

**Der Einfluss von „Advanced Glycation Endproduct“ - reichen
Nahrungsmittlextrakten auf die Funktion kardialer Fibroblasten**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer.nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Diplom-Biochemikerin Stefanie Ruhs

geb. am: 29.05.1980 in: Halle/Saale

Gutachter /in:

1. Prof. Dr. Sven-Erik Behrens
2. HD Dr. Andreas Simm
3. Prof. Dr. Monika Pischetsrieder

Halle (Saale), Juli 2008

Verteidigungsdatum: 02.04.2009

| | |
|--|--------------|
| Inhaltsverzeichnis | I-III |
| Abkürzungsverzeichnis | IV-VI |
| 1 Einleitung | 1-9 |
| 1.1 Beteiligung von Fibroblasten am myokardialen Aufbau und einer fibrotischen Entwicklung | 1 |
| 1.1.1 <i>Aufbau des Myokards</i> | 1 |
| 1.1.2 <i>Die kardiale Fibrose und kardiale Dysfunktionen</i> | 2 |
| 1.2 <i>Advanced glycation endproducts (AGEs): Bildungswege und deren pathophysiologische Bedeutung</i> | 3 |
| 1.3 Signaltransduktionsmechanismen der AGEs | 7 |
| 1.4 Exogene AGEs:Nahrungsmittel-AGEs/MRPs (Maillard Reaktionsprodukte) | 7 |
| 1.4.1 <i>Entstehung von Nahrungsmittel-AGEs</i> | 7 |
| 1.4.2 <i>Charakteristische MRP-Strukturen in Nahrungsmitteln</i> | 8 |
| 1.4.3 <i>Absorption, Biotransformation, Metabolismus und Eliminierung von Nahrungsmittel-AGEs</i> | 8 |
| 1.5 Zielsetzung der Arbeit | 9 |
| 2 Material | 10-13 |
| 2.1 Chemikalien | 10 |
| 2.2 verwendete Zelllinien und Mäuse | 12 |
| 2.3 Materialien | 12 |
| 2.4 Geräte | 13 |
| 2.5 Auswerte-Software | 13 |
| 3 Methoden | 14-33 |
| 3.1 Herstellung der Nahrungsmittlextrakte | 14 |
| 3.1.1 <i>Herstellung des Kaffeeextraktes (KE)</i> | 14 |
| 3.1.2 <i>Herstellung des Brotkrustenextraktes (BKE)</i> | 14 |
| 3.1.3 <i>Pronyl-L-Lysin-BSA Herstellung</i> | 14 |
| 3.2 Zellkulturtechniken | 15 |
| 3.2.1 <i>Generierung und Kultivierung von zwei murinen kardialen Fibroblastenzelllinien</i> | 15 |
| 3.2.1.1 <i>Mykoplasmentest</i> | 15 |
| 3.2.1.2 <i>Kultivierung und Passagieren der Zelllinien</i> | 16 |
| 3.2.1.3 <i>Einfrieren und Auftauen von Zellen</i> | 17 |
| 3.2.2 <i>Isolierung und Kultivierung von adulten Rattenkardiomyozyten</i> | 17 |
| 3.3 Gewinnung von Probenmaterial aus BKE-Fütterungsstudien an Nacktmäusen | 18 |
| 3.4 Analyse der AGE-Fluoreszenz von Protein- und Plasmaproben | 18 |
| 3.5 Vitalitätstests | 18 |
| 3.5.1 <i>Propidiumjodid (PI) Färbung - Zelltodanalyse (Nekrose)</i> | 18 |
| 3.5.2 <i>Zelltodnachweis durch Bestimmung der LDH-Aktivität im Zellüberstand</i> | 18 |
| 3.5.3 <i>Alamar Blue Assay: Nachweis der Zellproliferation und des reduktiven Zellpotentials</i> | 19 |

| | | |
|----------|---|--------------|
| 3.6 | Wachstumskinetiken, Verdopplungszeiten und Zellzyklus-Analysen | 19 |
| 3.7 | Analyse der intrazellulären ROS-Produktion | 20 |
| 3.8 | Analyse der Proteinoxidation zur Bestimmung des intrazellulären oxidativen Status | 20 |
| 3.9 | RNA-Analytik | 21 |
| 3.9.1 | <i>RNA-Isolation aus Zellen</i> | 21 |
| 3.9.2 | <i>RNA-Isolation aus Gewebe</i> | 21 |
| 3.9.3 | <i>Bestimmung der RNA-Konzentration, Reinheit und Qualität</i> | 21 |
| 3.9.4 | <i>Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)</i> | 22 |
| 3.9.4.1 | <i>Reverse Transkription (RT)</i> | 22 |
| 3.9.4.2 | <i>Polymerasekettenreaktion (PCR)</i> | 22 |
| 3.9.4.3 | <i>Primerdesign</i> | 22 |
| 3.9.4.4 | <i>Gelelektrophorese</i> | 23 |
| 3.10 | DNA-Microarray Analyse | 23 |
| 3.11 | Protein-Analytik | 24 |
| 3.11.1 | <i>Herstellung von Proteinlysaten aus Geweben</i> | 24 |
| 3.11.2 | <i>Herstellung von Proteinlysaten aus Zellen</i> | 24 |
| 3.11.3 | <i>Proteinbestimmung</i> | 25 |
| 3.12 | Western-Blot Analyse | 25 |
| 3.12.1 | <i>Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)</i> | 25 |
| 3.12.2 | <i>Elektrophoretischer Proteintransfer auf eine Nitrocellulose oder PVDF-Membran</i> | 25 |
| 3.12.3 | <i>Proteingelfärbung mittels Coomassie-Blau</i> | 26 |
| 3.13 | Dot-Blot Analyse | 26 |
| 3.14 | Analyse der MMP-Aktivität durch Zymographie | 27 |
| 3.15 | Präkonditionierungsexperimente | 27 |
| 3.16 | Bestimmung der Transkriptionsfaktor-Aktivität durch den dualen Luciferase-Reporterassay | 28 |
| 3.16.1 | <i>Herstellung und Transformation kompetenter Zellen</i> | 28 |
| 3.16.2 | <i>Überprüfung und Isolation von Plasmid DNA</i> | 29 |
| 3.16.3 | <i>Isolation von Plasmid DNA mittels Maxi-Präparation</i> | 29 |
| 3.16.4 | <i>Transfektion der kardialen Fibroblastenzelllinien</i> | 30 |
| 3.16.5 | <i>Dualer Luciferase-Reporterassay</i> | 30 |
| 3.17 | Analyse des Glutathion-Gehalts der Zellen mittels Elektronenspinresonanz (ESR) | 31 |
| 3.18 | Nachweis der seneszent assoziierten β -Galaktosidase (SA- β Gal) | 33 |
| 3.19 | statistische Auswertung | 33 |
| 4 | Ergebnisse | 34-83 |
| 4.1 | Etablierung und Charakterisierung von zwei kardialen Fibroblastenzelllinien | 34 |
| 4.1.1 | <i>Herstellung der murinen kardialen WT- und RAGE KO Zelllinien</i> | 34 |
| 4.1.2 | <i>Nachweis der Prolyl-4 Hydroxylase (P4H) als Fibroblastenmarker</i> | 36 |
| 4.1.3 | <i>Charakterisierung der etablierten Zelllinien</i> | 36 |
| 4.1.4 | <i>Vergleich der WT- und RAGE KO Zelllinien durch cDNA-Microarray Analyse</i> | 37 |

| | | |
|----------|--|----------------|
| 4.2 | Analyse des Einflusses der Nahrungsmittel-AGE Extrakte auf kardiale Fibroblasten | 40 |
| 4.2.1 | <i>Analyse der in den Nahrungsmittlextrakten enthaltenen AGE-Modifikationen</i> | 40 |
| 4.2.2 | <i>Analyse des Einflusses der Nahrungsmittel-AGE Extrakte auf die zelluläre Proliferation und Vitalität</i> | 41 |
| 4.2.3 | <i>Analyse des Einflusses der Nahrungsmittel-AGE Extrakte auf intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismen</i> | 46 |
| 4.2.4 | <i>Analyse des Einflusses des Brotkrustenextraktes auf transkriptionelle Expressionsveränderungen mittels cDNA-Microarray Analyse</i> | 55 |
| 4.2.5 | <i>Einfluss der Nahrungsmittlextrakte auf die mögliche Entwicklung einer kardialen Fibrose und zelluläre, morphologische Veränderungen</i> | 59 |
| 4.2.6 | <i>Analyse des Einflusses der AGE-reichen Brotkrustenextraktfraktionen auf die vermehrte mRNA Expression pro-/antioxidativer Gene</i> | 63 |
| 4.2.6.1 | <i>Analyse des Einflusses von Inhibitoren auf die Wirkung des Brotkrustenextraktes</i> | 71 |
| 4.2.7 | <i>Analyse einer niedermolekularen Brotkrustenextrakt-Fraktion (≤ 10 kDa) und von Pronyl-L-Lysin modifiziertem BSA auf pro-/antioxidative Gene sowie den Präkonditionierungseffekt</i> | 76 |
| 4.2.7.1 | <i>Analyse der ≤ 10 kDa Fraktion des löslichen Brotkrustenextraktes</i> | 76 |
| 4.2.7.2 | <i>Analyse von Pronyl-L-Lysin modifizierten BSA (PL-BSA)</i> | 79 |
| 4.2.8. | <i>Analyse des Einflusses der BKE-Fütterung bei Mäusen</i> | 81 |
| 5 | Diskussion | 84-107 |
| 5.1 | Charakterisierung der etablierten RAGE exprimierenden WT- sowie RAGE KO Fibroblastenzelllinien | 84 |
| 5.2 | Das Brotkrusten- und Kaffeeextrakt stellen AGE-reiche Nahrungsmittlextrakte dar | 87 |
| 5.3 | Einfluss der AGE-reichen Nahrungsmittlextrakte auf zelluläre Funktionen | 89 |
| 5.3.1 | Analyse der Wirkung des BKE auf die Funktion der kardialen Fibroblasten | 90 |
| 5.3.2 | Analyse der Wirkung des KE auf die Funktion der kardialen Fibroblasten | 101 |
| 5.3.3 | Vergleich der zellulären Wirkung des KE versus des BKE | 107 |
| | | 108-109 |
| 6 | Zusammenfassung | 110-122 |
| 7 | Literatur | 123 |
| 8 | Anhang | |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------------|--|
| °C | Grad Celsius |
| Abb. | Abbildung |
| AGEs | engl. advanced glycation endproduct; Glykierungsendprodukte |
| AGE-R1 | Oligosaccaryltransferase - OST48; AGE-Rezeptor 1 |
| AGE-R2 | 80K-H Protein, intrazelluläres Substrat der Proteinkinase C; AGE-Rezeptor 2 |
| AGE-R3 | Galectin-3; AGE-Rezeptor 3 |
| Akt | Serin/Threonin Proteinkinase B |
| ALEs | engl. advanced lipoxidation endproduct |
| ALT-711 | 4,5-Dimethyl-3 Phenacylthiazolchlorid |
| AP-1 | Aktivator Protein 1 |
| APS | Ammoniumsulfat |
| Arg-Pyr | Arginin-Pyrimidin |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BCA | Bichinonsäure Lösung |
| BKE | Brotkrustenextrakt (Gesamtfraktion) |
| BL | Brotkrustenextrakt (lösliche Fraktion) |
| bp | Basenpaare |
| BSA | engl. Bovine serum albumin; Rinderserumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| CD36 | Fettsäuretranslokase |
| cDNA | engl. complementary DNA, komplementäre DNA |
| CML | N ϵ -carboymethyllysin |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| CPD | engl. cumulative population doubling; kumulative Populationsverdopplung |
| d | Tag |
| DCF | 2',7'-Dichlorofluorescin |
| H ₂ DCFH-DA | 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat |
| 3-DG | 3-Deoxyglucoson |
| DMEM | engl. Dulbecco's modified eagle medium; Zellkulturmedium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonucleinsäure |
| DNPH | 2,4-Dinitrophenylhydrazin |
| DNP-Hydrazon | 2,4-Dinitrophenylhydrazon |
| ds | doppelsträngig |
| dNTPd | Mix aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGFP | engl. enhanced green fluorescent protein |
| EGTA | Ethylenglykoltetraessigsäure |
| ERK1/2 ^{MAPK} | extrazellulär regulierende Kinase |
| ESR | Elektronenspinresonanz |
| EZM | extrazelluläre Matrix |
| EZR | extrazellulärer Raum |
| FACS | engl. <i>Fluorescence activated cell sorting</i> ; Durchflusszytometrie |
| FKS | fetales Kälberserum |
| GAPDH | Glycerin Aldehyd Phosphatdehydrogenase |
| Ga-Pyr | 3-Hydroxy-4hydroxymethyl-1-(5-amino-5-carboxypentyl) pyridinium |
| GSH | Glutathion |
| GST | Glutathion-S-Transferase |
| HBSS | Hank's Balanced Salt Solution |
| HNE | 4-Hydroxy-2 nonenal |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| kDa | Kilodalton |
| KE | Kaffeextrakt |

| | |
|-----------------------------|---|
| KFs | kardiale Fibroblasten |
| KS | Kälberserum |
| LDH | Lactat-Dehydrogenase |
| LiCl | Lithiumchlorid |
| LV | linker Ventikel des Herzens |
| M199 | Medium 199 |
| MAPK | Mitogen aktivierte Proteinkinase |
| MDA | Malonyldialdehyd |
| MgCl | Magnesiumchlorid |
| min | Minuten |
| ml | Milliliter |
| MMPs | Matrixmetalloproteinasen |
| MRPs | Maillardreaktionsprodukte |
| MW | Mittelwert |
| NAC | N-Acetylcystein |
| NF- κ B | Nuklearer Faktor kappa B |
| NIH3T3 | murine embryonale Fibroblastenzelllinie |
| nm | Nanometer |
| O ₂ | Sauerstoff |
| O ₂ ⁻ | Superoxidanion |
| OD | optische Dichte |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| p38 ^{MAPK} | mitogen aktivierte Proteinkinase p38 |
| PBS | engl. Phosphate buffered saline; Phosphat gepufferte Salzlösung |
| PCR | engl. Polymerase chain reaction; Polymerasekettenreaktion |
| PDT | engl. population doubling time; Verdopplungszeit |
| P-ERK1/2 ^{MAPK} | phosphorylierte ERK1/2 ^{MAPK} |
| P4H | Proyl-4 Hydroxylase |
| PI | Propidiumjodid |
| Pronyl-L-Lysin (PL) | (2,4-Dihydroxy-2,5-dimethyl-1-(5-acetamino-5-methoxycarbonyl-pentyl)-3-oxo-2H-pyrrol) |
| PL-BSA | Pronyl-L-Lysin modifiziertes BSA |
| P-p38 ^{MAPK} | phosphoryliertes p38 ^{MAPK} |
| PVDF | Polyvinylfluorid |
| RAGE | engl. receptor for advanced glycation endproducts |
| RAGE KO | RAGE knock out |
| rel. FE | relative Fluoreszenzeinheiten |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| ROS | reaktive Sauerstoffspezien |
| RT-PCR | reverse Transkription Polymerasekettenreaktion |
| SA- β Gal | seneszenz assoziierte β Galaktosidase |
| SD | engl. standard deviation; Standardabweichung |
| SDS | engl. Sodium dodecylsulfat, Natriumdodecylsulfat |
| SEM | engl. Standard error mean, Standardfehler |
| SRB1 | engl. scavenger receptor B1 |
| Std. | Stunde |
| T | Temperatur |
| T _A | annealing Temperatur |
| TGF- β | engl. transforming growth factor β |
| TIMPs | engl. tissue inhibitor of metalloproteinases; Inhibitoren der MMPs |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| U | engl. units |
| UDP-GT | UDP-Glucuronyltransferase |
| vs. | versus |
| v/v | engl. Volume per volume; Volumen pro Volumen |
| w/v | engl. weight per volume; Gewicht pro Volumen |

| | |
|-------|---|
| WF | Wachstumsfaktor |
| WT | Wildtyp |
| X-Gal | 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid |
| u.a. | unter anderem |
| z.B. | zum Beispiel |

1 Einleitung

1.1 Beteiligung von Fibroblasten am myokardialen Aufbau und einer fibrotischen Entwicklung

Eine der häufigsten Todesursachen in den westlichen Industrienationen stellen kardiovaskuläre Erkrankungen, besonders bei älteren Personen, dar (1, 2). Hinter diesen Erkrankungen verbergen sich komplexe klinische Syndrome, die in linksventrikuläre Dysfunktion, Belastungsintoleranz, Flüssigkeitsretention und verkürzter Lebensdauer resultieren. Neue Untersuchungen zeigen, dass die befindlichen kardialen Fibroblasten (KF) und die extrazelluläre Matrix (EZM) in diese Erkrankungsprozesse involviert sind.

1.1.1 Aufbau des Myokards

Das Myokard besteht aus Herzmuskelzellen - den Kardiomyozyten - sowie nicht-myozytären Zellen wie den Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Immunzellen und kardialen Fibroblasten, wobei die KF quantitativ mit $\frac{2}{3}$ den Hauptzelltyp des Myokards repräsentieren (3, 4, 5). Wird hingegen die volumenmäßige Verteilung der Zellen des Myokards betrachtet, nehmen die Kardiomyozyten einen Volumenanteil von 65-80 % ein (6). Der verbleibende Anteil wird als kardiales Interstitium bezeichnet und beinhaltet neben den nicht-myozytären Zellen des Myokards Blut- und Lymphgefäße, adrenerge Nervenendigungen sowie verschiedene extrazelluläre Matrixproteine.

Die Hauptfunktion der KFs ist die Aufrechterhaltung der Homöostase der EZM durch die Produktion von zahlreichen extrazellulären Matrixproteinen. Das komplexe EZM-Netzwerk besteht aus einer gelartigen Grundsubstanz aus Glykoproteinen und Glykosaminoglykanen sowie aus den Adhäsionsproteinen (Fibronektin, Laminen) und den hauptsächlich vorkommenden Strukturproteinen - den Kollagenen (7, 8). Der Gesamtkollagengehalt des Myokards wird neben Kollagen 4, 6 (Basalmembran) und Kollagen 5 hauptsächlich von dem Kollagen des Typs 1 (80 % des gesamten Kollagens im Myokard) und Typs 3 (10 % des gesamten Kollagens im Myokard) bestimmt (9, 10). Beide Kollagentypen unterscheiden sich in ihren physikalischen Eigenschaften. Kollagen des Typs 1 bildet hauptsächlich dicke parallel angeordnete Fibrillen aus, wodurch eine hohe Steifigkeit des Myokards erreicht wird, die einer starken mechanischen Beanspruchung standhalten kann. Das Kollagen des Typs 3 bildet ein feines fibrilläres Netzwerk aus, das die elastische Komponente in das Myokard einbringt. Die Kollagene werden von myokardialen Fibroblasten als Prokollagene mit N- sowie C-terminalen Signalpeptiden synthetisiert (11), im endoplasmatischen Retikulum durch die Prolyl-4 Hydroxylase (P4H) an den Prolinresten modifiziert und als Prokollagen-Tripelhelix in den EZR sezerniert. Dort werden die Signalpeptide durch Prokollagen-Peptidasen abgespalten, die Prokollagene zu Tropokollagen zusammengelagert und durch Quervernetzungen zu reifen Kollagenfasern stabilisiert (6, 12). Letztlich ermöglicht die 3D-Struktur der extrazellulären Kollagenmatrix eine typische Strukturierung des Myokards in drei Komponenten: das Epimysium, das Perimysium und das Endomysium (Abb. 1.1), welche Kardiomyozyten bzw. Kardiomyozytengruppen unterschiedlicher Größe gruppieren und orientieren (13).

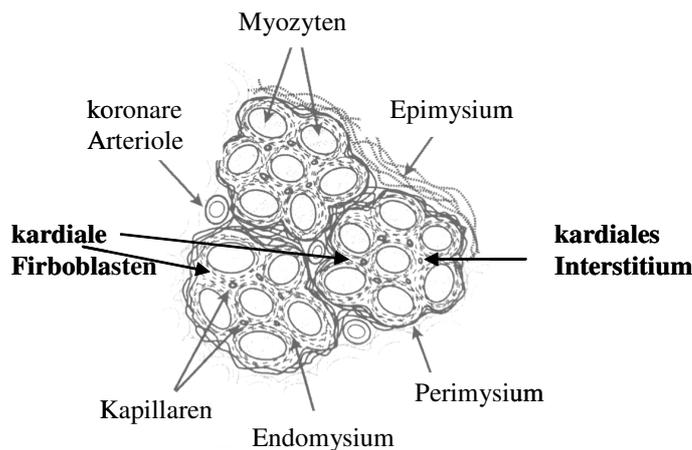


Abb.: 1.1 Strukturelle Organisation der kardialen EZM. Darstellung des fibrillären Kollagens in Relation zu den Kardiomyozyten, den kardialen Fibroblasten und den koronaren Gefäßen. Kollagenfasern umgeben die einzelnen Kardiomyozyten innerhalb des Endomysiums. Gruppen von Kardiomyozyten werden durch Kollagenfasern im Perimysium gebündelt. Das Epimysium enthält Gruppen von perimysialen Bündeln. Die in hoher Zellzahl vorkommenden kardialen Fibroblasten befinden sich innerhalb des Kollagennetzwerkes, wobei sie im Vergleich zu den Kardiomyozyten den deutlich kleineren Zelltyp repräsentieren. Modifiziert nach Brown *et al.*, 2005 (1).

Somit ermöglichen die epi-, peri- und endomysialen Komponenten des fibrillären Kollagenetzwerkes eine Verbindung der Kardiomyozyten sowie Blut- und lymphatischen Gefäße zueinander. Andererseits gestatten diese Strukturen die Übertragung der durch die Kardiomyozyten generierten Kraft auf die Ventrikel des Herzens. Dabei wird eine Überdehnung der Kardiomyozyten verhindert bzw. durch die hohe Zugfestigkeit des Kollagens myokardiale Rissen vorgebeugt, aber parallel die Basis für die notwendige diastolische myokardiale Steife erbracht (6, 14).

