnahme indirekt durch Messung der Glukosekonzentration des Kulturmediums bestimmt. Die Differenz der Glukosekonzentration von t=0h und t=6h bzw. t=24h wurde errechnet und aufgetragen.  
 $\alpha$ -Liponsäure und 17 $\beta$ -Estradiol wurden 1h, Pyruvat 2h vor dem BSA-AGE zugegeben. Katalase wurde nicht vorinkubiert.

### 7.4.3. Normalisierung der Laktatausschüttung

Durch Antioxidantien wird die Ausschüttung von Laktat normalisiert. Während nach 1-stündiger Vorinkubation von SH-SY5Y Zellen mit 100µM (R+)  $\alpha$ -Liponsäure die Laktatausschüttung BSA-AGE-behandelter Zellen in etwa der der Kontrolle entspricht, führt 10µM 17 $\beta$ -Estradiol (1h vor AGE-Gabe) nicht zu einer völligen Normalisierung der Laktatwerte, jedoch zu einer Abnahme der ausgeschütteten Menge Laktat pro Zelle um etwa 50%. Auch Pyruvat führt zu einer Senkung der Laktatausschüttung. Die Substanzen allein beeinflussen die Laktatausschüttung nicht.

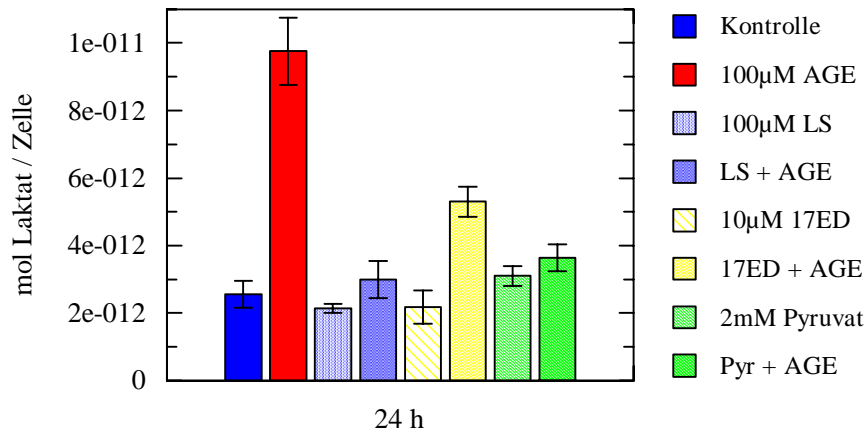


Abb.53: Normalisierung der Laktatausschüttung BSA-AGE gestresster SH-SY5Y Zellen durch Antioxidantien und Pyruvat.  $\alpha$ -Liponsäure und  $17\beta$ -Estradiol wurden 1h, Pyruvat 2h vor dem BSA-AGE zugegeben.

## 8. Überblick über die untersuchten Stoffwechselfparameter

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass AGEs dosisabhängig sowohl zu Veränderungen im Metabolismus als auch im Redoxstatus von SH-SY5Y Zellen führen.

Eine 24-stündige Inkubation mit  $50\mu\text{M}$  BSA-AGE führt in SH-SY5Y Zellen nicht zu signifikanten Veränderungen im Energiehaushalt der Zellen und nur zu geringen Verschiebungen im Redoxstatus. Bereits die Verdopplung der AGE-Menge auf  $100\mu\text{M}$  führt zu deutlichen Veränderungen sowohl des Energiespiegels der Zellen (s. MTT und ATP-Assays) als auch des Redoxhaushalts (s. TBARS und GSH-Spiegel). Mit  $150\mu\text{M}$  BSA-AGE verstärken sich ATP-Depletion und Einschränkungen in der mitochondrialer Respiration, die Laktatausschüttung ist gegenüber Zellen, die mit  $100\mu\text{M}$  AGE behandelt wurden, jedoch geringer.

Der durch AGEs in den verwendeten Konzentrationen ausgelöste Zelltod verläuft offenbar nekrotisch, obwohl es durch BSA-AGEs zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytoplasma kommt, ist die Aktivierung von Caspasen bei keiner der verwendeten AGE-Konzentrationen nachzuweisen.