Neben der Produktion von extrazellulären Matrixproteinen sind die KFs zur Synthese von EZM abbauenden Enzymen, den Matrixmetalloproteinasen (MMPs), den Inhibitoren der MMPs den *tissue inhibitors of matrixmetalloproteinases* (TIMPs) und von bioaktiven Signalmolekülen wie Wachstumsfaktoren und Zytokine befähigt. Ursache hierfür ist, dass die EZM des gesunden Herzens nicht inert ist, sondern einem kontinuierlichen Umbau unterliegt. Nur so kann eine optimale Umgebung für die funktionelle und strukturelle Integrität der Kardiomyozyten geschaffen werden. Letztlich stellt das feinmaschige Gerüst der EZM sicher, dass die Kontraktionskraft der Kardiomyozyten in ventrikuläre Pumpleistung umgewandelt werden kann (15, 16).

1.1.2 Die kardiale Fibrose und kardiale Dysfunktionen

In den letzten Jahren zeigte sich, dass die im Alter auftretenden Veränderungen des kardialen Interstitiums für die Entwicklung und das Voranschreiten von Myokarddysfunktionen von Bedeutung sind. Dabei ist die kardiale Fibrose zu meist als eine Folge anderer mit myokardialen Dysfunktionen assoziierten Erkrankungen wie z.B. Myokardinfarkten, verschiedenen Kardiomyopathien, Hypertonien, koronare Herzerkrankungen (Atherosklerose) und Diabetes Mellitus zu betrachten (17). Die kardiale Fibrose wird durch eine dysregulierte Homöostase, zumeist durch eine Verschiebung des dynamischen Gleichgewichts zwischen Kollagenauf- und -

abbau, hervorgerufen. Als Folge kommt es zu einer verstärkten Ablagerung des fibrillären Kollagens innerhalb des Interstitiums. Diese Veränderungen des Kollagengehaltes der EZM wird als myokardiales *Remodelling* bezeichnet (7, 9).

Hierbei unterscheidet man einerseits die reparative und andererseits die reaktive Fibrose (18). Bei dem Auftreten von Myokardinfarkten oder Kardiomyopathien kann es zum Absterben der Kardiomyozyten kommen. Durch die Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie z.B. den *transforming growth factor* (TGF- β), Angiotensin II oder Endothelin werden die KFs aktiviert und können in das apoptotische und/oder nekrotische Gewebe einwandern. Dort induzieren sie eine vermehrte Bildung von fibrillären Kollagen - dem Narbengewebe - um entstandene Lücken zu schließen (reparative Fibrose) (1). Problematisch wird die kardiale Fibrose, wenn sie gesundes myokardiales Gewebe erfasst wie dies bei der reaktiven Fibrose gegeben ist und es dort zu einer Akkumulation von fibrillären Kollagen kommt. Die reaktive Fibrose induziert durch die vermehrte Bildung und Ablagerung von EZM Proteinen (speziell des Kollagens Typs 1 und des Typs 3) sowie die vermehrte Proliferation von Fibroblasten und die Einwanderung inflammatorischer Zellen eine Vergrößerung der EZM (19). Dies führt letztlich zu funktionellen Veränderungen der EZM, wodurch die Versorgung der Kardiomyozyten mit Sauerstoff (O₂) und Nährstoffen erschwert und degenerative Veränderungen dieses Zelltyps induziert werden, womit sich die Anzahl an funktionellen Kardiomyozyten vermindert (19). Des Weiteren erhöht sich die passive Steifigkeit des Myokards, wobei die diastolische Füllung des Herzens sinkt und es zur Ausbildung einer diastolischen Dysfunktion und einer verminderten Herzleistung kommen kann (20). Neben der quantitativen Zunahme des Kollagens scheinen aber auch dessen qualitative Veränderungen - wie Quervernetzungen - für die pathophysiologische Wirkung verantwortlich zu sein (21).

1.2 *Advanced Glycation Endproducts* (AGEs): Bildungswege und pathophysiologische Bedeutung

Die mit den pathophysiologischen Erkrankungen (myokardiale Dysfunktion) assoziierten Quervernetzungen von Kollagenen werden u.a. durch die heterogene Gruppe der AGEs verursacht. Diese entstehen bei einer nicht-enzymatischen und letztlich irreversiblen Glykierungsreaktion zwischen reduzierenden Carbonylverbindungen (reduzierende Zucker, α -Dicarbonyle) mit den reaktiven Aminogruppen von Nukleophilen (Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren). Erstmalig entdeckt und beschrieben wurde diese Reaktion 1912 von Louis Camille Maillard bei der Reaktion von Glucose mit Glycin, wodurch diese auch als Maillard-Reaktion bezeichnet wird (22).

Im folgenden Abschnitt soll bei der Beschreibung der nicht-enzymatischen Glykierungs-/Maillard-Reaktion insbesondere auf die Modifikation von Proteinen mit reduzierenden Zuckern eingegangen werden. Diese Reaktion lässt sich in drei aufeinander folgende Reaktionsphasen: die frühe-, fortgeschrittene und späte Phase (Abb. 1.2) unterteilen (2).

In der frühen Phase addiert sich reversibel die Carbonylgruppe des reduzierenden Zuckers an die reaktive Aminogruppe eines Proteins. Nach Abspaltung eines Wassermoleküls entsteht das Schiff'sche Baseprodukt (Aldimin, Ketimin). Dieser Schritt vollzieht sich sehr schnell und ist reversibel, da die Schiff'sche Baseprodukte leicht in die Ausgangsstoffe zerfallen können (24-26). Über Keto-Enol-Tautomerien entstehen deutlich langsamer die stabileren Amadori-

(Aminoketosen) bzw. Heyns-Produkte (Aminoaldosen), die an Proteine akkumulieren können. Ein bekanntes akkumulierendes Amadori-Produkt, das Hämoglobin Ac1, welches zur Diabetes-Diagnostik eingesetzt wird, entsteht bei Hyperglykämie als Addukt der Glucose an eine N-terminale Aminogruppe eines Valins der β -Kette des Hämoglobins (27, 28).

In der fortgeschrittenen Reaktionsphase können die Amadori- bzw. Heyns-Produkte nicht enzymatisch durch Keto-Enol-Tautomerien (Enolisierung) oder β -vinyloge Eliminierungs-, Oxidations- und Retro-Aldolkondensationsreaktionen in verschiedene reaktive dicarbonyle Zwischenprodukte (1-/3-Desoxyglucosone, 1,4-Didesoxyglucosone, Methylglyoxal, Hydroxybutan-2,3-dion und Diacetal) umgewandelt werden (23, 29, 30). Bei diesen Prozessen entstehen zusätzlich reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (31). Schiff'sche Baseprodukte und 1,2-Enaminol-Strukturen, die in der frühen Reaktionsphase nicht zum Amadori-Produkt weiter reagierten bzw. wieder zurückgebildet wurden, können reaktive Zwischenprodukte wie Glycolaldehyd, Glyoxal oder Glucosone bilden. Bei diesem so genannten Namiki-Reaktionsweg werden aus den Schiff'sche Baseprodukten durch aminkatalysierte Retro-Aldolkondensation Glycolaldehyd und durch folgende Oxidationsreaktion und hydrolytische Spaltungen Glyoxal gebildet (32-34). Hinzu kommt, dass weitere α -Dicarbonyle als Nebenprodukte des Stoffwechsels z.B. in der Glykolyse entstehen, wobei Glyceraldehyd-3-Phosphat nicht-enzymatisch zu Methylglyoxal abgebaut wird (35). Außerdem wird durch die Autoxidation von Monosacchariden, auch bekannt als Wolffs-Reaktionsweg (36), α -Oxoaldehyde (z.B. Glyoxal), ROS und Arabinose gebildet (37, 38).

In der späten Phase der nicht-enzymatischen Glykierungsreaktion können die gebildeten α -Dicarbonyle und Amadori-Produkte mit reaktiven Aminogruppen von Proteinen/Lipiden reagieren. Die dabei entstehenden irreversiblen AGE-Strukturen tragen zur Quervernetzung von Proteinen bei (24, 39). Die hierfür verantwortlichen Reaktionsmechanismen sind komplex und umfassen u.a. Aldolkonsensations- und Polymerisationsreaktionen, wobei die in der frühen und fortgeschrittenen Reaktionsphase gebildeten ROS diesen Abschnitt begünstigen (40, 41). In Abb. 1.2 wurde der AGE-Bildungsweg schematisch dargestellt.

Das Maß der nicht-enzymatischen Glykierungsreaktion wird durch die reduzierende Carbonyl- und ROS-Konzentrationen, die „Expositionszeit/Reaktionszeit“ sowie die „turnover“ Rate der Zielproteine bestimmt (42).

Typische pathophysiologische Effekte der AGEs sind:

- eine vermehrte rezeptorunabhängige ROS-Produktion
- eine veränderte Proteinkonformation, mit beeinträchtigter Enzymfunktionalität
- Proteinquervernetzungen
- eine reduzierte proteosomale Proteindegradation, wodurch die Proteinhalbwertszeit und die AGE-Akkumulation im Organismus erhöht wird (43).

Letztlich kann dies im Myokard zu einer vermehrten Kollagenablagerungen und Quervernetzungen führen, die in einer erhöhten Herzwandversteifung und verminderten Funktionalität resultiert. Besonders ausgeprägt ist diese vermehrte AGE-Kollagenmodifikation bei Diabetikern, die über einen zu hohen Blutzuckerspiegel verfügen. Durch die beträchtliche Halbwertszeit von 120 Tagen werden die Kollagene jenen hohen extrazellulären Glucosekonzentrationen lang ausgesetzt,

wodurch die Wahrscheinlichkeit einer AGE-Modifikation steigt (21). Diese modifizierten Kollagene sind gegenüber dem Abbau durch MMPs wesentlich resistenter, weshalb sie sich in der EZM anreichern und eine Versteifung der EZM erzielen und Minderung der Leistungsfähigkeit des Herzens bewirken (17, 44, 45). Die pathophysiologische Relevanz der endogen gebildeten AGEs wurde durch den Einsatz des AGE-Inhibitors Aminoguanidin (nukleophile Hydrazinverbindung) und des AGE *Cross-Link-Breakers* ALT-711 (4,5-Dimethylthiazolium-Derivat) verdeutlicht. Durch ihren Einsatz in Tierstudien wurden Alters- und diabetesinduzierte Herzwandversteifungen minimiert, die „Compliance“ des Herzens erhöht und die Kollagenablagerungen verringert (46, 47).

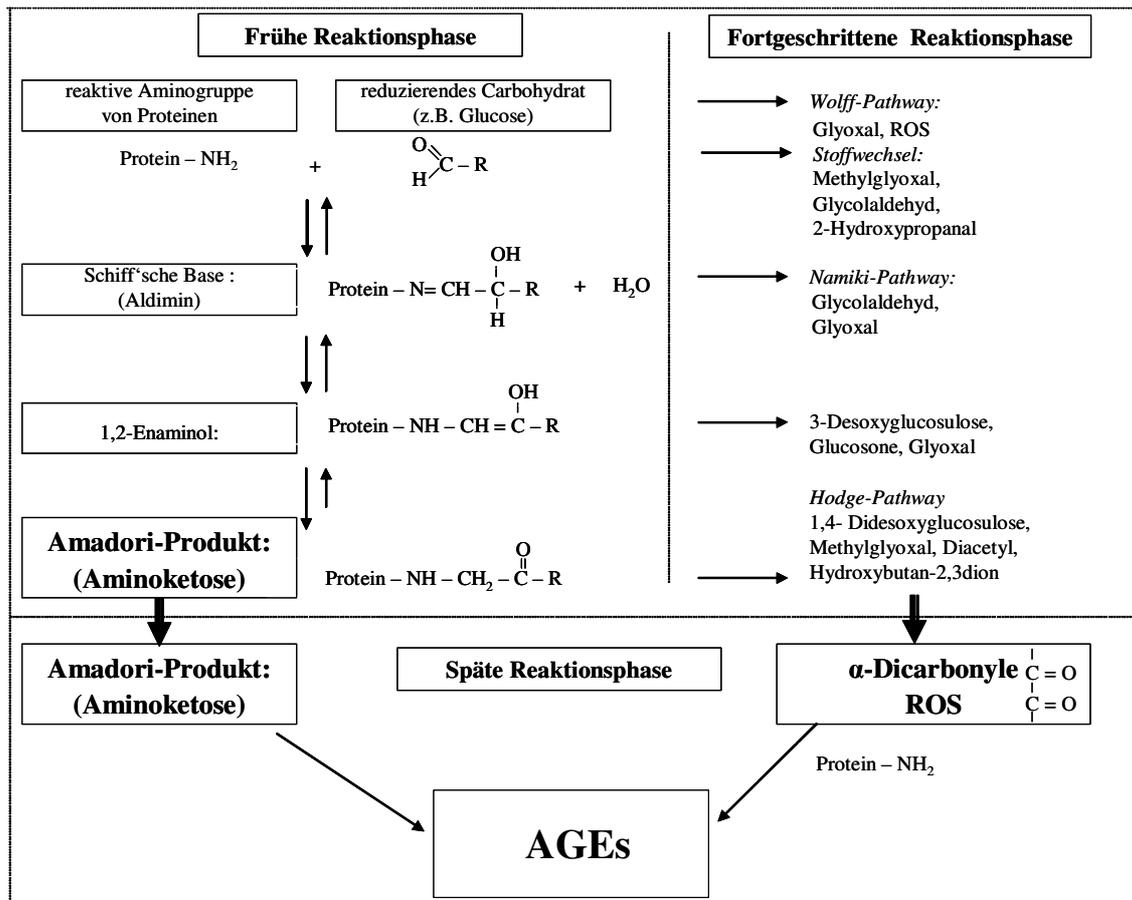


Abb. 1.2: Darstellung der Bildung von *advanced glycation endproducts* durch die nicht-enzymatische Glykierungs-/Maillard-Reaktion. Reduzierende Zucker bilden mit den reaktiven Aminogruppen von Makromolekülen (z.B. Proteinen) reversible Schiff'sche Base-Produkte. Intramolekulare Umlagerungen führen zur Bildung des stabileren Amadori-Produkts. In der fortschreitenden Reaktionsphase können aus den verschiedenen Zwischenprodukten reaktive Dicarbonylverbindungen sowie reaktive Sauerstoffspezies gebildet werden. Durch weitergehende Umlagerungs-, Oxidations- und Eliminierungsreaktionen können in der späten Reaktionsphase aus den Amadori-Produkten AGEs gebildet werden. Des Weiteren reagieren reaktive Dicarbonylverbindungen mit reaktiven Aminogruppen von Proteinen in anschließenden komplexen Reaktionsfolgen zu AGEs, die zur Quervernetzungen von Proteinen beitragen können. Modifiziert nach Khalifa et al. (23).

Eine Auswahl der möglichen *in vivo* wie auch *ex vivo* (z.B. in Nahrungsmitteln) entstehenden AGE/MRP-Produkte sind in Tabelle 1.1 aufgeführt, wobei diese in fluoreszierende- und nicht-fluoreszierende AGE-Verbindungen unterteilt werden können.

| fluoreszierende AGEs | | | |
|--|----------------|--|--|
| AGE - Modifikation | Strukturformel | Karbohydrat (reduzierend) | Bildung aus: Aminogruppe (nucleophil) |
| Pentosidin | | Pentose | Lysin & Arginin |
| Crosslin | | Glucose (2 Moleküle) | N-Acetyllysin (2 Moleküle) |
| Lysin-Dimere GOLD (R ₁) MOLD (R ₂) DOLD (R ₃) | | Glyoxal (2 Moleküle) Methylglyoxal (2 Moleküle) 3-Desoxyglucosulose (2 Moleküle) | Lysin (2 Moleküle) Lysin (2 Moleküle) Lysin (2 Moleküle) |
| Arginin-Lysin-Dimere GODIC (R ₁) MODIC (R ₂) DODIC (R ₃) | | Glyoxal (2 Moleküle) Methylglyoxal (2 Moleküle) 3-Desoxyglucosulose (2 Moleküle) | Arginin - Lysin Arginin - Lysin Arginin - Lysin |
| Glucosepan | | α-Dicarbonyl | HSA |
| MRX | | Glucose | Cystein - Arginin |
| Vesperlysin | | Ascorbat, D-Pentosen, D-Threose | 2 C ₂ -Moleküle mit Lysin |

| nicht fluoreszierende AGEs | | | |
|--|----------------|-----------------------------------|---|
| AGE - Modifikation | Strukturformel | Karbohydrat (reduzierend) | Bildung vornehmlich aus: Aminogruppe (nucleophil) |
| CML | | Glyoxal | Lysin |
| CEL | | Methylglyoxal | Lysin |
| Pyrralin | | 3-Desoxyglucoson | Lysin |
| Arg-Pyrimidin | | Methylglyoxal (2 Moleküle) | Arginin |
| Imidazolinon - Derivate MG - Imidazolinon (R ₁) 3 DG - Imidazolinon (R ₂) | | Methylglyoxal 3-Desoxyglucoson | Arginin Arginin |
| GA - Pyridin | | Glycolaldehyd | Lysin |

Tabelle 1.1: Darstellung von verschiedenen AGE-Modifikationen, die in fluoreszierende und nichtfluoreszierende AGEs unterteilt werden können. Beide AGE-Gruppen können endogen im Organismus oder exogen z.B. in Nahrungsmitteln gebildet werden.

1.3 Signaltransduktionsmechanismen der AGEs

Ursprünglich wurde angenommen, dass diese endogenen AGE-Proteinmodifikationen Proteine für den Abbau markieren (48). In den letzten Jahren wurde jedoch erkannt, dass AGE-modifizierte Proteine *in vivo* mit verschiedenen AGE-Rezeptor-Komplexen interagieren (rezeptorabhängige Mechanismen). Zum einen werden diese AGE-Verbindungen von „AGE-Clearance“ Rezeptoren wie AGE-R1 (Oligosaccaryltransferase OST48), AGE-R2 (80K-H Protein, intrazelluläres Substrat der Protein Kinase C), AGE-R3 (Galectin 3), CD36 (Fettsäuretranslokase) und *scavenger receptors A* und *B* erkannt. Nach deren erfolgter endozytotischer Aufnahme und dem AGE-Abbau in niedermolekulare AGE-Verbindungen können diese renal ausgeschieden werden (24). Zum anderen können AGEs aber auch Signaltransduktionswege über RAGE (*receptor for advanced glycation endproducts*) und eventuell über andere Rezeptoren (AGE-R2, CD36) aktivieren (42).

Der am besten analysierte und in die Signaltransduktion involvierte Rezeptor für AGEs ist RAGE, ein Multiligandenrezeptor der Immunoglobulin Superfamilie, der neben AGEs auch HMG-1, S100-Proteine und β -Amyloidpeptide binden kann. Eine Konsequenz der AGE-RAGE Interaktion ist die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (49). Durch die Erhöhung des intrazellulären oxidativen Stresses werden zahlreiche Signaltransduktionswege wie ERK1/2^{MAPK}-, p38^{MAPK}-, JNK, JAK/STAT-Kinase, rho-GTPase, Phosphoinositol-3-Kinase und der ROS sensitive Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert. Dies führt letztendlich zu einer veränderten Genexpression z.B. von pro-inflammatorischen Genen. Über einen positiven Feedbackmechanismus werden durch die erhöhten ROS-Konzentrationen vermehrt AGEs gebildet (Abschnitt 1.2, späte Phase der AGE-Bildung), die zu pathophysiologischen Komplikationen wie Kataraktbildung in der Linse, kardiovaskulären Erkrankungen (Versteifung des Myokards), Alzheimer Erkrankung und Nephropathie beitragen können.

1.4 Exogene AGEs: Nahrungsmittel-AGEs/MRPs (Maillard Reaktionsprodukte)

Neben den *in vivo* endogen gebildeten und vornehmlich mit pathophysiologischen Effekten assoziierten AGEs gibt es exogene AGEs, die in schon fertig synthetisierter Form durch Nahrungsmittel konsumiert werden. Die in Tabelle 1.1 dargestellten AGE-Verbindungen wurden bis dato sowohl *in vivo* als auch in Nahrungsmittlextrakten (*ex vivo*) gefunden. Die patho-/physiologischen Einflüsse dieser heterogenen Nahrungsmittels-AGE Gruppe sind im humanen Organismus jedoch umstritten (2, 50).

1.4.1 Entstehung von Nahrungsmittel-AGEs

Die Nahrungsmittel-AGEs/MRPs entstehen durch die im Abschnitt 1.2 beschriebene nicht-enzymatische Glykierungs-/Maillard-Reaktion besonders bei deren Herstellung (Erhitzen), da in nahezu allen Lebensmitteln Kohlenhydrate und Aminosäuren/ Proteine und Lipide enthalten sind. Die dabei entstehenden Amadori-Produkte (N ϵ -Fructoselysin, N ϵ -Lactuloselysin, N ϵ -Maltulosyllysin), α -Dicarbonylverbindungen und polymere Maillard-Reaktionsprodukte (MRPs) können die typisch braune Farbe und den charakteristischen Geschmack der Lebensmittel bedingen.

Zum Beispiel kann aus zwei Molekülen Glycolaldehyd Pyrazin, ein braunes, mit Röstaromen assoziiertes Maillard Produkt der fortgeschrittenen Phase gebildet werden (32).

1.4.2 Charakteristische MRP-Strukturen in Nahrungsmitteln

Eindeutig differente Verbindungen, die nur bei der Lebensmittelherstellung auftreten, stellen einerseits heterocyclische Amine bzw. Acrylamide sowie andererseits die Melanoidine dar. Durch die bei der Nahrungsmittelherstellung verwendeten hohen Temperaturen und trockenen Bedingungen können über die Maillard-Reaktion z.B. aus Glucose und der Aminosäure Asparagin (besonders in Getreideprodukten enthalten) Acrylamide (51) sowie aus Kreatin/Kreatinin (Fleischprodukte), reduzierenden Zuckern und Aminosäuren heterozyklische Amine gebildet werden. Es wird angenommen, dass diese Verbindungen im Organismus kanzerogene Effekte begünstigen oder induzieren können (51, 52).

Unter den Melanoidinen versteht man besonders hochkondensierte, polymere Stickstoffatome enthaltende Verbindungen, die während der späten Phase der Maillard-Reaktion gebildet werden. Die genauen Strukturen dieser mit Sicherheit heterogenen Stoffgruppe wurden noch nicht exakt erfasst. Dabei existieren verschiedene Theorien hinsichtlich der Strukturen, die sicherlich parallel, bedingt durch verschiedene Herstellungsmöglichkeiten der Nahrungsmittel, existieren können und sich nicht gegenseitig ausschließen. Cammerer *et al.* vertreten die Auffassung, dass das MelanoidinGrundgerüst aus polymerisierten Zuckerabbauprodukten besteht, wobei die reaktiven Aminogruppen der Aminosäuren die hierfür notwendigen Reaktionen katalysieren und an den Carbonylfunktionen der Zuckerabbauprodukte anlagern können. Durch eine langandauernde Reaktionszeit und hohe Temperaturen nimmt der polymere Charakter der Melanoidine zu, wohingegen der Stickstoffgehalt sinkt (53, 54). Tressl *et al.* sehen wiederum die Möglichkeit, dass Melanoidine sich aus wiederholenden Einheiten von Furanen und /oder Pyrrolen durch Polykondensationsreaktion zusammensetzen (55). Eine weitere Möglichkeit ist die Bildung aus niedermolekularen reaktiven α -dicarbonylen Verbindungen, die über die reaktiven Aminogruppen von Lysin und Arginin quervernetzt werden und chromophore Verbindungen einlagern können (53, 54, 56). Die biologischen Effekte der heterogenen Klasse der Melanoidine sind ebenfalls umstritten, wobei diese immer mehr mit zellulären antioxidativen Eigenschaften und einer Steigerung der Haltbarkeit von Lebensmitteln in Verbindung gebracht werden (57).

1.4.3 Absorption, Metabolismus und Eliminierung von Nahrungsmittel-AGEs

In vivo werden unter natürlichen Bedingungen AGEs endogen nur im pg-Bereich gebildet, wohingegen täglich über die Nahrung AGEs im mg-Bereich aufgenommen werden (50). Nach der oralen Aufnahme der Nahrungsmittel-AGEs erreichen diese Verbindungen über den Magen die Darmpassage (56, 58). Die hochmolekularen Melanoidine werden dabei in niedermolekulare Verbindungen abgebaut und die Abbauprodukte über den Dünndarm resorbiert, wobei die hierfür verantwortlichen Transportprozesse bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht bekannt sind (42, 57). Zahlreiche Ernährungsstudien zeigen, dass AGE/MRP-Verbindungen die Blutzirkulation

erreichen, da der AGE-Gehalt des Serums im Vergleich zur Kontrollgruppe nach einer AGE-reichen Mahlzeit steigt (59). Zudem unterscheiden sich die Resorptionsquoten der AGE-Verbindungen wie CML, Pyrraline und Pentosidin (von 5 bis 30 %) und der Amadori-Produkte, speziell des Fructoselysins (~90 %) erheblich (60). Dabei ist es weiterhin möglich, dass die absorbierten und zirkulierenden AGE-Verbindungen unter physiologischen Bedingungen reaktiv sind und verschiedene patho- bzw. physiologische Prozesse beeinflussen können (59). Letztlich werden die meisten resorbierten Nahrungsmittel-AGEs/MRPs durch renale Exkretion wieder ausgeschieden. (61, 62). Die hierfür verantwortlichen Transporter sind bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht bekannt.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Es wird inzwischen als erwiesen angesehen, dass die *in vivo* vorkommende Maillard-Reaktion zum Alterungsprozess sowie zu neurodegenerativen und kardiovaskulären Erkrankungen beiträgt. Über die patho- und/oder physiologischen Wirkungen von exogenen Nahrungsmittel-AGEs/MRPs und Melanoidinen, die täglich über die Nahrung in großen Mengen konsumiert werden, gibt es momentan in der Literatur sehr widersprüchliche Auffassungen (protektiver versus schädigender Wirkung). Des Weiteren ist wenig über ihre Wirkung im Herzen bekannt.

Im Rahmen dieser Dissertation sollte deshalb zum einen die Wirkung von zwei verschiedenen AGE/MRP-reichen Nahrungsmitteln - dem Brotkrusten- bzw. dem Kaffeeextrakt - auf Verhalten von kardialen Fibroblasten analysiert werden. Hierbei sollte vor allem der Einfluss der Extrakte auf die Signaltransduktion, die Transkription (Genexpressionsveränderungen) und zelluläre Funktionalität (Proliferation, Wachstum, morphologische zelluläre Veränderungen und Zellvitalität) analysiert und wenn möglich *in vivo* überprüft werden.

Durch Verwendung von kardialen Fibroblasten aus C57Bl/6 Wildtypmäusen (WT: RAGE-Rezeptor exprimierend) und C57Bl/6 RAGE knock out Mäusen (RAGE KO: Fehlen des RAGE Rezeptors) sollte zudem der potentielle Einfluss des RAGE Rezeptors bei den durch Nahrungsmittel-AGEs induzierten patho-/physiologischen Effekten geklärt werden.

2 Material

2.1 Chemikalien

Die verwendeten Grund- und Zellkulturchemikalien sowie Zellkulturmedien wurden in analysenreiner bzw. höchster Qualität (p.a.) von den angegebenen Firmen bezogen. Zur Herstellung von Lösungen, Puffern, Medien und Reaktionsansätzen wurde Reinstwasser verwendet (Aufbereitungsanlage der Firma Millipore, Schwalbach).

allgemeine Chemikalien

| | |
|---|---|
| Appllichem (Darmstadt) BSA Natriumchlorid Nonidet P-40 (NP40), Surrogat Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) | Roth (Karlsruhe) Agarose Glycerin Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat Triton X-100 |
| Bio-Rad (München) Bromphenolblau Coomassie-Blau G-250 | RNase A |
| Biomol (Hamburg) 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) | Serva (Heidelberg) Acrylamid/Bisacrylamid 40% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS) 3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure (CAPS) |
| Calbiochem (Darmstadt) Okadainsäure | Glycin Natriumdodecylsulfat (SDS) |
| Fluka (Seelze) Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA) Formaldehyd Isopropanol Lithiumchlorid β -Mercaptoethanol Methanol Saccharose Methanol | Sigma (Deisenhofen) Adenosintriphosphat (ATP) Ampicillin Brij35 p-Coumarsäure Diethylpyrocarbonat (DEPC) Dithiothreitol (DTT) Ethanol Ethidiumbromid |
| Merck (Darmstadt) Benzonase Essigsäure Ethylen glykoltetraessigsäure (EGTA) Kaliumdihydrogenphosphat Dikaliumphosphat Magnesiumchlorid Magnesiumsulfat Natriumhydroxid Calciumchlorid | Gelantine Glutaraldehyd Glycylglycine Kaliumhexacyanoferrat (II) & (III) Kanamycin Luminol 3-Mercapthopropionsäure Natriumazid Natriumvanadat Ponceau S |
| PJK (Kleinblittersdorf) Coelenterazin | Protease Inhibitor Mix Tetramethylethylendiamin (TEMED) Wasserstoffperoxid Zitronensäure |

Zellkulturchemikalien

| | |
|--|---|
| Applichem (Darmstadt) Natriumchlorid | Roche (Mannheim) Collagenase/Dispase |
| Gibco / Invitrogen (Karlsruhe) DMEM (4,5mg/ml Glucose, L-Glutamine, Pyruvate) HBSS (mit Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , ohne Phenolrot) HBSS (ohne Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , ohne Phenolrot) M199 Penicillin/Streptomycin Trypsin-EDTA | Roth (Karlsruhe) Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) |
| Hyclone (Logan, USA) Kälberserum (KS) | Serva (Heidelberg) Dimethylsulfoxid (DMSO) |
| Merck (Darmstadt) Calciumchlorid Kaliumchlorid Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) Magnesiumsulfat Natriumbiphosphat (NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O) Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) | Sigma (Deisenhofen) Glucose Phenolrot Taurine Creatin Carnitin Cytosine-beta-D-Arabinofuranosid HEPES |

spezielle Chemikalien, Materialien und Kits

| | |
|--|---|
| Affymetrix (Santa Clara, Ca, USA) c-DNA Microarray Gene ChipR Mouse Expression Array 430A | Invitrogen (Karlsruhe) Top10F-E.coli |
| Amersham (Braunschweig) ECL Plus Blotting Detection System | Molecular Probes (Karlsruhe) Luciferin (Na-Salz) |
| Bio-Rad (München) TransFektin Lipid Reagent | Pierce (Rockford, USA) BCA™ Protein Assay Kit |
| Biosource (Solingen) Alamar-Blue Reagenz | Promega (Mannheim) 5 x passiver Lysepuffer CytoTox-one™ Homogeneous Membrane Integrity Assay Kit |
| Calbiochem (Darmstadt) 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat (DCFH-DA) | Qiagen (Hilden) EndoFree Plasmid Maxi Kit RNeasy ^R Mini Kit RNase Free DNase Set |
| Chemicon OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit | Sigma (Deisenhofen) Propidiumjodid (PI) |
| Dianova (Hamburg) primäre Antikörper (western Blot) siehe Angaben des Methodenteils sekundäre Antikörper (Western Blot) | Stratagene (Heidelberg) StrataClean™ Resin |
| Fermentas (St. Leon-Rot) Page Ruler™ Prestained Molekulargewichtsmarker DNA 100 bp /1kb Längenstandard | L. Volodarsky, Institut für organische Chemie (Novosibirsk) Bis-(2,2,5,5-Tetramethyl-3-imidazolyl-1-yloxy-4yl)-disulfid (Biradikal, ESR) |
| Gibco/Invitrogen (Karlsruhe) LB-Medium | |

Enzyme und Plasmide*PCR-Reagenzien und Enzyme*

Random-Primer, dNTPs, M-MLV-Reverse Transkriptase Promega, Mannheim

2 x PCR-Master Mix Promega, Mannheim

Primer Invitrogen, Karlsruhe

Plasmide und Enzyme

Restriktionsenzyme (Xba I, Hind II, Sph I) Promega, Mannheim

Plasmid (pRL-SV40) Promega, Mannheim

Plasmide (EGFP, NF- κ B, AP-1, SRE, HSE) BD-Clontech, Heidelberg**Substanzen zur Behandlung der Zellen**

Brotkrustenextrakt, Kaffeeextrakt bereitgestellt durch PD V. Somoza

Pronyl-L-Lysin-BSA, BSA(Fraktion V) bereitgestellt durch PD V. Somoza

Wasserstoffperoxid, N-Acetylcystein Sigma, Deisenhofen

Inhibitoren: U0126, SB203580 Axxora, Lörrach

2.2 verwendete Zelllinien und Mäuse

| Zelllinien | Herkunft | |
|-----------------------|---|-----------------------------------|
| NIH3T3 | Dr. Gielen, Universität Ulm | murine Fibroblastenzelllinie |
| C2C12 | Prof. Dr. Holtz, Pathophysiologie, Uniklinikum Halle | murine Skelettmuskelzelllinie |
| MB 49 | Dr. Söling, Neurologie, Uniklinikum Halle | murine Epidermiszelllinie (Blase) |
| primäre Lymphozyten | Prof. Hansen, Uniklinikum Halle | Milz der Maus (C57Bl6) |
| kardiale Fibroblasten | eigene Generierung und Etablierung | |
| Mäuse | | |
| WT Mäuse | C57Bl6, Charles River WIA G GmbH, Sulzfeld | |
| RAGE KO Mäuse | C57Bl6, sechsfache Rückkreuzung, Dr. Bierhaus, Universität Heidelberg | |
| nu / nu Mäuse | Harlan Winkelmann, Borcheln | |

2.3 Materialien

| | |
|--|--|
| Biozym (Oldendorf) Filterspitzen (10-, 200-, 1000 μ l) | Millipore (Schwalbach) Polyvinylfluorid (PVDF) Membran |
| Eppendorf (Hamburg) Pipettenspitzen (10-, 200-, 1000 μ l) | YM-10 Microcon ^R Centrifugal Filter Devices |
| Greiner bio-one (Essen) serologische Pipetten (5-, 10-, 25 ml) 96 well Platten, weiß /schwarz, durchsichtiger Boden | TPP (Trasadingen, Schweiz) 96-, 48-, 24-, 12-, 6 well Zellkulturplatten Zellkulturschalen (10 cm, 5 cm) Zentrifugenröhrchen (15-, 50 ml) |
| Heinemann Labortechnik (Duderstadt) Steril-Filter (Porengröße 0,2 μ M) | VWR (Darmstadt) Whatman Filterpapier |
| Laborfachhandel Schubert (Leipzig) Tubes (0,2-, 0,5-, 1,5-, 2 ml) | Schleicher & Schuell (Düren) Nitrocellulose Membran |
| Menzel-Glaser (Braunschweig) Deckgläschen Objektträger | |

2.4 Geräte

| | |
|--|---|
| Affymetrix (Santa Clara, CA,USA) DNA-Mikroarray Analysegeräte: GeneChip Fluidics Station 400 Hybridisierungsöfen | Gesellschaft für Laborbedarf (Burgwedel) Wasserbad: TYP 1008 |
| Air Liquide GmbH (Düsseldorf) Kryoversorgungssystem: Espace 331 | Heraeus-Instruments (Hanau) Brutschränke: Hera cell Sterilbänke: Hera cell Zentrifuge: Biofuge fresco-/ stratos |
| Applied Biosystems (Darmstadt) PCR-Gerät: Gene Amp ^R PCR system | Heidolph Instruments (Kelheim) Probenschüttler: Polymax 1040 |
| Brau Biotech International, Melsungen Bakterienschüttler: Certomat ^R H | IKA Labortechnik (Staufen) Probenschüttler: KS 250 basic Magnetrührer: IKAMAG ^R REO |
| Bandelin electronic GmbH, Berlin Ultraschall-Gerät: Sonorex Digital 10P | IUI Instruments (Königswinter) Hypoxie Schrank: Invivo 400 |
| Beckon Dickinson, Heidelberg FACS-Gerät: Facs-Calibur | Kontes (New Jersey, USA) Zellhomogenisator: Minihomogenisator |
| Biometra (Göttingen) Spannungsquelle: Power Pack P25 PCR-Gerät: TRIO-Thermoblock | Magnettech GmbH (Berlin) ESR-Gerät: Miniscope 100 |
| Bio-Rad (München) Blot-Apparatur: Trans-Blot SD Spannungsquelle: Power Pack 200 Elektrophorese: Sub-Cell GT (DNA) Elektrophorese: Mini-Protean III Cell-System (Western Blot) | Nikon GmbH (Düsseldorf) Mikroskop: Nikon Eclipse TS100 PreqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen) Spektrophotometer: Nanodrop-1000 |
| BMG Labtechnologies (Offenburg) ELISA-Reader FLUOstar OPTIMA reader | Raytest (Straubenhardt) Detektionssystem: LAS-3000 imaging system |
| Carl Zeiss Microlmaging (Göttingen) Mikroskop: Axiovert 200M | Saur (Reutlingen) Tissue Chopper: MC IL Wain |
| Eppendorf (Hamburg) Zentrifuge: Concentrator 5301 PCR-Gerät: Mastercycler gradient Thermomixer: 5436 Comfort | Schärfe-System GmbH (Reutlingen) Zellmessgerät: Casy ^R TTC Schleicher & Schuell (Düren) Dot-Blot Apparatur: Minifold Spot-Bloteinheit Systec GmbH (Wettenberg) Autoklav Systec V95 |

2.5 Auswerte-Software

| | |
|--|---|
| Microarray Suite 4,0 | Affymetrix, Santa Clara, USA |
| Aida 3,5 software | Raytest, Straubenhardt |
| CellQuest Pro software | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Multisizer™ 3 Coulter Counter | Beckman Coulter, Krefeld |
| MultiCycle software | Phoenix Flow Systems, San Diego, USA |
| Meta Morph | Visitron Systems, Puchheim |
| MS Excel | Microsoft, USA |
| Endnote 7.0 | Philadelphia, USA |
| www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM | NCBI OMIM Programm |
| www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human | NCBI Nucleotide Programm |
| http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm | NCBI-Primer 3 Programm |
| Prophet 5.0 | National Center for Research Resources of the National Institutes of Health; BBN Systems and Technologies |

3 Methoden

3.1 Herstellung der Nahrungsmittelextrakte

Im Rahmen einer Kooperation mit Frau PD Dr. Veronika Somoza (Stellvertretende Direktorin der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching) wurden die zu untersuchenden Nahrungsmittelextrakte sowie das Pronyl-L-Lysin-BSA/BSA zur Verfügung gestellt.

3.1.1 Herstellung des Kaffeeextraktes (KE)

Das erhaltene KE wurde aus gerösteten entkoffeinierten Kaffeebohnen (*Coffea arabica*, Colombia) entsprechend der Beschreibung von Somoza *et al.* hergestellt (63). Dafür wurden von dem durch mechanische Zerkleinerung erhaltenen Kaffeepulver durch ein Sieb (Porengröße 2 mm) 54 g gesammelt, mit 1,1 l heißen Wasser durch einen Kaffeefilter filtriert, im Eisbad abgekühlt und dreimal mittels Petroleum-Ether versetzt. Die entfettete und koffeinfreie Kaffeelösung wurde gefriergetrocknet und das organische Lösungsmittel durch Vakuum entfernt. Das so erhaltene Kaffeeextraktpulver wurde mit 1 x HBSS in einer Konzentration von 50 mg/ml gelöst und mit einer Porengröße von 0,2 µm steril filtriert.

3.1.2 Herstellung des Brotkrustenextraktes (BKE)

Das erhaltende Brotkrustenextrakt wurde aus Weizen- und Roggenmehl, Wasser, Sauerteig, Bäckerhefe und NaCl, wie durch Lindemeier *et al.* beschrieben, hergestellt (64). Die braune Brotkruste wurde von den Brotkrumen getrennt, in flüssigem N₂ tiefgefroren, mit einem Mörser zerkleinert und dreimal mittels Chloroform entfettet. Nach der Filtration wurden Lösungsmittelreste durch Vakuum entfernt.

Diese so erhaltene Totalfraktion des entfetteten braunen Brotkrustenextraktes wurde in einer Endkonzentration von 250 mg/ml mit 1 x HBSS versetzt, dreimal für jeweils 15 min im Ultraschallbad behandelt und danach für je 10 min bei 1000 x g zentrifugiert. Der dabei erhaltene Überstand wurde als Gesamtextrakt (BKE) gesammelt. Zum Erhalt der löslichen Brotkrustenfraktion (BL) wurde das Gesamtextrakt bei 10.000 x g, 4 °C, für 30 min zentrifugiert und anschließend steril filtriert (Porengröße 0,2 µm). Die BL-Fraktion kleiner 10 kDa (≤10 kDa der BL-Fraktion) wurde unter Verwendung der YM-10 Microcon^R Centrifugal Filter nach einer Zentrifugation von 30 min, 10.000 x g, 4 °C als Filtrat des BL erhalten und relativ zu der 10 mg/ml BL-Konzentration eingesetzt. Die Extrakte wurden anschließend aliquotiert und bei -20 °C bis zur Verwendung eingefroren.

3.1.3 Pronyl-L-Lysin-BSA Herstellung (PL-BSA)

Das zur Verfügung gestellte PL-BSA wurde aus einer Suspension aus BSA und Acetylformoin in Phosphatpuffer entsprechend der Beschreibung von Lindemeier *et al.* hergestellt (64). Anschließend wurde per Analyse bestimmt, dass 2 % der im BSA enthaltenen Lysine pronyliert modifiziert wurden, was statistisch ~ 1,2 Lysinen pro BSA-Molekül entspricht, da in der Aminosäuresequenz des BSA 60 Lysine enthalten sind.

3.2 Zellkulturtechniken

3.2.1 Generierung und Kultivierung von zwei murinen kardialen Fibroblastenzelllinien

Murine kardiale Fibroblastenzelllinien wurden aus C57Bl/6 Wildtyp und C57Bl/6 RAGE knock out Mäusen isoliert. Jeweils drei männliche Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet, die Herzen entnommen, in eiskalte physiologische NaCl-Lösung überführt und mittels Skalpell und *Tissue Chopper* stark zerkleinert. Der entstandene Gewebepulver wurde in 40 ml Inkubationspuffer (110 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 1,2 mM NaH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃, 11 mM Glucose) aufgenommen, mehrfach resuspendiert und zentrifugiert (25 x g, 5 min). Anschließend wurde das Pellet in 10 ml Inkubationspuffer mit einer Endkonzentration von 1mg/ml Kollagenase /Dispase aufgenommen, für 30 min unter CO₂-Begasung inkubiert und unverdaute Gewebestücke für 5 min bei Raumtemperatur sedimentiert. Der Überstand wurde bei 500 x g für 5 min zentrifugiert und das entstandene Zellpellet in 2 cm großen Zellkulturschalen mit DMEM, 10 % Kälberserum (KS) und Penicillin (100 U/ml) /Streptomycin (100 µg/ml) aufgenommen. Der restliche Gewebepulver wurde zwei weitere Male mittels Kollagenase/Dispase verdaut und die erhaltenen Zellpellets analog ausgesät. Das Medium wurde in der ersten Woche nach der Präparation täglich gewechselt, wobei immer ein zweimaliger Waschschrift mit DMEM vorausging, um nicht adhärente und tote Zellen zu entfernen. Bei einer Zellkonfluenz von ca. 80 % wurden alle drei Schalen vereint und anschließend sequenziell alle 4 Tage mit maximal 10.000 Zellen/cm² passagiert. Die Kardiofibroblasten wurden durch die auftretende Alterungskrise kultiviert und die durch spontane Transformation gebildeten murinen kardialen Fibroblastenzelllinien - die Wildtyp Zelllinie (WT) sowie die RAGE-knock out Zelllinie (RAGE KO) - auf Mykoplasmen getestet und eingefroren, wobei diese Generierung der beiden Zelllinien unabhängig voneinander zweifach durchgeführt wurde. Während der Generierung der zwei Zelllinien wurde die kumulative Populationsverdopplung (CPD) wie folgt bestimmt:

$$CPD = \sum_{i=1}^n PDT \text{ Tag } i$$

wobei:
CPD: *cumulative population doubling*

$$PDT = \frac{\ln N - \ln N_0}{\ln 2}$$

PD T: *population doubling time*

N: Endzellzahl

N₀: Anfangszellzahl - Zellzahl des Überstandes

3.2.1.1 Mykoplasmentest

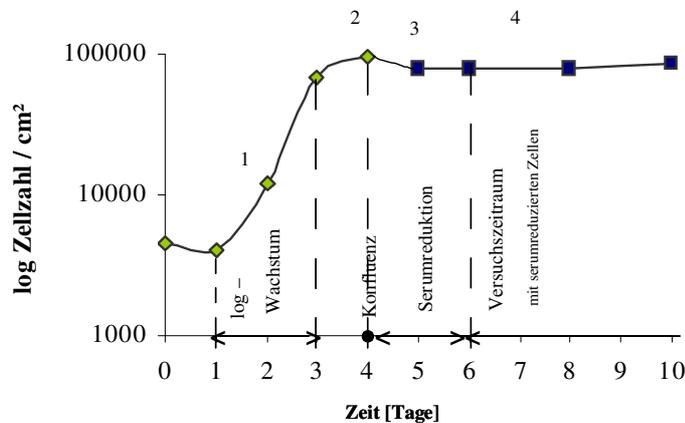
Alle verwendeten Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen mittels PCR (65) auf Mykoplasmenkontaminationen untersucht und nur Zellen für Experimente verwendet, die eindeutig negativ getestet wurden. Hierfür wurden jeweils 100 µl Überstand von einer konfluent über sieben Tage bewachsen 24 well Kavität verwendet. Der Überstand wurde für 1 Std. bei -80 °C eingefroren, zentrifugiert (5 min, 900 x g), bei 95 °C für 10 min erhitzt und im Verhältnis 2:1 mit StrataClean™ Resin versetzt. Nach zehnmütiger Inkubation wurde für 2 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Der DNA enthaltende Überstand wurde nach einer 1:10 Verdünnung in eine PCR-Reaktion (Abschnitt 3.9.4) mit einem spezifischen Primerpaar (Anhang Tabelle 1) eingesetzt. Von jeder Probe wurden 2 Ansätze ± internen Standard parallel mit einer Positiv- wie Negativkontrolle

(Kulturmedium) amplifiziert. Nach erfolgter PCR (T_A 60 °C, 40 Zyklen) wurde die Proben im 1 % TAE-Agarosegel mit Ethidiumbromid (Abschnitt 3.9.4.4) elektrophoretisch aufgetrennt. Mykoplasmen-Kontaminationen wurden durch Banden bei einer Größe von 510 bp sichtbar, wohingegen der interne Standard eine Größe von 1000 bp aufwies.