In der nachfolgenden Tabelle sind diese Ergebnisse für  $t=24$  h nochmals zusammengefasst. Die Prozentzahlen für Glukoseaufnahme, Laktatausschüttung und TBARS-Bildung beziehen sich auf die Steigerung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Es ist zu beachten, dass die Steigerung der Glukoseaufnahme ausschliesslich in den ersten 6h des AGE-Stress erfolgt, danach ist die Glukoseaufnahme im Vergleich zur Kontrolle quasi null. Die Steigerung der Laktatausschüttung erfolgt zwischen  $t=6$  h und  $t=24$ h. (Tab. 5).

In Abb. 54 wurden die Ergebnisse aus dem MTT-Assay, der ATP-Bestimmung und den Glukose- und Laktatmessungen gegenübergestellt, um den Zusammenhang zwischen der AGE-Konzentration und den metabolischen Veränderungen zu verdeutlichen.

Tab. 5:

	vitale Zellen MTT %	ATP %	Glukoseaufnahme % - Zunahme	Laktatausschüttung % - Zunahme	TBARS-Bildung % - Zunahme	GSH %	Nachweis von Cyt c im Zytosol	Spaltung von PARP
50µM AGE	94 +- 6,5	83 +- 15	4,5 +- 14	51 +- 15	100 +- 40	98 +- 1,5	ja	nein
100mM AGE	77 +- 8	60 +- 17	82 +- 12	350 +- 12	250 +- 20	92,5 +- 4	ja	nein
150µM AGE	60 +- 10	40 +- 16	92 +- 13	204 +- 18	200 +- 45	92 +- 5	ja	nein

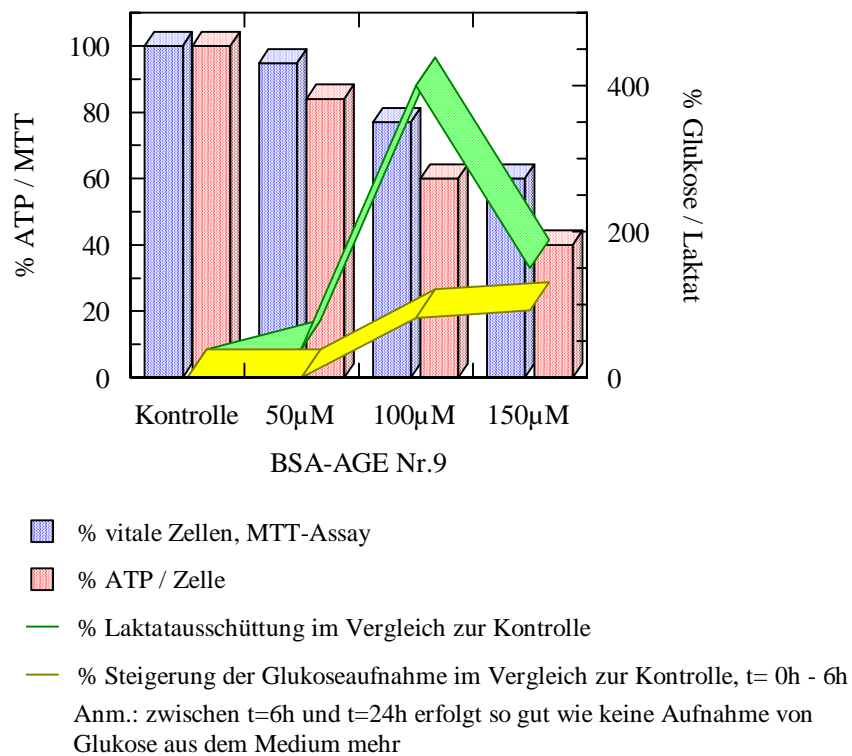


Abb. 54: Veränderungen verschiedener Stoffwechselfparameter von SH-SY5Y Zellen in Abhängigkeit von der eingesetzten BSA-AGE Konzentration.