3.2.1.2 Kultivierung und Passagieren der Zelllinien

Kultivierung und Passagieren: Die kardialen Fibroblasten wurden in 10 cm Zellkulturschalen mit Standardmedium [DMEM, 5% KS, Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml)] unter Standardbedingungen (37 °C, 5% CO₂, feuchte Atmosphäre) kultiviert. Die Zellen wurden alle 3 bis 4 Tage passagiert. Dabei wurden die Schalen mit 37 °C warmen PBS gespült und mit einer Trypsin-EDTA Lösung (0,1% (w/v) Trypsin-EDTA) in 1 x PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM NaH₂PO₄, KH₂PO₄, pH 7,4) für 4 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit Standardmedium von der Zellkulturplatte suspendiert und die Zellzahl mittels eines Zellzählmessgerätes bestimmt.

Versuchsaussaat: Die Zellen wurden in Abhängigkeit der zu untersuchenden Parameter in verschiedenen Stadien des Wachstums verwendet wie in Abb. 3.1 dargestellt. Für basale Wachstums-/Proliferationsuntersuchungen wurden die Zellen mit einer Dichte von 5000 Zellen/cm² ausgesät und während des Versuches im Standardmedium kultiviert. Für konfluente Versuchsbedingungen wurden die Zellen mit einer Dichte von 10000/cm² ausgesät und erreichten nach 4 Tagen Konfluenz, woran sich nach zweimaligem Waschen mit DMEM eine Serumreduktion [DMEM, 0,1 % KS, Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml)] für 48 Std. anschloss.



Versuchsdurchführungen bei unterschiedlichen Zellkulturbedingungen:

1: während des logarithmischen Wachstums

- Alamar Blue Assay (Abs.: 3.5.3)
- Wachstumsanalysen (Abs.: 3.6)
- Transkriptionsfaktor - Aktivitätsbestimmung (Abs.: 3.16)
- Campisi - Assay (Abs.: 3.18)

4: mit konfluenten, serumreduzierten Zellen (Versuchszeitraum)

- Zelltodnachweis (Abs.: 3.5.1/2)
- ROS - Bestimmung (Abs.: 3.7)
- Messung der Proteinoxidation (Abs. 3.8)
- RNA - Analytik (Abs.: 3.9)
- cDNA - Mikroarray Analytik (Abs.: 3.10)
- Western - Blot Analytik (Abs.: 3.12)
- Zymographie - Analytik (Abs.: 3.14)
- Präkonditionierungsexperimente (Abs.: 3.15)
- GSH - Analytik (Abs.: 3.17)

Abb.3.1: Darstellung der angewendeten Zellkulturbedingungen in Abhängigkeit der verwendeten Untersuchungsmethoden.

3.2.1.3 *Einfrieren und Auftauen von Zellen*

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 70 % eingefroren. Hierfür wurden sie mit PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA Lösung abgelöst. Die Zellen wurden in 10 ml Standardmedium aufgenommen, die Zellzahl mittels Zellzahlmessgerät bestimmt und danach abzentrifugiert (500 x g, 5 min). $1 \cdot 10^6$ Zellen wurden in 500 μ l Standardmedium resuspendiert und mit Einfriermedium (90 % KS, 10 % DMSO) 1:1 verdünnt. Die Zellsuspension wurde in Kryo-Röhrchen überführt und in einer Kryo-Box über Nacht auf -80 °C abgekühlt. Die Lagerung der Zellen erfolgte in einem Kryo-Versorgungssystem über flüssigem N₂.

Zum Auftauen der Zellen wurde ein Kryo-Röhrchen für wenige Minuten in 40 °C heißes Wasser gehalten, um anschließend in 10 ml warmem Medium aufgenommen und abzentrifugiert (500 x g, 5 min) zu werden. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in frischem Medium gelöst und auf eine 10 cm Zellkulturschale ausgesetzt.

3.2.2 *Isolierung und Kultivierung von adulten Rattenkardiomyozyten*

Für die Versuchsansätze wurden 2 adulte Wistar-Ratten verwendet. Die Narkotisierung der Tiere erfolgte durch eine intraperitoneale Mischinjektion von Ketamin- und Xylazinhydrochlorid (Ketaminhydrochlorid = 60 mg/kg; Xylazinhydrochlorid = 3 mg/kg) unter Zusatz von 4000 U/kg Heparin. Anschließend wurde der Thorax mit einer Schere geöffnet, das Herz unter Fixierung der Aorta entnommen und in eiskalte NaCl-Lösung gegeben. Die Präparation der adulten Rattenkardiomyozyten wurde nach der Methode von Schlüter *et al.* durchgeführt (66).

Perfusion und Verdau des Herzens: Die isolierten Herzen wurden an der Aorta in einer Langendorff-Apparatur befestigt und mit 80 ml begastem Perfusionspuffer (110 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 1,2 mM NaH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃, 11 mM Glucose, pH 7,4) zur Entfernung von Blutzellen gespült. Danach wurde mit 90 ml Perfusionspuffer (mit einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml Kollagenase P, 14 μ M CaCl₂) für 30 Minuten perfundiert (2 Tropfen/Sekunde).

Dispersion des Gewebes: Nach der Entfernung des Atriums und der Aorta wurden die verbleibenden Ventrikel mechanisch zerkleinert, mit 30 ml BSA-haltiger Reperfusionslösung (0,2 mM BSA in Reperfusionspuffer) in einen Teflonbecher überführt und bei 37 °C mit CO₂ begast. Die Kardiomyozyten wurden im Nachverdau durch vorsichtiges Resuspendieren für 2 min mit einer Pipette aus dem Gewebeverband herausgelöst und durch einen angefeuchteten Nylonfilter (250 μ m) in ein steriles 50 ml Zentrifugen-Röhrchen filtriert.

Anreicherung der Stäbchen: Das dispergierte Gewebe wurde bei 25 x g für 3 min zentrifugiert und das Kardiomyozyten enthaltende Pellet in einer Earle-Salzlösung (116 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,8 mM NaH₂PO₄, 5,5 mM Glucose, 20 mM Tris/HCl, 130 μ M Phenolrot, pH 7,5) mit 200 μ M CaCl₂ aufgenommen, resuspendiert und bei 25 x g für 3 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Earle-Puffer mit 0,5 mM CaCl₂ resuspendiert und vorsichtig über eine mit 1 mM CaCl₂ und 40 mg/ml BSA enthaltende Earle-Lösung geschichtet. Nach Sedimentation bei 15 x g für 1 min wurde dieses Zellpellet in M199 Kompletmedium (5 mM Taurin, 5 mM Creatine, 2 mM Carnitine, 10 μ M Cytosine- β -D-Arabinofuranosid in M199) aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

Kultivierung der adulten Rattenkardiomyozyten: Die Zellsuspension wurde in die 24 Std. zuvor beschichteten 6 well Platten [M199 Komplettmedium, 4 % fetales Kälberserum (FKS), Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml)] mit einer Zelldichte von 15000 Zellen/cm² überführt und in serumfreiem M199 Komplettmedium bei 37 °C für 4 Std. zur Anheftung inkubiert. Nach einem Mediumwechsel zur Entfernung der toten und nicht adherierten Zellen wurden die Kardiomyozyten entsprechend der jeweiligen Versuchsbedingungen behandelt.

3.3 Gewinnung von Probenmaterial aus BKE-Fütterungsstudien an Nacktmäusen

Pro Gruppe wurden jeweils 14 Mäuse mit einer Kontrolldiät bzw. einer mit 15 % BKE angereicherten Diät für 14 Tage gefüttert. Danach wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, der Thorax eröffnet und das darin befindliche Blut sowie die Organe entnommen. Das Blutserum wurde durch Zentrifugation (8.000 x g, 5 min) gewonnen und mit den Organen bei -80 °C eingefroren. Die Herzen wurden für RNA- (Abschnitt 3.9.2) sowie Protein-Analysen (Abschnitt 3.11 & 3.12) verwendet.

3.4 Analyse der AGE-Fluoreszenz von Protein- und Plasmaproben

Bei den isolierten Mausblutseren sowie den hergestellten Proteinlysaten der Herzproben der mit Kontroll- bzw. 15 % BKE angereicherter Diät gefütterten Mäuse wurde mittels ELISA-Reader die AGE-Fluoreszenz bestimmt. Die Seren bzw. Proteinlysate wurden in 96 well Kavitäten überführt und mit 370 nm angeregt und die abgegebene Fluoreszenzwellenlänge bei 440 nm detektiert. Die jeweiligen Fluorezenzwerte wurden auf den Proteingehalt (BCA-Methode) normiert.

3.5 Vitalitätstests

3.5.1 Propidiumjodid (PI) Färbung - Zelltodanalyse (Nekrose)

Durch den PI-Farbstoff, welcher nur über geschädigte Zellmembranen in die Zellen eindringen kann und innerhalb der Zelle an die DNA bindet, kann der Anteil des Zelltodes quantifiziert werden. Bei der Zelltodanalyse wurden sowohl der Zellüberstand als auch die durch Trypsin abgelösten und in PBS mit 5 % KS aufgenommenen Zellen in FACS-Röhrchen überführt. Nach der Zentrifugation (500 x g, 5 min) wurden die Zellen in der PI-Färbelösung (2 µg/ml PI in PBS) aufgenommen und durchflusszytometrisch die Fluoreszenzintensität ~575 nm (FL2) gemessen und unter Verwendung der *CellQuest Pro Software* analysiert.

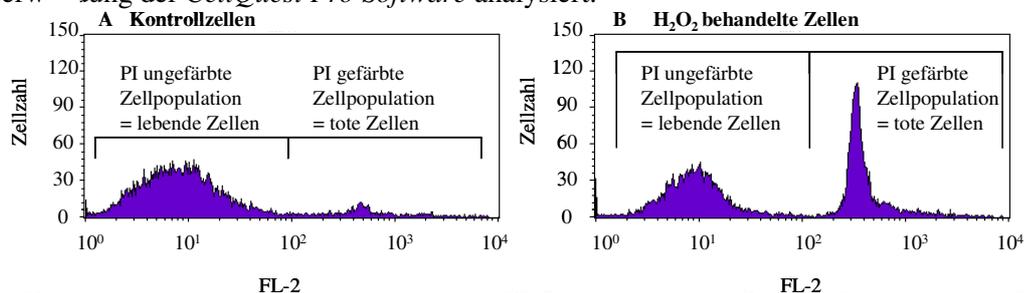


Abb.3.2: Darstellung der durchflusszytometrischen PI-Zelltod Analyse. Bei konfluenten, unter Serumreduktion kultivierten WT Zellen (A) sowie für 24 Std. mit 0,7 mM H₂O₂ behandelten WT Zellen (B) wurde der Zelltod durchflusszytometrisch mittels PI-Färbung analysiert.

3.5.2 Zelltodnachweis durch Bestimmung der LDH-Aktivität im Zellüberstand

Bei nekrotischen Zelltod kommt es zur Freisetzung von zytoplasmatischen Enzymsystemen wie der Lactat-Dehydrogenase (LDH), die mittels des *CytoTox-oneTM Homogeneous Membrane*

Integrity Assay Kit nachgewiesen wurde. Dabei wurden je 50 µl Zellkulturüberstand bzw. 50 µl Zelllysat auf eine für Fluoreszenzmessung geeignete 96 well Platte überführt. Die Zelllyse erfolgte durch Zugabe von 10 % Triton X 100 in 1 x PBS im Verhältnis 1:10 in das Zellkulturmedium für 10 min bei RT. Durch Zugabe von Substratlösung im Verhältnis 1:1 wurde die gebildete LDH-Menge durch Fluoreszenzmessung bei einer Extinktion von 560 nm und einer Emission von 590 nm mittels ELISA-Messgerät bestimmt. Um die durch die Zellen freigesetzte LDH-Menge zu bestimmen, wurde von allen Werten der Leerwert (Medium) abgezogen und der Wert des Überstandes durch den Gesamtlysat-Wert dividiert.

$$\text{LDH-Fluoreszenzwert} = \frac{\text{LDH Überstand (Ü)}}{\text{LDH Gesamtlysat (G)}}$$

$$\begin{aligned} \text{wobei: LDH Ü} &= (\text{LDH Gehalt des Zellkulturüberstandes} - \text{LDH Leerwert}) \\ \text{LDH G} &= [(\text{LDH Zelllysat} - \text{LDH Leerwert}) + \text{LDH Ü}] \end{aligned}$$

3.5.3 Alamar Blue Assay: Nachweis der Zellproliferation und des reduktiven Zellpotentials

Der für Zellen ungiftige blaue Farbstoff Resazurin (Alamar Blue) kann nur durch vitale Zellen zu dem pinkfarbenen Farbstoff Resorutin umgewandelt werden. Somit wird eine vermehrte Umsetzung des Farbstoffes mit einer erhöhten proliferativen - und reduzierenden Kapazität der Zelle assoziiert (67).

Für die Analyse der Zellproliferation in 96 well Platten wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und in jede Kavität 100 µl der mit Zellkulturmedium 1:10 verdünnten Alamar-Blue Lösung pipettiert. Nach einer vierstündigen Inkubationszeit im Brutschrank wurde die Absorption im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 570 nm sowie 620 nm vermessen und hieraus die Absorptionsdifferenz bestimmt.

$$\Delta \text{OD}_{\text{Alamar Blue}} = \text{OD}_{570\text{nm}} - \text{OD}_{620\text{nm}}$$

3.6 Wachstumskinetiken, Verdopplungszeiten und Zellzyklus-Analysen

Wachstumskinetiken und Verdopplungszeiten: Die Zellen wurden durch Trypsin-Lösung abgelöst, im Standardmedium aufgenommen und die Zellzahl, das Zellvolumen und der Zelldurchmesser durch das Zellzahlmessgerät in 1 x PBS durch Widerstandsmessung bestimmt. Daraus wurde die Verdopplungszeit (PDT: *population doubling time*), die Zeit, die eine Zelllinie für die Verdopplung ihrer Zellzahl während des logarithmischen Wachstums benötigt, wie folgt errechnet:

$$\text{Verdopplungszeit: } \text{PDT} = (t - t_0) * \frac{\ln 2}{\ln N_t/N_0}$$

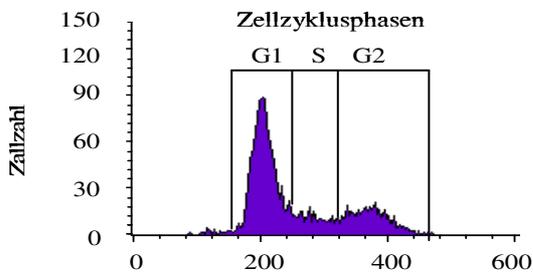
wobei: N = Zellzahl nach Versuchsdauer

N₀ = Zellzahl zum Zeitpunkt Null

(t - t₀) = Zellkulturdauer in Std.

Zellzyklus-Analyse: Die Analyse des Zellzyklus erfolgte durch eine durchflusszytometrische DNA-Quantifizierung. Die zu analysierenden Zellproben wurden mit PBS gewaschen, mit Trypsin-Lösung abgelöst und im Standardmedium (1 ml) aufgenommen. Nach Zentrifugation (500 x g, 5 min) wurden die Zellen in 350 µl 1 x PBS resuspendiert und mit 150 µl 96 % Ethanol (final 70 %

Ethanol) versetzt und über Nacht bei 4 °C fixiert. Anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert (500 x g, 5 min) und das Zellpellet in PI-Färbepuffer (50 µg/ml PI, 0,1 mg/ml RNase A, 3,4 mM Natriumzitat, 0,1 mM EDTA in PBS, pH 7,2) entsprechend der Zellzahl ($1 \cdot 10^6$ Zellen/ml PI-Färbelösung) für 1 Std. bei 4 °C inkubiert. Der DNA-Gehalt wurde durchflusszytometrisch bei ~ 575 nm (FL2) ermittelt. Die Auswertung der DNA-Histogramme wurde mittels der *MultiCycle software* durchgeführt.



3.7 Analyse der intrazellulären ROS-Produktion

Die intrazellulär gebildeten Sauerstoffmetabolite wurden mittels eines zellpermeablen Fluoreszenzindikators 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat ($H_2DCF\text{-}DA$), der in nicht-fluoreszierender Form als Diacetat aufgenommen wird, analysiert. Durch intrazelluläre Esterasen wird dieses Substrat in das nicht-fluoreszierende impermeable 2',7'-Dichlorofluorescein (DCFH) deacetyliert. Die intrazellulären ROS oxidieren DCFH zu dem stark grün fluoreszierenden Endprodukt 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) (68). Die verwendeten Zellen wurden nach zweimaligen Waschen mit PBS durch Behandlung mit Trypsin-EDTA Lösung abgelöst, in eine HBSS-Glucose Lösung (10 mM Glucose in HBSS) überführt und die Zellzahl am Zellmessgerät bestimmt. Je 2×10^5 Zellen wurden in ein FACS-Röhrchen überführt und für 5 min bei 500 x g zentrifugiert. Die erhaltenen Zellpellets wurden in der HBSS-Glucose Lösung resuspendiert und mit 5 µM $H_2DCF\text{-}DA$ für 15 min bei 4 °C im Dunklen inkubiert. Nach Zentrifugation (500 x g, 5 min) wurde das Zellpellet mit HBSS gewaschen und mit den verschiedenen Agenzien für die angegebenen Zeitpunkte in der HBSS-Glucose Lösung bei Raumtemperatur inkubiert, gewaschen und abschließend durchflusszytometrisch bei ~ 525 nm (FL1) vermessen.

3.8 Analyse der Proteinoxidation zur Bestimmung des intrazellulären oxidativen Status

Durch hohe ROS-Konzentrationen oder andere reaktive Verbindungen (z.B. Hydroxynonenal) können Proteinseitenketten von Aminosäuren (Serin, Threonin) oxidiert werden, wodurch Carbonylgruppen entstehen. Der Gehalt an Proteincarbonylseitenketten ist ein allgemeines Kennzeichen für Proteinoxidationsreaktionen und kann durch die Derivatisierung der Carbonylgruppen mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) zu 2,4-Dinitrophenylhydrazon (DNP-Hydrazon) über Dot Blot Analysen (primärer Antikörper gegen DNP-Motive) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen quantifiziert werden. Für diese Untersuchungen wurde der OxiBlot™ Oxidation Detection Kit verwendet. Die behandelten Zellen wurden zweimal mit 1 x PBS gewaschen und mit 25 µl/cm² SDS Lysepuffer (50 mM Tris/HCl, 2 % SDS, 2 % β-Mercaptoethanol) lysiert. Die folgenden Inkubationsschritte der lysierten Proben wurden nach den Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt. Letztlich wurden die mit 2,4-Dinitrophenyl-

hydrazin inkubierten Proben nach einer Reaktionszeit von 15 Minuten abgestoppt und konnten anschließend mittels Dot-Blot (Abschnitt 3.13) analysiert werden. Dabei wurde ein primärer Antikörper gegen die DNP-Motive (1:150; 24 Std., 4 °C) sowie nach anschließendem zweimaligem Waschen ein sekundärer Antikörper (goat anti-rabbit; 1:300; 1 Std., Raumtemperatur) verwendet. Das Signal des Dot-Blot konnte nach wiederum zweimaligem Waschen und anschließender Inkubation mit dem ECL Plus Detektionskit mittels LAS-3000 *imaging system* detektiert und durch die Aida 3,5 software densitometrisch analysiert werden (Abschnitt 3.12.2).

3.9 RNA-Analytik

3.9.1 RNA-Isolation aus Zellen

Die RNA-Isolation aus Zellen erfolgte unter Verwendung des RNeasy Mini Kit Systems der Firma Qiagen. Die Zellen wurden mit PBS gespült und mittels eines Guanidiniumisothiocyanat Puffers (RLT-Puffer) und β -Mercaptoethanol (1 % Vol (v/v)) lysiert, in 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 70 % Ethanol versetzt und auf eine Silikagel-Membran Säule pipettiert. Die verschiedenen Waschschrte mit spezifischen Puffersystemen wurden wie im Protokoll des Herstellers Qiagen durchgeführt. Während der RNA-Präparation wurde zur Entfernung von genomischer DNA zusätzlich ein DNase Verdau mittels des RNase Free DNase Set durchgeführt. Hierfür wurde ein DNase-Puffersystem entsprechend der Angabe des Herstellers für 15 min auf der Säule inkubiert und nach weiteren Waschschrten die RNA in 35 μ l RNase freiem Wasser eluiert und bei -80 °C gelagert.

3.9.2 RNA-Isolation aus Gewebe

Aus den Herzgeweben wurde RNA mittels TRIzol Reagenz basierend auf der Methode von Chomczynski & Sacchi isoliert (69). Zur RNA-Isolation wurde 30 bis 50 mg Herzgewebe mechanisch in Alufolie zerkleinert. Durch wiederholtes Eintauchen der Proben in flüssigen N₂ wurde ein Auftauen und somit möglicher vorzeitiger RNA-Abbau durch RNasen verhindert. Das zerkleinerte Probenmaterial wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in 750 μ l TRIzol Reagenz mit 10 μ g Glycogen aufgenommen und mittels Minihomogenisators vollständig homogenisiert und abzentrifugiert (5 min, 10.000 x g). Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, mit 0,25 Vol % Chloroform/ Isoamylalkohol (23:1) versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation bei 13000 x g, 4 °C für 15 min. Die wässrige RNA-haltige obere Phase wurde, ohne die Interphase zu berühren, in ein neues Gefäß überführt und durch Zugabe von Isopropanol im Verhältnis 1:1 für 30 min bei RT gefällt und abzentrifugiert (30 min, 10.000 x g, 4 °C). Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und 5 min bei Raumtemperatur getrocknet. Die RNA wurde danach in 100 μ l DEPC-Wasser gelöst, um sie anschließend durch RNeasy Qiagen-Säulen und einen DNase Verdau direkt auf diesen Säulen aufzureinigen (Abschnitt 3.9.1). Die erhaltene RNA wurde bei -80 °C gelagert.

3.9.3 Bestimmung der RNA-Konzentration, Reinheit und Qualität

Die isolierte RNA-Konzentration wurde durch Absorptionsbestimmung bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Die Absorption von A_{260nm} von 1 entspricht einer Konzentration von 40 μ g/ml RNA.

Unter Berücksichtigung von Verdünnungen wurde die RNA-Konzentration wie folgt berechnet:

$$A_{260\text{nm}} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \mu\text{g RNA}/\mu\text{l}.$$

Parallel konnte aus dem Absorptionsquotient $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ eine Aussage über die RNA-Qualität getroffen werden, wobei der optimale Quotient $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ bei 2,0 liegt. Weiterhin wurde die RNA-Qualität durch gelelektrophoretische Trennung überprüft. Hierfür wurde 1 μl der isolierten RNA mit 3 μl Probenpuffer und 6 μl DECP-Wasser gemischt und elektrophoretisch in einem 1,5 % (w/v) TAE-Agarose Gel (Abschnitt 3.9.4.4) aufgetrennt. Die Qualität der RNA konnte mittels UV-Strahlung im LAS-3000 *imaging system* sichtbar gemacht werden. Zwei diskrete Banden für die 28S und 18S rRNA zeigen eine intakte RNA-Präparation an, wobei im Idealfall die Intensität der 28S rRNA nahezu doppelt so groß wie die der 18S rRNA sein sollte.

3.9.4 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Um die Expression spezifischer Gene in den Zellen bzw. Geweben nachzuweisen, wurde zuerst die isolierte RNA in einen komplementären DNA-Strang mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben, um anschließend als Template für die Polymerasenkettenreaktion zu dienen.

3.9.4.1 Reverse Transkription (RT)

Für die cDNA-Synthese wurden 500 ng RNA in 10 μl DECP-Wasser für 3 min bei 72 °C im Thermoblock inkubiert und anschließend auf 4 °C abgekühlt. Die cDNA-Synthesereaktion wurde in 25 μl Gesamtvolumen unter Verwendung von 200 ng random hexameren Primern, 0,5 mM dNTPs und 40 Units M-MLV reverse Transkriptase bei 42 °C für 35 min durchgeführt und durch das Erhitzen auf 94 °C für 1 min beendet. Die cDNA wurde 1:1 mit sterilem Wasser verdünnt und als „*template*“ in die sich anschließende PCR eingesetzt.

3.9.4.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR-Reaktion, entwickelt von Karry B. Mullis (70), wurde mittels PCR-Master Mix und des spezifischen sense und antisense Primers (je 10 pmol) in einem Gesamtvolumen von 25 μl durchgeführt. An eine einleitende Denaturierung (94 °C, 5 min) schlossen sich die drei typischen Reaktionsschritte eines PCR-Reaktionszyklus an: erstens die Denaturierung (94 °C, 30 sec), zweitens das primerspezifische *Annealing* (spezifische *Annealing* Temperatur (T_A) 30 sec) und drittens die Elongation- bzw. Synthesephase (72 °C, 30 sec). In Vorversuchen wurde neben der optimalen T_A die Zyklenzahl, bei der die Reaktion noch im logarithmischen Bereich abläuft, bestimmt. Abschließend wurde die PCR durch eine abschließende fünfminütige Synthesephase bei 72 °C und anschließendes Abkühlen auf 4 °C beendet.

Die Quantifizierung der mRNA-Expression der jeweiligen Gene (Anhang Tabelle 1) erfolgte semi-quantitativ. Parallel wurde in jeder Probe die 18S rRNA Menge bestimmt und die Werte der Zielgene auf den internen 18S rRNA Wert normalisiert. Die amplifizierte DNA wurde in einem 1 % bis 1,5 % (w/v) TAE-Agarosegel mit Ethidiumbromid (Abschnitt 3.9.4.4) aufgetrennt, durch das LAS-3000 *imaging system* visualisiert und mittels des AIDA 3,5 Programms quantifiziert.

3.9.4.3 Primerdesign

Die für die PCR verwendeten Intron überspannenden Primer wurden mittels des NCBI-Primer 3 Programms [Whitehead Institute for Biomedical Research (71)], erzeugt. Alle Primersequenzen, die spezifischen T_A sowie Produktgrößen sind im Anhang Tabelle 1 aufgeführt.

3.9.4.4 Gelelektrophorese

Für die elektrophoretische Trennung der RNA/DNA wurden Mini/Midi-Gel-Elektrophorese-Systeme verwendet. Hierfür wurde 1 bis 2 % (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer (20 mM Eisessig, 40 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) durch Erhitzen gelöst. Nach Abkühlen der Lösung wurde Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,1 µg/ml) zugegeben und die Lösung in einen vorbereiteten Gelträger gegossen. Das ausgehärtete Gel wurde in eine mit 1 x TAE-Puffer gefüllte Gelkammer überführt, die RNA/DNA-Proben mit 0,1 Vol % Probenpuffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0, 50 % (v/v) Glycerol, 0,4 % (v/v) Orange G, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau) gemischt und in den Probenaschen aufgetragen. Zur Bestimmung der Länge der Nukleinsäurefragmente wurde stets ein Größenmarker parallel mit aufgetrennt. Die Trennung der Proben erfolgte bei 8-10 V/cm. Die Gele wurden mittels LAS-3000 *imaging system* visualisiert und konnten mit dem Aida 3,5 Programm densitometrisch ausgewertet werden.

3.10 DNA-Microarray Analyse

Die DNA-Microarray Analysen, unter Verwendung der Affimetrix *GeneChip® Mouse Expression Arrays 430 A*, wurden im Rahmen einer Kooperation mit Herrn Dr. Staeger (Institut für Kinderkrebsforschung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt. Dieser Gen Chip umfasste insgesamt 22691 Gensequenzen der Maus, wobei hiervon rund 14000 gut charakterisierte Gene sind. Bei den verbleibenden 8600 DNA-Sequenzen, den so genannten *expressed sequence tags* (ESTs) handelt es sich um DNA-Sequenzen, denen noch keine Funktion zugeordnet werden konnte, aber angenommen wird, dass sie ein Genbestandteil sind.

Für die Gen Chip-Analysen wurden konfluent unter serumreduzierenden Bedingungen gewachsene und unbehandelte RAGE KO (n = 3) und WT Zellen (n = 5) sowie für 24 Std. mit BL behandelte WT Zellen verwendet. Aus den Zellen wurden, wie in Abschnitt 3.9.1 beschrieben, RNA mit gleichzeitigem DNase Verdau isoliert sowie die Integrität der RNA durch UV-spektrophotometrische Messung und gelelektrophoretische Trennung (Abschnitt 3.9.3) überprüft.

Das sich nun anschließende cDNA-Microarray Verfahren wurde, wie bei Bouras *et al.* beschrieben (72), in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Staeger durchgeführt und ist hier kurz dargestellt:

1. Herstellung und Aufreinigung von ds cDNA aus der isolierten RNA mittels Erststrang- und Zweitstrangsynthese
2. Herstellung von Biotin markierte cRNA aus der ds cDNA durch *in vitro* Transkription
3. Fragmentierung der markierten cRNA durch metallische Hydrolyse
4. Hybridisierung der cRNA auf den Gen-Chips
5. Waschen und Färbung der Gen-Chips mittels Streptavidin-Phycoerythrin und Verstärkung durch den anti-Streptavidin Antikörper
6. Scannen/Vermessung der Gen-Chips (Affymetrix Software Version 4.0)
7. Qualitätskontrolle der Gen-Chips

Für die folgende durchgeführte Qualitätskontrolle und Auswertung der Gen Chips wurden die Daten des zweiten Scannens (anti-Streptavidin Antikörper) verwendet. Die Qualitätskontrollen der Gen-Chips wurden durch die jeweilige erstellten Report Dateien ermöglicht. Hierbei wurden die

Skalierungsfaktoren, die Hintergrundfluoreszenz, das Verhältnis des Anteils zwischen *present*: *absent* Genen sowie die Signalwerte der Hybridisierungskontrollen und der *housekeeping* Gene Aktin und GAPDH berücksichtigt. Der höchste Wert des Skalierungsfaktors unterschied sich vom niedrigsten Wert nur um den Faktor 1,7, was eine gute Vergleichbarkeit der Gen-Chips untereinander ermöglichte. Parallel zeigte sich, dass die Hintergrundfluoreszenzwerte bei allen Gen Chips einen Wert von ~ 50 aufwiesen, was die Vergleichbarkeit der Gen-Chips untereinander erhöht. Bei der Analyse der internen Kontrollen - der *housekeeping* Gene Aktin und GAPDH wurden die Expressionssignale am 3' sowie 5' Ende bestimmt und das Verhältnis 3' zu 5' berechnet. Da die Quotienten alle zwischen 0,95 bis 1,07 lagen, konnte von einer vollständigen cRNA-Synthese ausgegangen werden. Des Weiteren konnten alle Hybridisierungskontrollen, die bei der Analyse verwendet wurden, bei allen Gen Chips als exprimiert detektiert werden, wodurch von einer guten Hybridisierung der fragmentierten cRNA ausgegangen werden kann.

Für die weitere Analyse der Gen-Chipdaten durch das *Microarray Suite 4.0* Auswertprogramm wurden nur die Gene verwendet, die in mindestens einer Gruppe als *present* (exprimiert) bzw. marginal (schwach exprimiert) angegeben wurden. Anschließend wurden die Mittelwerte (MW) der einzelnen Gruppen errechnet:

- MW (WT_{Kontrolle}) vs. MW (RAGE KO_{Kontrolle})
- MW (WT_{Kontrolle}) vs. MW (WT_{BL})

Als different exprimierte Gene wurden nur jene Gene betrachtet, die mindestens eine zweifache Expressionsänderung und eine statistisch signifikante Veränderung von mindestens $P = 0,01$ aufwiesen.

3.11 Protein-Analytik

3.11.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Geweben

Für die Herstellung der Proteinlysate aus dem Herzgewebe wurde $\frac{1}{3}$ der bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Proben verwendet, in Alufolie verpackt und durch wiederholtes Eintauchen in flüssigen N_2 ein vorzeitiges Auftauen verhindert. Nach Zerkleinerung der Proben wurde das pulverisierte Gewebe in 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 250 μl 2 % SDS Lysepuffer (50 mM Tris/HCl, 2 % SDS, 1 mM Na_3VO_4 , 0,1 μM Okadainsäure, 1 x Protease Inhibitor, pH 6,7) und Benzonase (75 U) versetzt, für 20 min bei Raumtemperatur und für weitere 15 min im Ultraschallbad inkubiert, um ein möglichst komplettes Scheren der DNA und ein „schlierenfreies“ Auftragen zu erreichen. Die Proteinlysate wurden bei 10000 x g für 10 min abzentrifugiert und der Proteingehalt aus den Überständen mittels BCA-Methode (Abschnitt 3.11.3) bestimmt. Für die Proteinexpressionsuntersuchungen wurde jeweils eine Proteinkonzentration von 30 μg pro Probe verwendet, wobei diese mit 15 Vol % Probenpuffer (0,01 % Bromphenolblau, 2 % β -Mercaptoethanol, 50 % Glycin) versetzt und für 10 min bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ denaturiert und auf Eis abgekühlt wurde, um anschließend einer gelelektrophoretischen Trennung bzw. dem Dot-Blot Verfahren unterzogen zu werden.

3.11.2 Herstellung von Proteinlysaten aus Zellen

Zur Proteinanalyse von den Zellen wurde das Medium abgesaugt und mit 2 % SDS-Lysepuffer 25 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ für 10 min bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurden die Proben mit Benzonase (85 U) versetzt, weitere 10 min bei Raumtemperatur belassen bzw. für 15 min Ultraschall ausgesetzt (DNA-Verdau). Die hergestellten Zelllysate wurden mit 15 Vol % Probenpuffer versetzt, bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$

für 10 min denaturiert und auf Eis abgekühlt. Von diesen Proteinlysaten wurden zwischen 20-40 µg Protein bei der gelelektrophoretischen Trennung aufgetrennt.

3.11.3 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Bicinchoninsäure (BCA)-Methode (73). Hierfür wurden 10 µl des SDS-Proteinlysates 1:10 mit Lysepuffer verdünnt. Als Eichsubstanz wurde eine BSA-Konzentrationsreihe verwendet. Anschließend wurden 10 µl der Proben in Doppelbestimmung auf eine 96 well Platte aufgetragen und mit je 200 µl des Nachweisreagenzes [49 Teile BCA und 1 Teil Kupfersulfat (4% w/v)] für 30 min bei 37 °C inkubiert. Der Proteingehalt der Proben wurde durch Absorptionsmessung im ELISA-Reader bei 562 nm vermessen und die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben mittels BSA-Eichgerade ermittelt.

3.12 Western-Blot Analyse

Bei der Western-Blot Analyse wurden Proteine nach einer gelelektrophoretischen Trennung auf eine Membran transferiert und einer spezifischen Nachweisreaktion unterzogen, wodurch Aussagen über die vorhandene Menge eines Proteins getroffen werden konnten.

3.12.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine wurde eine SDS-PAGE verwendet. Für die Auftrennung der Proteine wurden die Polyacrylamidgele, in Abhängigkeit der Größe des nachzuweisenden Proteins, wie in Tabelle 3.2 angegeben hergestellt und auf jedem Gel zur Protein-Größenbestimmung ein Proteingrößenstandard aufgetragen. Die Proteine wurden zuerst im Sammelgel (0,125 M Tris / HCl, 0,1 % (w/v) SDS, pH 6,8) unabhängig von ihrer Größe in einer Ebene fokussiert und anschließend im Trenngel (0,38 M Tris / HCl, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,8) ihrer Größe nach bei 120 V für ca. 1,5 - 2 Std. unter Verwendung von 1 x Laufpuffer (24,8 mM Tris, 191,7 mM Glycin, 5,2 mM SDS, pH 8,6) getrennt.

| Proteingrößen | Sammelgel | Trenngel | | |
|-------------------------------|-----------|----------|-------------|----------|
| | | ≥ 40 kDa | 20 - 40 kDa | ≤ 20 kDa |
| | 5% | 10% | 12,5% | 15% |
| 40 % Acrylamid / Bisacrylamid | 0,75 ml | 1,88 ml | 2,35 ml | 2,82 ml |
| Puffer | 0,75 ml | 2,82 ml | 2,82 ml | 2,82 ml |
| Wasser | 2,25 ml | 2,68 ml | 2,2 ml | 1,74 ml |
| 40 % APS | 6,25 µl | 12,5 µl | 12,5 µl | 12,5 µl |
| TEMED | 5 µl | 5 µl | 5 µl | 5 µl |

Tabelle 3.2: Herstellungsrezeptur von Polyacrylamidgelen

3.12.2 Elektrophoretischer Proteintransfer auf eine Nitrocellulose oder PVDF-Membran

Der Transfer der getrennten Proteine auf die proteinbindende Nitrocellulose- bzw. Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran erfolgte nach dem Semi-Dry-Blot Verfahren (74). Hierfür wurden die Membran, das PAGE-Gel sowie vier Filterpapiere mit Transferpuffer (50 mM CAPS, 1 mM 3-Mercaptopropionsäure, 10 % Methanol (v/v), pH 10) befeuchtet und in Form eines Sandwiches (2 Filterpapiere, Gel, Membran, 2 Filterpapiere) zusammengesetzt. Der Transfer erfolgte mit 0,8 mA/cm² für 30 bis 75 min je nach der Größe des zu detektierenden Proteins. Zur Überprüfung des Qualität des Transfer wurde die Membran anschließend mittels Ponceau-Rot [0,1 % (w/v) in 5 % Essigsäure (v/v)] gefärbt und durch sequentielles Waschen mit Wasser die Proteinbanden sichtbar gemacht. Nach Entfärbung der Membran wurde diese für 1 Std. in Blockierungslösung (2 % BSA in 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,2 % NP40, pH 7,5) bei Raum-

temperatur und anschließend mit primärer Antikörperlösung (primärer Antikörper in Blockierungslösung mit 0,03 % NaN_3) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 5 min mit Waschpuffer (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,2 % NP40, 0,5 % BSA, pH 7,5) wurde die Membran mit einem Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper (1:10.000 in Blockierungslösung) für 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach wiederum dreimaligen Waschen der Membran mit Waschpuffer für 5 min wurde diese für 2 min mit fertiger Luminolgebrauchslösung (2,5 mM Luminol, 400 μM p-Cumarsäure, 5,4 mM H_2O_2 in 0,1 M Tris/HCl pH 8,5) bzw. bei schwachen Signalen mit dem ECL Plus Detektionskit inkubiert, mittels LAS-3000 *imaging system* detektiert und durch die Aida 3,5 software densitometrisch analysiert. Um Schwankungen der Proteinbeladung zu relativieren, wurden alle untersuchten Proben auf die Beladungskontrolle Aktin oder GAPDH abgeglichen. In Tabelle 3.3 wurden die primären Antikörper, ihre verwendeten Konzentrationen sowie die zugehörigen Sekundärantikörper angegeben.

| primäre Antikörper | Firma/ Bezug | Verdünnung | sekundärer Antikörper | Größe [kDa] | besondere Merkmale |
|-----------------------------------|--------------------------|------------|-------------------------|-------------|--------------------|
| anti - P - p38 ^{MAPK} | Cell Signaling, Bosten | 1 : 500 | monoklonal (Kanninchen) | 43 | Thr 180/ Tyr 182 |
| anti - P - p42/44 ^{MAPK} | Cell Signaling, Bosten | 1 : 1000 | polykonal (Kanninchen) | 42/44 | Thr 202 /Tyr 204 |
| anti - P - Akt | Cell Signaling, Bosten | 1 : 500 | monoklonal (Kanninchen) | 60 | Ser 473 |
| anti -P - MAPKAPK2 | Cell Signaling, Bosten | 1 : 500 | polykonal (Kanninchen) | 49 | Thr 334 |
| anti - Cu-Zn-Sod | Calbiochem, Darmstadt | 1 : 1000 | polykonal (Schaf) | 16 | |
| anti - Mn-Sod | Upstate, Biomol, Hamburg | 1 : 2000 | polykonal (Kanninchen) | 24 | |
| anti - Ec-Sod | Upstate, Biomol, Hamburg | 1 : 500 | polykonal (Kanninchen) | 35 | |
| anti - EGFP | Abcam, Cambridge | 1 : 2000 | polykonal (Kanninchen) | 27 | |
| anti - Aktin | Sigma, Deisenhofen | 1 : 2000 | monoklonal (Maus) | 43 | |
| anti - GAPDH | Abcam, Cambridge | 1 : 2000 | polyklonal (kanninchen) | 37 | |

Tabelle 3.3: Angabe der für Western-Blot Analysen verwendeten Antikörper

3.12.3 Proteingelfärbung mittels Coomassie-Blau

Die PAGE-Gele wurden mit Coomassie-Blau Färbelösung (5 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Eisessig, 42,5 % (v/v) Ethanol, 42,5 % (v/v) H_2O , 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G250) über Nacht gefärbt und anschließend mit Entfärbelösung (50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Eisessig, 40 % H_2O) entfärbt. Der Farbstoff bildet Chelatkomplexe mit den Proteinen, welche nach dem Entfärben als blaue Banden sichtbar werden.

3.13 Dot-Blot Analyse

Bei dieser Methode wurden die Proteinproben direkt auf die Membran unter Verwendung einer Dot-Blot Apparatur bzw. mittels Pipette (1 μl pro Probe) aufgebracht. Der Nachweis der jeweiligen Proteine erfolgte analog der Vorgehensweise des Western-Blots nach dem elektrophoretischen Proteintransfer (Abschnitt 3.12.2). Die primären Antikörper unter Angabe der verwendeten Verdünnungen sind in Tabelle 3.4 aufgeführt. Die dazugehörigen Sekundärantikörper wurden 1:60.000 verdünnt eingesetzt.

| primäre Antikörper | Firma/ Bezug | Verdünnung | sekundärer Antikörper |
|-------------------------|----------------------------------|------------|------------------------|
| anti - CML | U. Fiess, Universität Tübingen | 1 : 1000 | polyklonal (Kaninchen) |
| anti - Imidazolol | Biologo, Kronshagen | 1 : 1000 | monoklonal (Maus) |
| anti - Arg - Pyrimidin | K. Uchida, Universität Nagoya | 1 : 1000 | monoklonal (Maus) |
| anti - GA - Pyridin | R. Nagai, Universität Kumamoto | 1 : 1000 | monoklonal (Maus) |
| anti - Pentosidin | Biologo, Kronshagen | 1 : 1000 | monoklonal (Maus) |
| anti - "AGE" | R. Schinzel, Vasopharm, Würzburg | 1 : 1000 | polyklonal (Schaf) |
| anti - Malonyldialdehyd | | 1 : 1000 | polyklonal (Kaninchen) |
| anti - GAPDH | Abcam, Cambridge | 1 : 1000 | polyklonal (Kaninchen) |

Tabelle 3.4: Angabe der für Dot-Blot Analysen verwendeten Antikörper

3.14 Analyse der MMP-Aktivität durch Zymographie

Die von Heussen und Dowdle (1980) erstmals beschriebene Methode der Gelatin-Zymographie dient dem direkten Nachweis der Gelatinase-Aktivität von Peptidasen-/Proteinasen wie z.B. MMPs (75). Hierfür wurden Zymographiegele wie Western-Blot Polyacrylamidgele hergestellt (Abschnitt 3.12.1) mit dem Unterschied, dass das 10 % Trenngel final 1,4 mg/ml Gelatine unter entsprechender Reduktion des Wassers enthielt. 30 µl Zellkulturüberstand, in welchen die MMPs hauptsächlich abgegeben werden, wurde unter nichtreduzierenden Bedingungen mit 10 µl Probenpuffer (400 mM Tris/HCl, 20 % (v/v) Glycerol, 5 % SDS (w/v), 0,03 % Bromphenolblau (w/v)) aufgearbeitet und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach schloss sich eine elektrophoretische Trennung (max. 100 V, 4 °C) an. Das Gel wurde dreimal 20 min gewaschen (2,5 % (v/v) Triton X-100 in Bidest), um das im Probenpuffer enthaltene SDS zu entfernen, welches die Proteinasen während der Elektrophorese reversibel hemmt. Das Gel wurde anschließend für 24 Std. bei Raumtemperatur in Zymographie-Puffer (0,15 mM NaCl, 5mM CaCl₂, 50 mM Tris/HCl, 0,05 % NaN₃ (w/v), 0,05 % Brij35(v/v), pH 7,5) inkubiert, welcher durch die Ca²⁺-Ionen die Aktivität der MMPs wieder induzierte. Das Gel wurde danach einer Färbung mit Coomassie-Blue G250 unterzogen, wobei an den proteolytischen Zonen ungefärbte Banden zum blauen Hintergrund auftraten, da die Gelatinspaltprodukte aus dem Gel diffundierten. Die Intensität der Banden unter Verwendung des LAS-3000 *imaging system* wurden detektiert, densitometrisch mittels Aida 3,5 Programm ausgewertet und auf die ermittelte Zellzahl normiert.

3.15 Präkonditionierungsexperimente

Zur Analyse der antioxidativen Wirkung des Brotkrustenextraktes wurde ein Präkonditionierungsexperiment) etabliert (Abb. 3.4A). Die serumreduzierten Zellen wurden für 24 Std. mit der gewählten Brotkrustenextrakt-Fraktion bzw. PBS inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für weitere 24 Std. mit Zelltod induzierenden Verbindungen behandelt und der Zelltodanteil anschließend durch den LDH-Assay oder durchflusszytometrisch mittels PI-Färbung (Abschnitt 3.5.1/2) ermittelt.

Bei den Präkonditionierungsuntersuchungen an primären adulten Rattenkardiomyozyten wurden die Kardiomyozyten für 16 Std. mit der jeweiligen Brotkrusten-Fraktion bzw. PBS inkubiert. Die Zellschädigung erfolgte durch Ischämie/Reperfusion nach einem Protokoll von Jae Sung Kim *et al.* (Abb. 3.4B) (76). Zur Induktion der Ischämie wurden die Zellen mit Krebs-Ringer-HEPES (KRH) Puffer (115 mM NaCl, 5 mM KCL, 1 mM CaCl₂, 1 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄, 25 mM HEPES, pH 6,2) gewaschen und in diesem Puffer für 3 Std. unter sauerstoffarmen Bedingungen (1 % O₂, 37 °C, feuchte Atmosphäre) inkubiert. Die Reperfusion erfolgte nach einmaligem Waschen mit Krebs -Ringer-HEPES Puffer bei physiologischen pH Wert 7,4 mit diesem Puffer unter aeroben Bedingungen (16 % O₂, 37 °C, feuchte Atmosphäre). Der Anteil des Zelltodes wurde durch den LDH-Assay bestimmt (Abschnitt 3.5.2).

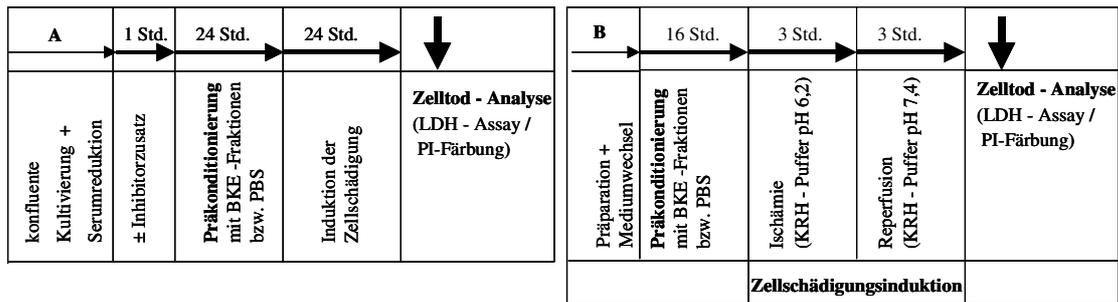


Abb. 3.4: Darstellung des Ablaufes der Präkonditionierungsexperimente an (A) WT-/ RAGE KO Zelllinien und an (B) primären adulten Rattenkardiomyozyten.

3.16 Bestimmung der Transkriptionsfaktor-Aktivität durch den dualen Luciferase-Reportergenassay

Um den Einfluss von unterschiedlichen Agenzien auf die Aktivierung verschiedener *response* Elemente (cis-aktive Enhancer Elemente) in Promotorbereichen und somit die Aktivierung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren bestimmen zu können (Tabelle 3.5), wurde der duale Reporter-genassay modifiziert nach Dyer et al. (77) verwendet.

| Vektor-plasmid | cis - aktives Enhancer Element | Abk.: | Transkriptions-faktoren | beteiligte Signal-transduktionswege |
|----------------|--------------------------------|-------|-------------------------|-------------------------------------|
| pAP1-Luc | Aktivator Protein 1 | AP1 | c-jun/cfos | MAPK, JNK |
| pNF-κB-Luc | nuclear factor of κB cells | NF-κB | NF-κB | MAPK, NF-κB |

Tabelle 3.5: Angabe der verwendeten Vektorplasmide

3.16.1 Herstellung und Transformation kompetenter Zellen

Die verschiedenen Vektorplasmide wurden durch Transformation des *E.coli* Stamms Top10F' vermehrt. Hierfür wurden kompetente *E.coli* Top10F' Zellen mittels der Calciumchlorid-Methode hergestellt (78, 79).

Herstellung kompetenter Zellen: Eine ausreichend in 100 ml LB-Medium bewachsene Hauptkultur (OD₆₀₀ = 0,8) wurde in vorgekühlten 14 ml Röhrchen für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend abzentrifugiert (3.500 x g, 4 °C, 10 min). Das erhaltene Zellsediment wurde mit eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung (1/5 des Ausgangsvolumen) resuspendiert, auf Eis inkubiert und für 10 min, 4 °C, 50 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde erneut in 0,1 M CaCl₂-Lösung (1/25 der Ausgangslösung) resuspendiert und für 2 Std. auf Eis inkubiert. Die erhaltene Zelllösung wurde 1:1 mit eiskalter Glycerin-Lösung (50 %) versetzt, in jeweils 200 µl Portionen aliquotiert, in flüssigem N₂ schockgefroren und bis zur Verwendung bei - 80 °C aufbewahrt.

Transformation kompetenter Zellen: Die zu transformierende Plasmid DNA (0,5 µg) wurde zu den kompetenten *E.coli* Zellen (TOP10F') gegeben und auf Eis für 60 min inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 sec. Nach einminütiger Inkubation auf Eis wurde 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikazusätze zugesetzt und für 30 min bei 37 °C geschüttelt. Danach wurden die transformierten Zellen auf selektiven Agarplatten (Ampicilin 125 µg/ml LB-Medium) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.16.2 Überprüfung und Isolation von Plasmid DNA

Zur Überprüfung, ob das entsprechende Plasmid auch in den einzelnen Kolonien enthalten war, wurden Vorkulturen in 3 ml selektiven LB-Medium angesetzt und über Nacht bei 37 °C geschüttelt.

Anschließend wurde die Plasmid DNA durch Minipräparation mittels alkalischer Lyse und nach anschließender LiCl-Fällung isoliert. Hierfür wurden 1,5 ml der Vorkultur in 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Zellen bei 10.000 x g für 1 min sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 150µl der Lösung I (50 mM Saccharose, 25 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0) kräftig resuspendiert und mit der Lösung II (0,2 M NaOH, 1 % SDS) und Lösung III (3 M Na-Acetat pH 5,2) auf Eis gemischt, um die DNA freizusetzen. Nach zehnminütiger Zentrifugation (10000 x g, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen, mit 1 Vol % Isopropanol versetzt und bei 10000 x g, 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 µl sterilem Wasser aufgenommen, mit 250 µl 5 M LiCl versetzt, für 30 min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert (10 min, 10000 x g). Der Überstand wurde mit 1 ml Ethanol (96 %) versetzt, invertiert, für 5 min auf Eis inkubiert und bei 10000 x g für 5 min zentrifugiert. Das erhaltene Plasmid DNA Pellet wurde mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und nach der Trocknung des Pellets in 50 µl sterilen Wasser aufgenommen. Die Plasmid DNA Lösung wurde mit 1 µl RNase A (10 mg/ml) versetzt, um alle restlichen RNA Rückstände zu entfernen. Die so erhaltene Plasmid DNA wurde durch Verdau mittels Restriktionsendonukleasen überprüft. Für den Restriktionsansatz (20 µl) wurde 1 µg der Plasmid DNA Präparation mit 10 Units der angegebenen Restriktionsendonukleasen (Tabelle 3.6) im zugehörigen Puffer für 1 Std. inkubiert und anschließend gelelektrophoretisch, wie im Abschnitt 3.9.3 beschrieben, aufgetrennt.

| Plasmid | Restriktionsenzyme | Fragmentgrößen [kbp] |
|------------|--------------------|----------------------|
| pAP1-Luc | Sph I, Hind III | 4,3 & 0,7 |
| pNF-κB-Luc | Xba I, Hind III | 3,3 & 1,7 |
| pRL-SV40 | Xba I, Hind III | 2,5 & 1,2 |

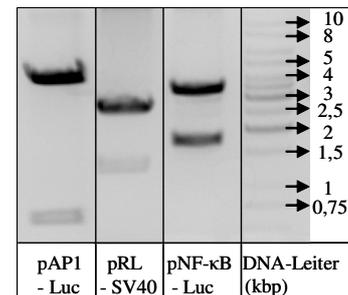


Tabelle 3.6 / Abb. 3.5: Angabe der verwendeten Vektorplasmide/ Restriktionsenzyme und deren Fragmentgrößen, welche durch gelelektrophoretische Auftrennung überprüft wurden.

3.16.3 Isolation von Plasmid DNA mittels Maxi-Präparation

50 µl der Vorkulturen wurden in 100 ml selektiven LB-Medium (125 µg Ampicilin/ml LB-Medium) über Nacht bei 37 °C geschüttelt und die Zellen bei 4500 x g, 4 °C für 15 min sedimentiert. Die Isolation der Plasmid DNA in größeren Mengen erfolgte mittels EndoFree Plasmid Maxi Kit der Firmen Qiagen nach dem Protokoll des Herstellers. Das erhaltene Pellet wurde in sterilem Wasser gelöst. Die Plasmid DNA wurde mittels 0,33 Vol % 3M Na-Acetat pH 5,2 und 2 Vol % Ethanol (96 %) erneut gefällt, bei 10000 x g für 5 min pelletiert und mit 70 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die jeweilige Plasmid DNA in sterilem Wasser aufgenommen und konnte zur Transfektion verwendet werden.

3.16.4 Transfektion der kardialen Fibroblastenzelllinien

Die Transfektionsbedingungen wurden soweit optimiert, dass eine mindestens 40 % Transfektionseffizienz bei den WT Zellen nach subkonfluenter Aussaat erreicht wurde. Für die Transfektion der Zellen wurden verschiedene Transfektionsreagenzien getestet, wobei sich das kationische Lipidreagenz TransFektin als das optimalste Reagenz erwies.

| Transfektionseffizienz [%] | Transfektionsreagenzien | | | |
|------------------------------|-------------------------|--------|-----------|-----------|
| | TransFektin | JetPEI | ExGen500 | Effectene |
| | Biorad | Biomol | Fermentas | Qiagen |
| 1,25 µg Plasmid - DNA (EGFP) | 54 ± 2 | 18 ± 4 | 26 ± 4 | 33 ± 2 |

Tabelle 3.7: Durchflusszytometrische Analyse der Transfizierbarkeit von subkonfluent ausgesäten WT Zellen unter Verwendung von 1,25 µg EGFP Plasmid DNA mit unterschiedlichen Transfektionsreagenzien.

Bei der Transfektion wurden einmal das Transfektionsreagenz (1,25 µl/cm²) sowie die Vektorplasmid-DNA (1,25 µg/cm²) separat in serumfreiem Zellkulturmedium verdünnt, anschließend gemischt und für 20 min bei RT inkubiert, damit sich entsprechende Lipid-DNA Komplexe ausbilden konnten. Nach erfolgtem Mediumwechsel wurde das Transfektionsgemisch direkt zu den Zellen in serumhaltiges Standardmedium pipettiert und kurz geschüttelt. Die Volumenverhältnisse Medium-Transfektionsgemisch wurden den Angaben des Herstellers entsprechend in Abhängigkeit der verwendeten Zellkulturplatten gewählt. Nach 5 bis 6 Std. erfolgte ein Mediumwechsel mit serumhaltigem Standardmedium, wobei die Überprüfung der Transfektionseffizienz nach weiteren 18 Std. erfolgte. Hierfür wurden die WT Zellen unter den angegebenen Bedingungen mit dem EGFP-Kontrollvektorplasmid transfiziert und durchflusszytometrisch im Vergleich zu den untransfizierten Kontrollzellen analysiert (Abb.3.6).

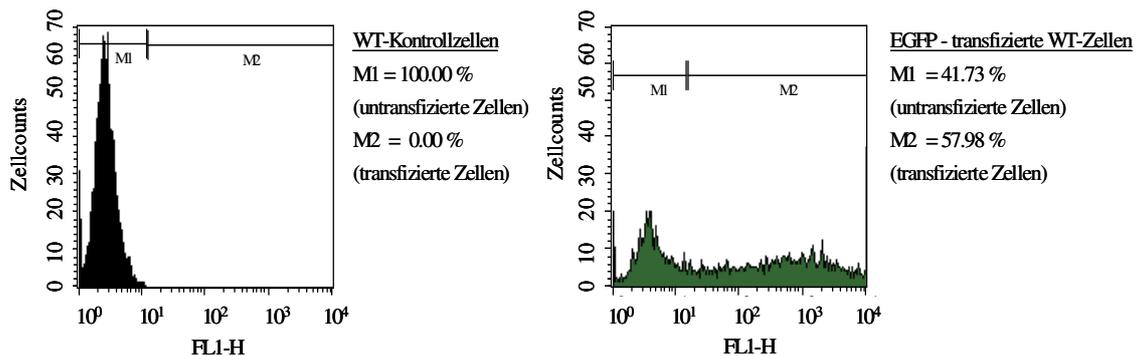


Abb.3.6: Subkonfluente WT Zellen (30000/cm²) wurden mit 1,25 µg/cm² EGFP-Plasmid und 1,25 µl/cm² TransFektin-Lipidreagenz transfiziert und die Transfektionseffizienz nach 24 Std. durchflusszytometrisch im Vergleich zu den untransfizierten Kontrollzellen analysiert.

3.16.5 Dualer Luciferase-Reporterassay

Die für den dualen Luciferase-Reporterassay verwendeten Plasmide (*Pathway Profiling Vector*) enthielten als Reportergen die *firefly* Luciferase [**Luc**]. Vor der Gensequenz des Reportergens befindet sich die gesamte TATA ähnliche Promotorregion des Thymidinkinase-Promotors des Herpes Simplex Virus (HSV-TK) [**P_{TAL}**], der das eigentliche cis-aktive Enhancer Element [**▲**], an welche der jeweilige Transkriptionsfaktor/-komplex binden kann, vorausgeht. Letztlich wird die *firefly* Luciferase des Vektors durch die Bindung des entsprechenden Transkriptionsfaktors bzw.-komplexes an das cis-aktive Enhancer Element induziert und kann luminometrisch gemessen werden (Abb.3.7A). Das kotransfizierte Referenzplasmid pRL-SV40 exprimiert konstitutiv die *renilla* Luciferase (Abb.3.7B), wodurch die ermittelten *firefly* Luciferase Werte mittels der *renilla* Luciferase Werte normiert werden können und dadurch die jeweilige Transfektionseffizienz des Einzelexperimentes berücksichtigt wird.



(Monoradikal)

Das typische ESR-Spektrum des Biradikals ist durch das Auftreten von 9 unterschiedlichen Linien gekennzeichnet (Abb.3.8A), wobei die Linien 4 bis 9 durch die Interaktion der Spins der zwei ungepaarten Elektronen der beiden Nitroxylfragmente entstehen (82). Bei der Bildung des Monoradikals nehmen durch die fehlende Interaktion der Spins der zwei ungepaarten Elektronen der beiden Nitroxylfragmente die Peaks 4 bis 9 ab, wohingegen die Intensitäten der Peaks 1 bis 3 (Abb. 3.8B) deutlich zunehmen.

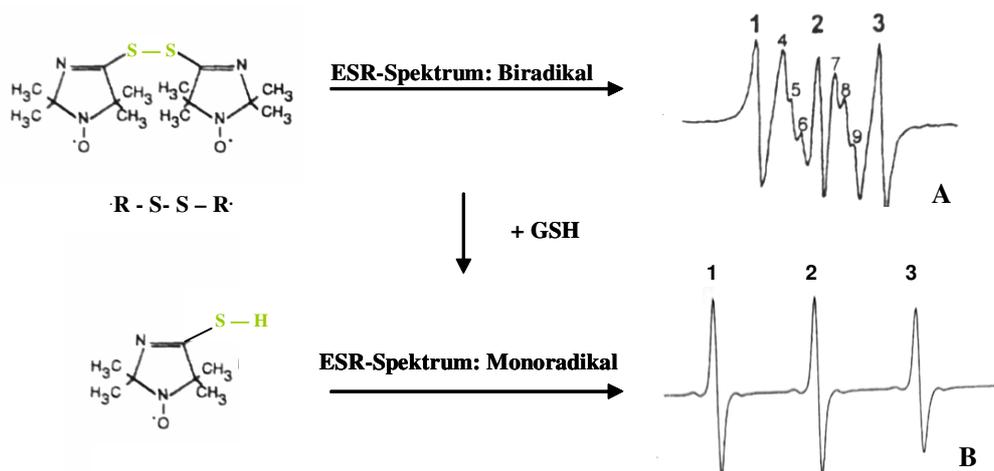


Abb.3.8: Veränderungen des ESR-Spektrums bei der Reaktion des Biradikals (A) mit Glutathion (B). Abbildung A stellt das Spektrum des Biradikals (100 μM) alleine in 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,5) dar, wohingegen Abbildung B ein typisches Spektrum des entstandenen Monoradikals R-SH aus einer Reaktion von GSH und Biradikal darstellt, bei welchem die Intensitäten der Peaks 1,2,3 im Vergleich zum Biradikal zunehmen und die Peakintensitäten 4,5,6,7,8,9 abnehmen oder ganz verschwinden (80).

Die behandelten Zellen wurden nach zweimaligem Waschen mit kaltem PBS abgelöst, zentrifugiert (2500 x g, 5 min), in 50 mM Phosphatpuffer pH 6,8 mit 0,1 % Triton X100 in 70 μl aufgeschlossen und homogenisiert. Nach weiterer Zentrifugation (10000 x g, 5 min) wurden 50 μl Überstand für die GSH-Messung eingesetzt. Aus dem verbleibenden Überstand wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt, um den ermittelten GSH-Gehalt auf die Proteinmenge der jeweiligen Probe normieren zu können. Für die ESR-Messung wurde das Biradikal (100 μM , gelöst in DMSO) in Phosphatpuffer nach Sörensen (66 mM KH_2PO_4 , 66 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 6,8) verdünnt, 50 μl Zelllysat zugesetzt und für 3 min bei RT inkubiert. Die Proben wurden in Einmalmikropipetten unter folgenden Bedingungen im ESR-Spektrophotometer vermessen: Feldmitte: 3365 G, Scanbereich: 100 G, Scandauer: 60 sec, Modulationsamplitude: 1000 mG, Verstärkungsstufe: 50, Power attenuation: 12 dB, Zyklen: 1, Temperatur 24 °C. Der GSH-Gehalt der einzelnen Probe wurde über eine Eichgerade aus der Differenz der Signalintensitäten von Peak 1 des Monoradikals versus des Biradikals (83) bestimmt, wobei über die Peak 1 Intensität (I) des GSH-Spektrums der Abzissenwert unter Abzug des jeweiligen Leerwertes (I_0) ($y = (I - I_0)/I_0$) errechnet wurde. Aus der jeweiligen ermittelten Gleichung der Eichgerade ($y = 0,1067 + 0,0626 \cdot x$) konnte die GSH-Konzentration (x-Wert) ermittelt werden, welcher auf die entsprechende Proteinkonzentration normiert wurde.

3.18 Nachweis der seneszent assoziierten β -Galaktosidase (SA- β Gal)

Ein typischer zellulärer Altersmarker stellt die SA- β Gal dar, die in alten Zellen vermehrt exprimiert wird und mittels einer speziellen X-Gal Färbelösung bei pH 6,0 im Zytoplasma nach der Methode von Campisi *et al.* angefärbt werden kann (84). Bei einer Expression der SA- β Gal spaltet diese das Aglykon 5-Bromo-Chlorindol ab, welches oxidiert wird und im Zytosol blau gefärbte Präzipitate bildet. Die auf Objektträgern in 12 well Kavitäten kultivierten Zellen wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS mit einer speziellen Fixierungslösung (2 % (v/v) Formaldehyd und 0,2 % (v/v) Glutaraldehyd) für 5 min bei RT fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in 2 ml Färbelösung (2,5 mM X-Gal, 40 mM Zitronensäure/Na-Phosphat Puffer, 5 mM $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$, 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl) für 16 Std. bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Färbelösung entfernt und durch PBS ersetzt, um die Zellen zu fotografieren.

3.19 statistische Auswertung

Die Ergebnisse der einzelnen Experimente wurden als arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung (SD)/Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben und als Fehlerbalken in den jeweiligen Diagrammen dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des zweiseitigen heteroskedastischen *Students t-Test* bei Untersuchungen der statistischen Signifikanz zwischen zwei Gruppen (z.B. Kontrollgruppe vs. Behandlungsgruppe). Werte ab $P \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen und mit * gekennzeichnet; Werte von $P \leq 0,01$ wurden mit ** dargestellt. Bei dem Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde ein Anova-Test mittels des Prophet 5.0 Auswerteprogramms durchgeführt und in Diagrammen zusätzlich bei einer Signifikanz ab $P \leq 0,05$ mit # dargestellt bzw. diese Methode gesondert angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung und Charakterisierung von zwei kardialen Fibroblastenzelllinien

4.1.1 Herstellung der murinen kardialen WT- und RAGE KO Zelllinien

Um die potentielle Rolle des RAGE-Rezeptors bei AGE-induzierten zellulären Reaktionen zu analysieren, wurden als *in vitro* Zellkulturmodelle zwei murine kardiale Fibroblastenzelllinien - die Wildtypzelllinie (WT) sowie die RAGE knock out Zelllinie (RAGE KO) unter Verwendung von männlichen C57Bl/6 WT- und C57Bl/6 RAGE KO Mäusen etabliert.

In vorausgehenden Kontrollexperimenten zeigten RT-PCR Analysen, dass der sehr stark in der Lunge exprimierte RAGE Rezeptor nur bei den C57Bl/6 WT Mäusen und nicht bei den RAGE KO Mäusen in der Lunge nachweisbar war. Parallel ließ sich ebenfalls eine Expression des RAGE Rezeptors bei den WT Tieren im Herz mittels RT-PCR nachweisen (Abb 4.1A). Western-Blot Analysen zeigten bei den WT Tieren in der Lunge bei Verwendung des gegen den C-Terminus generierten polyklonalen Antikörpers A905 ein typisches Muster von drei Banden (42-, 54-, 58 kDa), welches in den Lungen der RAGE KO Tiere nicht nachweisbar war. Bei der Western-Blot Analyse der Herzproben der WT Tiere zeigten sich hingegen nur zwei Banden (42-, 54 kDa), die wiederum nicht in den RAGE KO Tieren identifiziert werden konnten und für eine RAGE Expression sprechen. Die RAGE KO Mäuse wiesen hingegen eine GFP-Proteinexpression in beiden getesteten Organen auf, wie dies aufgrund der Herstellung der Tiere, beschrieben durch von Constien *et al.* (85), zu erwarten war (Abb.4.1B).

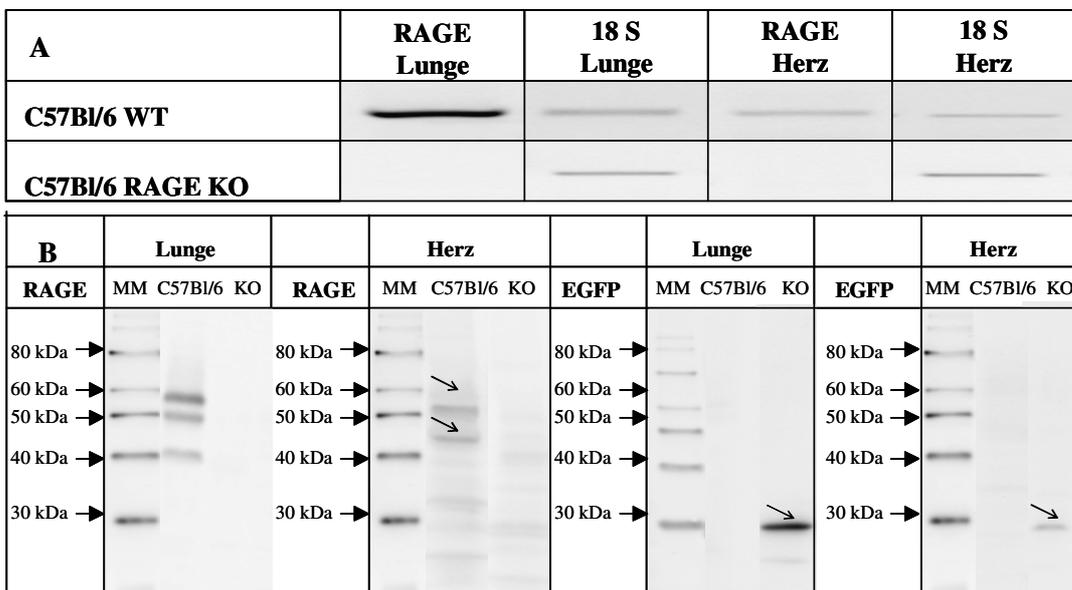


Abb. 4.1A: Nachweis der RAGE-Expression bei den C57Bl/6 WT Mäusen in den Organen der Lunge und des Herzens im Vergleich zu den RAGE KO Mäusen mittels RT-PCR Analyse. **B:** Nachweis der RAGE-Expression mittels Western-Blot Analyse in den Organproben Lunge und Herz der C57Bl/6 WT- und RAGE KO Mäuse.

Die aus den Mausherzen isolierten kardialen Fibroblasten begannen deutlich ab der dritten Passage bei beiden Zelllinien zu altern. Dies wurde durch das Auftreten von zwei Zellkernen pro Zelle, die Zunahme der Zellgröße, einer deutlichen Strukturierung des Zytoplasmas, sinkenden Zellzahlen und der Expression des Seneszenzmarkers SA- β Gal mittels des durch Campisi *et al* etablierten Assays (84) nachgewiesen (Abb.4.2). Die kardialen Fibroblasten wurden anschließend durch die

Alterungskrise kultiviert (WT: Passage 8/9; RAGE KO: Passage: 6/7). Die dabei durch spontane Transformation entstandenen Zelllinien wurden fortwährend in Standardmedium kultiviert.

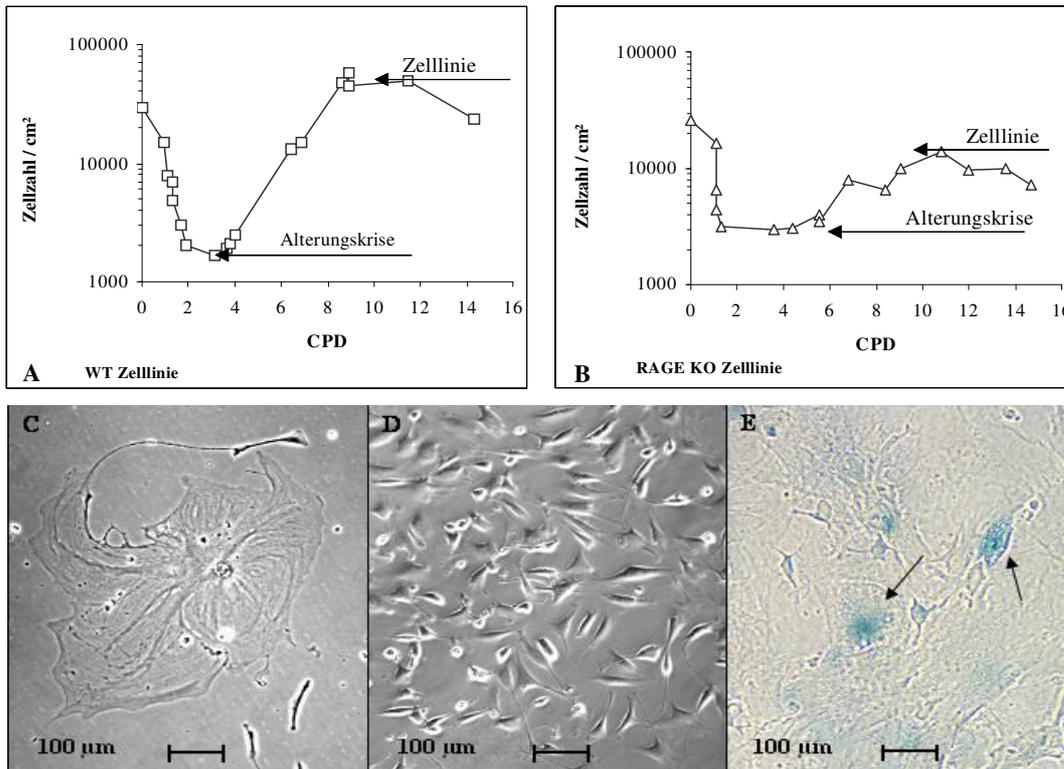


Abb. 4.2: Darstellung der Generierung der Mausfibroblastenzelllinien: (A) Wildtypzelllinie (WT);(B) RAGE knock out Zelllinie (RAGE KO) unter Angabe der Zellzahl/cm² und der kumulativen Populationsverdopplung (CPD) bei einer Passagierung aller 4 Tage mit 10.000 Zellen/cm². (C) Darstellung des Auftretens von binukleären gealterten Fibroblasten im Vergleich zu jungen Zellen (D) sowie SA-β Gal exprimierenden Zellen (E: Markierung durch Pfeil), welche besonders während des Prozesses der Alterungskrise auftraten.

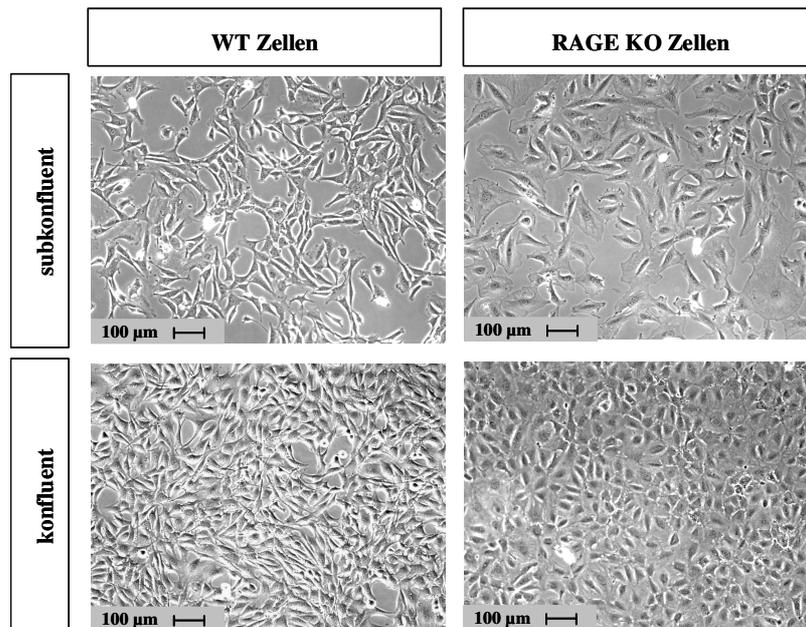


Abb.4.3: Darstellung der WT und RAGE KO Zelllinien im subkonfluenten sowie konfluenten Kultivierungszustand.

4.1.2 Nachweis der Prolyl-4 Hydroxylase (P4H) als Fibroblastenmarker

Um die beiden neu etablierten Zelllinien als Fibroblasten zu verifizieren, wurden mittels RT-PCR die beiden Untereinheiten der P4H (*P4ha*, *P4hb*) nachgewiesen. Dieses Enzym ist hauptsächlich für die Co- und posttranslationelle Hydroxylierung von Prolinresten insbesondere in Kollagenen, die vorwiegend durch Fibroblasten synthetisiert werden, erforderlich. Bei der Analyse des Expressionsniveaus der α - und β Untereinheiten der P4H wurden folgende murine Zellen/Zelllinien verwendet: die etablierte Fibroblastenzelllinie NIH3T3 als Positivkontrolle, die Skelettmuskelzelllinie C2C12, primäre Lymphozyten sowie die epidermale Zelllinie MB49 als Negativkontrollen und die zu analysierenden WT- und RAGE KO Zelllinien. Bei der vergleichenden Analyse der neu etablierten WT- und RAGE KO Fibroblastenzelllinien mit den NIH3T3 Fibroblasten zeigte sich ein vergleichbares mRNA-Expressionsniveau der beiden *P4h*-Untereinheiten, wohingegen bei den anderen Zellen/Zelllinien beide *P4h*-Untereinheiten insbesondere die funktionell aktive *P4ha1* - geringer exprimiert wurden.

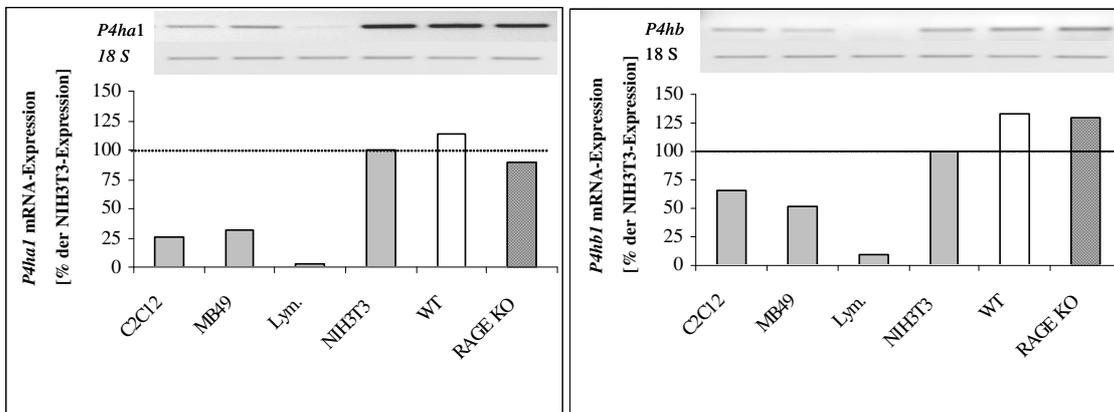


Abb. 4.4: Nachweis des fibroblastoiden Zelltypes beider Zelllinien. Durch RT-PCR Analyse der P4H in verschiedenen murinen Zelltypen konnte nachgewiesen werden, dass zwei Fibroblastenzelllinien generiert wurden, wobei die NIH3T3 Zellen als etablierte Fibroblastenzelllinie und Positivkontrolle (Expressionslevel = 100 %) dienen. Hierfür wurde RNA aus den jeweils konfluenten Zellen isoliert und per RT-PCR die Expression der *P4ha1*- und der *P4hb* Untereinheit bestimmt und auf 18 S rRNA normiert. Die originalen RT-PCR Banden sind oberhalb der Graphen abgebildet.

4.1.3 Charakterisierung der etablierten Zelllinien

Rezeptorexpression der beiden Zelllinien: Zur weiteren Charakterisierung der Zelllinien wurde die Expression von bekannten AGE-Rezeptoren mittels RT-PCR analysiert. Hierbei konnte eine *Rage* Expression bei der WT Zelllinie im Gegensatz zur RAGE KO Zelllinie (40 Zyklen) nachgewiesen werden. Fortführend zeigte sich, dass beide Zelllinien weitere AGE-Rezeptoren wie *Age-r1*, *Age-r2*, *Age-r3* und *Srb1* exprimierten. Dabei wiesen sie jedoch Unterschiede im jeweilig exprimierten Grundniveau auf. Die WT Zelllinie verfügte neben einer Expression von RAGE über eine deutlich höhere Expression des *Srb1* Rezeptors. Dem gegenüber wies die RAGE KO Zelllinie ein moderat vermehrtes mRNA-Expressionsniveau der Rezeptoren *Age-r1* und *Age-r3* im Vergleich zur WT Zelllinie auf. Das *Age-r2* mRNA-Expressionsniveau beider Zelllinien war vergleichbar.

| RT-PCR | <i>Srb-1</i> | <i>Age-r1</i> | <i>Age-r2</i> | <i>Age-r3</i> | <i>Rage</i> | <i>18S</i> |
|-------------------|--------------|---------------|---------------|---------------|-------------|------------|
| WT Zelllinie | | | | | | |
| RAGE KO Zelllinie | | | | | | |

| | <i>Age-r1</i> | <i>Age-r2</i> | <i>Age-r3</i> | <i>Srb-1</i> |
|-------------------|---------------|---------------|---------------|--------------|
| WT Zelllinie | 100 ± 14 | 100 ± 4 | 100 ± 2 | 100 ± 8 |
| RAGE KO Zelllinie | 142 ± 9 ** | 87 ± 8 | 163 ± 11 ** | 22 ± 5 ** |

Abb. 4.5/ Tabelle 4.1: Expression von potentiell advanced glycation endproduct bindenden Rezeptoren in beiden kardialen Fibroblastenzelllinien Aus konfluenten für 48 Std. unter Serumreduktion kultivierten WT-, RAGE KO Zellen wurde RNA isoliert. Die aufgelisteten Gene wurden durch RT-PCR Analyse quantifiziert, auf 18 S rRNA bezogen und die WT Zellen wurden auf 100 % normiert ($MW_{\text{aller Experimente}} \pm \text{SEM}$; n = 3; **P ≤ 0,01 WT- vs. RAGE KO Zelllinie).

Wachstumseigenschaften beider Zelllinien: Charakteristische Eigenschaften der Zelllinien wie die Verdopplungszeit in der logarithmischen Wachstumsphase (von Tag eins bis drei (PDT 1-3)), der Zelldurchmesser (µm) und das Zellvolumen (fl) wurden anhand von Wachstumskurven mittels des Zellmessgerätes analysiert und sind in Abb. 4.6 und Tabelle 4.2 dargestellt. Die RAGE KO Zellen zeichneten sich hierbei durch eine deutlich höhere PDT und ein somit signifikant langsames Wachstum in der logarithmischen Wachstumsphase im Vergleich zu den WT Zellen aus. Sie erreichten weiterhin eine geringere Endzellzahldichte im konfluenten Zustand als die WT Zelllinie, was durch ihr größeres zelluläres Volumen und die dadurch eingenommene Fläche erklärbar ist.

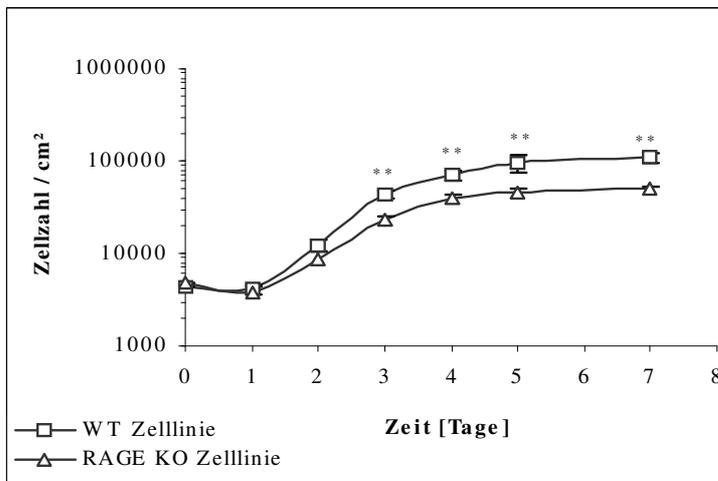


Abb. 4.6: Darstellung der Wachstumskinetiken der WT- und RAGE KO Zellen.

Die Zellen wurden hierfür in Standardmedium kultiviert und die Zellzahl mittels Zellmessgerät zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt. Die Analysen wurden in mehr als drei voneinander unabhängigen Experimenten verifiziert ($MW_{\text{aller Experimente}} \pm \text{SEM}$; **P ≤ 0,01).

| zelluläre Eigenschaften | | WT Zellen | RAGE KO Zellen | P |
|--------------------------|----|-------------|----------------|---------|
| PDT 1. bis 3. Tag (Std.) | | 14 | 19 | < 0,001 |
| subkonfluent | fl | 2867 ± 73 | 3604 ± 297 | < 0,001 |
| (Tag 3) | µm | 17,6 ± 0,13 | 18,90 ± 0,55 | < 0,001 |
| konfluent | fl | 1976 ± 111 | 2993 ± 187 | < 0,001 |
| (Tag 7) | µm | 15,6 ± 0,29 | 17,8 ± 0,45 | < 0,001 |

Tabelle 4.2: Zellcharakterisierung der WT- und RAGE KO Zellen.

Von den in Standardmedium kultivierten Zellen wurden mittels Zellmessgerät der Zelldurchmesser (µm), das Zellvolumen (fl) sowie die PDT unter Berücksichtigung der Zellzahl bestimmt. Die Analysen wurden in mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten verifiziert ($MW_{\text{aller Experimente}} \pm \text{SEM}$; P ≤ 0,01).

4.1.4 Vergleich der WT- und RAGE KO Zelllinien durch cDNA-Microarray Analyse

Zellen liegen in Geweben als ruhende Zellen vor, die nicht direkt mit den im Blutplasma vorkommenden Faktoren in Verbindung stehen. Zur Charakterisierung mittels cDNA-Microarray Analysen wurden daher konfluente nicht proliferierende und serumreduzierte WT (n=5) - und

RAGE KO Zellen (n=3) verwendet. Zur Erlangung aussagekräftiger Ergebnisse wurden nur Gensequenzen weiter analysiert, die folgende Auswahlkriterien erfüllten:

- Die ermittelten Expressionswerte mussten als *present* (exprimiert) durch das *Microarray* Auswerteprogramm angegeben werden sein.
- Zwischen den beiden Zelllinien (WT vs. RAGE KO) musste eine mindestens zweifache Expressionsveränderung existieren.
- Die statistische Veränderung bei differentiell exprimierten Gensequenzen musste eine Signifikanz von $P \leq 0,0001$ erfüllen, um als hochsignifikant angesehen zu werden und Zufallsbefunde auszuschließen.

Durch Anwendung dieser Analyse Kriterien wiesen von den 22691 auf dem Chip existenten Gensequenzen 225 Sequenzen eine veränderte Expression auf, von welchen 81 mit einer unbekanntem und 144 Gensequenzen mit einer bekannten Genfunktion assoziiert werden konnten (Abb.4.7). Von den 144 bekannten Gensequenzen waren bei dem Vergleich WT vs. RAGE KO 68 Gensequenzen (60 Gene) bei dem WT erhöht bzw. 76 Gensequenzen (74 Gene) erniedrigt.

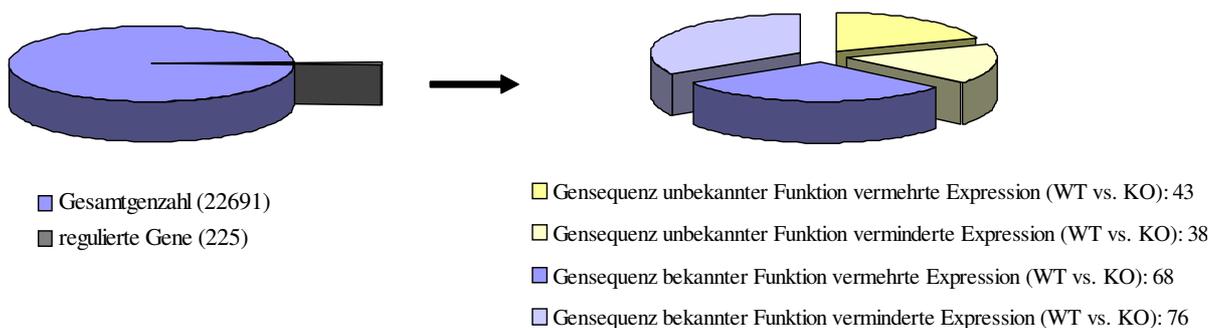


Abb. 4.7: Darstellung der veränderten Genexpression zwischen WT- und RAGE KO Zelllinien, ausgewertet mittels *Microarray Suite 4.0* Auswerteprogramm und MS Excel.

Zur detaillierten Analyse wurden die bekannten regulierten Gene unter Verwendung der Datenbank *NCBI OMIM* sowie *NCBI Nucleotide* bestimmten Klassifizierungsgruppen (EZM, Zytoskelett & Zelladhäsion, WF & Zytokine & Chemokine, Rezeptoren, Transkription & Translation, Signaltransduktionskaskaden, Zellzyklus & Apoptose, Metabolismus, ROS- & Inflammation assoziierte Gene) zugeordnet. Dabei konnte ein Gen auch mehrmals in verschiedenen Gruppen vorkommen. In Abb. 4.8 ist eine Zusammenfassung der Genklassifikation dargestellt, wobei eine besonders gehäufte differentielle Regulation bei der Transkription & Translation (13 %), den Signaltransduktionskaskaden (19 %), dem Metabolismus (16 %) und den mit Zellzyklus und Apoptose assoziierten Genen (12 %) auffiel.

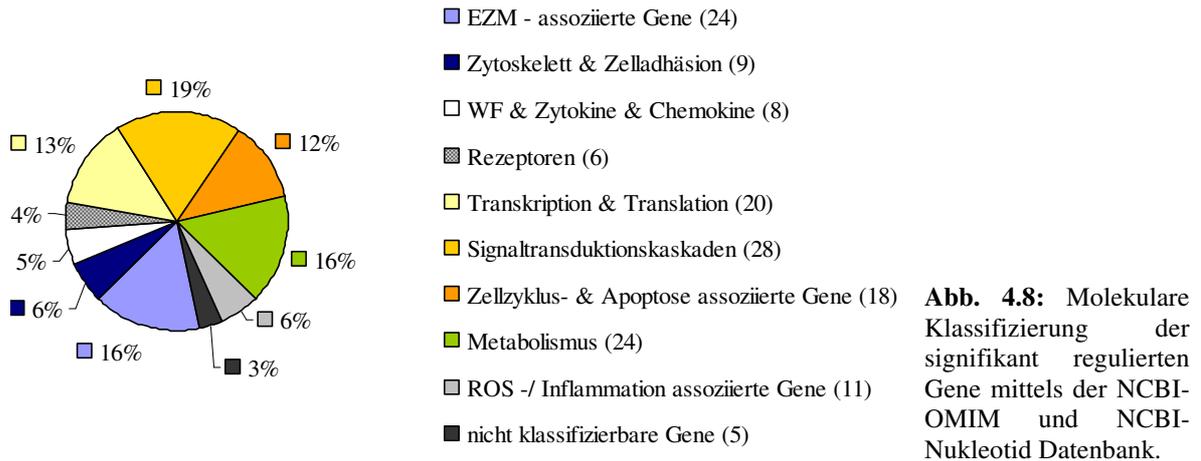


Abb. 4.8: Molekulare Klassifizierung der signifikant regulierten Gene mittels der NCBI-OMIM und NCBI-Nukleotid Datenbank.

Betrachtet man die am Prozess der Zellproliferation und Apoptose beteiligten Gene einschließlich der hierbei beteiligten Wachstums (WF)-, Transkriptionsfaktoren und Signaltransduktionskomponenten, so zeigt sich die Tendenz, dass bei den WT- im Vergleich zu den RAGE KO Zellen jene Gene vermehrt exprimiert wurden, die zu einer gesteigerten Proliferation beitragen könnten (Tabelle 4.3). Dabei spielen besonders die Gene *Gas1* und *Adm* eine Rolle. Eine stark vermehrte *Gas1*-Expression (bei den RAGE KO Zellen auftretend) wurde mit einer Wachstumsverminderung/-arretierung und morphologischen Veränderungen bei NIH3T3 Fibroblastenzelllinien beschrieben (86). Des Weiteren wiesen die WT Zellen eine höhere Expression zahlreicher Wachstumsfaktoren (*Igf2*, *Figf*, *Pdgfc*) im Vergleich zu den RAGE KO Zellen auf. Diese Unterschiede (Tabelle 4.3) könnten eine Erklärung für das differente Wachstumsverhalten der beiden Zelllinien darstellen.

| Genname | Kurzform Genname | Genbank Nummer | rel.FE WT ± STABW | rel.FE RAGE KO ± STABW | Änderung der Genexpression: WT / RAGE KO | Proliferation Wachstum | Apoptose |
|--|------------------|----------------|-------------------|------------------------|--|------------------------|----------|
| Gene, assoziiert mit proliferativen Eigenschaften | | | | | | | |
| insulin-like growth factor 2 | <i>Igf2</i> | NM_010514 | 6056 ± 554 | <100 (absent) | fehlende Expression (RAGE KO) | ↑ | ↓ |
| c-fos induced growth factor | <i>Figf</i> | NM_010216 | 12391 ± 1123 | 4518 ± 326 | 2,7 | ↑ | |
| apoptosis inhibitor 1 | <i>birc2</i> | NM_007465 | 642 ± 42 | 170 ± 17 | 3,8 | | ↓ |
| guanine nucleotide binding protein, alpha 12 | <i>Gna12</i> | NM_010302 | 832 ± 100 | 288 ± 41 | 2,9 | | |
| platelet-derived growth factor, C polypeptide | <i>Pdgfc</i> | NM_019971 | 952 ± 121 | 176 ± 45 | 5,4 | ↑ | |
| spindlin | <i>Spin</i> | NM_011462 | 1001 ± 74 | 483 ± 57 | 2,1 | ↑ | |
| cell division cycle 2 homolog A | <i>Cdc2a</i> | NM_007659 | 518 ± 44 | 1039 ± 15 | 0,5 | | |
| secretogranin II | <i>Scg2</i> | NM_009129 | <100 (absent) | 174 ± 8 | fehlende Expression (WT) | ↑ | ↓ |
| cysteine rich protein 61 | <i>Cyr61</i> | NM_010516 | 1599 ± 361 | 4142 ± 240 | 0,4 | ↑ | |
| inhibitor of DNA binding 4 | <i>Idb4</i> | NM_031166 | <100 (absent) | 465 ± 19 | fehlende Expression (WT) | ↑ | |
| preproendothelin-1 | <i>Edn1</i> | NM_010104 | 183 ± 79 | 1376 ± 80 | 0,1 | ↑ | |
| Gene, assoziiert mit antiproliferativen Eigenschaften | | | | | | | |
| receptor (calcitonin) activity modifying protein 2 | <i>Ramp2</i> | NM_019444 | 3044 ± 570 | 8091 ± 228 | 0,4 | ↓ | ↓ |
| glypican 3 | <i>Gpc3</i> | NM_016697 | <100 (absent) | 1938 ± 38 | fehlende Expression (WT) | | |
| sphingomyelin phosphodiesterase 3, neutral | <i>Smpd3</i> | NM_021491 | <100 (absent) | 631 ± 3 | fehlende Expression (WT) | ↓ | ↑ |
| novel ras effector 1 | <i>Nore1</i> | NM_018450 | <100 (absent) | 273 ± 10 | fehlende Expression (WT) | ↓ | |
| adrenomedullin | <i>Adm</i> | NM_009627 | 150 ± 63 | 740 ± 32 | 0,2 | ↓ | |
| N-myc downstream regulated 1 | <i>Ndr1</i> | NM_145602 | 548 ± 82 | 1957 ± 56 | 0,3 | ↓ | |
| embryonic epithelial gene 1 | <i>Eeg1</i> | NM_021398 | 582 ± 89 | 1274 ± 55 | 0,5 | ↓ | |
| sprouty homolog 2 (Drosophila) | <i>Spry2</i> | NM_011897 | 1063 ± 135 | 2223 ± 50 | 0,5 | ↓ | |
| growth arrest specific 1 | <i>Gas1</i> | NM_008086 | 3234 ± 581 | 9593 ± 607 | 0,3 | ↓ | |
| pEL98 protein | <i>S100a4</i> | NM_011311 | 4207 ± 1420 | 16650 ± 1005 | 0,3 | ↓ | |
| death associated protein kinase 1 | <i>Dapk1</i> | NM_029653 | 925 ± 128 | 185 ± 33 | 5,0 | ↓ | ↑ |
| phosphatase and tensin homolog | <i>Pten</i> | NM_008960 | 2726 ± 262 | 1090 ± 45 | 2,5 | ↓ | |
| differential display and activated by p53 | <i>Dda3</i> | NM_019976 | 1626 ± 100 | 677 ± 15 | 2,4 | | ↑ |
| leucine-rich and death domain containing | <i>Lrdd</i> | NM_022654 | 346 ± 33 | 136 ± 18 | 2,5 | ↓ | ↑ |

Tabelle 4.3: Darstellung der am Prozess der Zellproliferation und Apoptose beteiligten Gene der WT- und RAGE KO Zellen. Der angegebene Einfluss des jeweiligen Genes auf den Wachstumsprozess sowie die Apoptose wurde in Bezug auf eine hohe Genexpression angegeben. Die Änderung der jeweiligen Genexpression wurde wie folgt berechnet: relative Fluoreszenzeinheiten (rel. FE) des WT / rel. FE des RAGE KO. Der Faktor 2 spricht z.B. für eine doppelt so hohe Genexpression des WTs im Vergleich zu den RAGE KO Zellen, wohingegen der Faktor 0,5 eine um die Hälfte verminderte Genexpression des WTs im Vergleich zu den RAGE KO Zellen angibt. Referenzen zu den einzelnen Genen wurden im Anhang aufgeführt.

4.2 Analyse des Einflusses der Nahrungsmittel-AGE Extrakte auf kardiale Fibroblasten

4.2.1 Analyse der in den Nahrungsmittlextrakten enthaltenen AGE-Modifikationen

Zur Analyse des Einflusses und der Wirkungen von Nahrungsmittel-AGEs auf die Aktivierung kardialer Fibroblasten standen Extrakte der Brotkruste und des entkoffeinierten Kaffees (Kooperation: Frau PD Dr. Somoza, Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching) zur Verfügung. Aus dem Brotkrustenextrakt wurden zwei Fraktionen hergestellt, die sich hinsichtlich der Zentrifugationsschritte der in HBSS und mit Ultraschall behandelten Brotkrustensuspension unterschieden (siehe Methoden 3.1.2).

In einer ersten Analyse (Abb. 4.9A) wurden unter Verwendung von modifikationspezifischen [Arginin-Pyrimidin (Arg-Pyr), 3-Hydroxy-4hydroxymethyl-1-(5-amino-5-carboxypentyl)pyridinium (GA-Pyr), N ϵ -carboxymethyllysin (CML), Pentosidin, 3-Deoxyglucoson (DG) Imidazolon] sowie modifikationsunspezifischen anti-AGE Antikörpern (S006593) die Lebensmittlextrakte nach ihren AGE-Gehalten charakterisiert. Die Konzentrationen der Arg-Pyr Modifikation und bei Einsatz des S006593 Antikörpers war in beiden Brotkrustenfraktionen vergleichbar und in Bezug auf den Kaffeeextrakt erhöht. Das Kaffeeextrakt enthielt allerdings mehr CML als die Brotkrustenfraktionen. Eindeutige Unterschiede zwischen beiden Extrakten zeigten sich bei dem Vergleich der anti-AGE Modifikation GA-Pyr nicht. Die beiden AGE-Modifikationen Pentosidin und 3DG-Imidazolon waren nur in den beiden Brotkrustenfraktionen, jedoch nicht im Kaffeeextrakt nachweisbar. Zusätzlich wurde das Lipidperoxidationsprodukt Malonyldialdehyd (MDA) in höheren Konzentrationen im KE nachgewiesen (Abb. 4.9B).

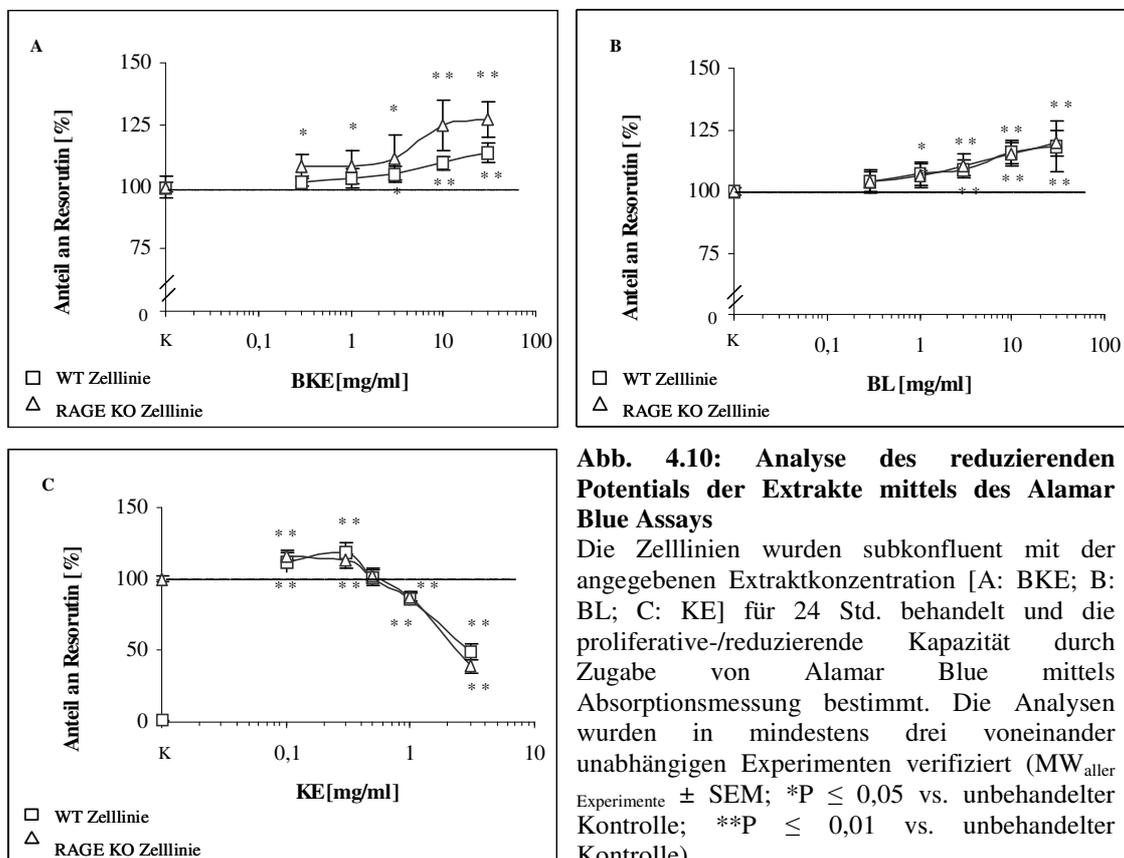
| A | BKE (mg) | | | | BL (relative Einheit) | | | | KE (mg) | | | |
|------------------------|----------|-----|------|------|-----------------------|-----|------|------|---------|-----|------|------|
| AGE-Modifikationen | 5 | 2,5 | 1,25 | 0,63 | 5 | 2,5 | 1,25 | 0,63 | 1 | 0,5 | 0,25 | 0,13 |
| anti - Arg - Pyrimidin | | | | | | | | | | | | |
| anti - GA - Pyridin | | | | | | | | | | | | |
| anti - CML | | | | | | | | | | | | |
| anti - "AGE" | | | | | | | | | | | | |
| anti - Pentosidin | | | | | | | | | | | | |
| anti - 3-DG Imidazolon | | | | | | | | | | | | |

| B | BKE (mg) | | | BL (rel. Einheit) | | | KE (mg) | | |
|---------------------------|----------|-----|------|-------------------|-----|------|---------|-----|------|
| Lipidperoxidationsprodukt | 5 | 2,5 | 1,25 | 5 | 2,5 | 1,25 | 1 | 0,5 | 0,25 |
| anti - MDA | | | | | | | | | |

Abb. 4.9: Nachweis von AGE-Modifikationen sowie von dem Lipidperoxidationsprodukt MDA in den Nahrungsmittlextrakten Verschiedene AGE-Modifikationen des Brotkrusten- sowie Kaffeeextraktes wurden unter Verwendung von anti-AGE Antikörpern (A) sowie des MDA-Antikörpers (B) durch Dot-Blot Analysen nachgewiesen, wobei die Analysen in drei voneinander unabhängigen Versuchen verifiziert wurden.

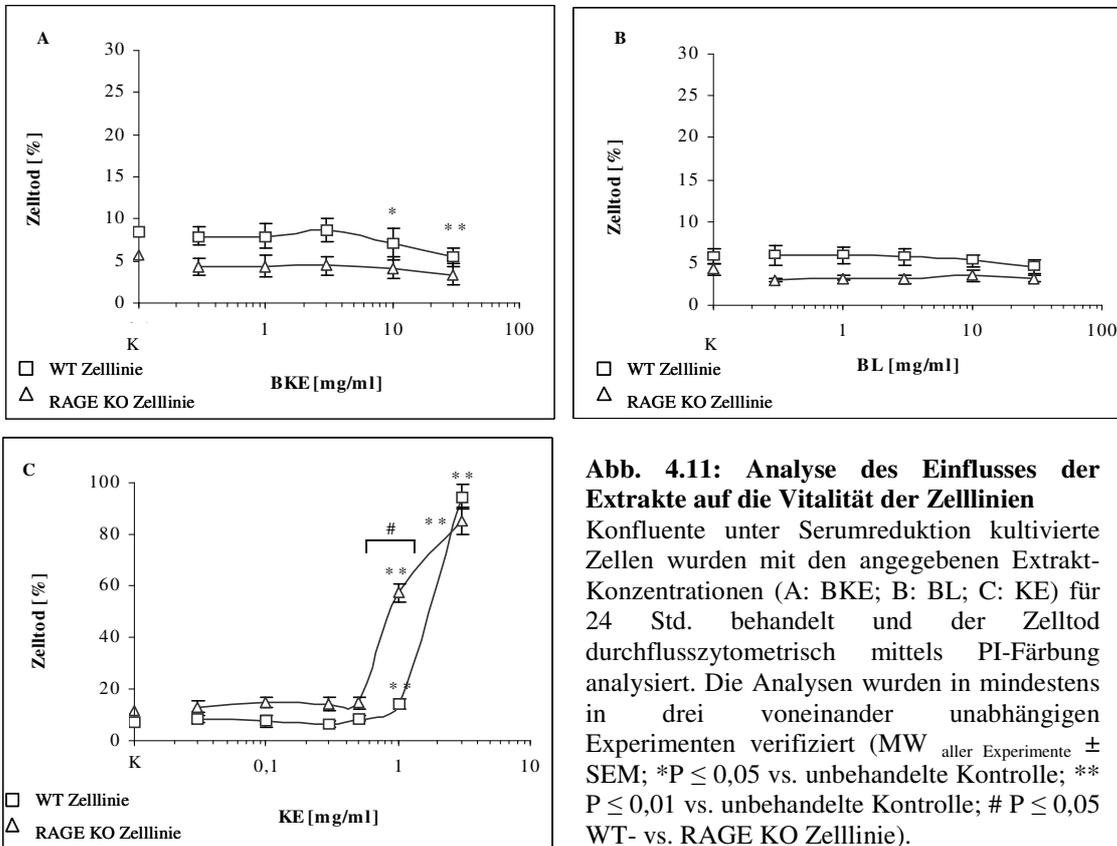
4.2.2 Analyse des Einflusses der Nahrungsmittel-AGE Extrakte auf die zelluläre Proliferation und Vitalität

Proliferationsanalysen und Bestimmung des reduzierenden Potentials der Zellen: Der Alamar Blue Assay (Resorutin-Bildung) bestimmt das reduzierende Potential von Zellen, welches in vielen Fällen mit der vorhandenen Zellzahl korreliert. Das Proliferationsvermögen der Zellen unter Nahrungsmittel-AGE Extrakt Behandlung wurde mittels dieses Tests bestimmt. Die subkonfluenten kardialen Fibroblastenzelllinien wiesen nach 24 Std. BKE/BL-Behandlung im Konzentrationsbereich von 3 bis 30 mg/ml eine signifikant erhöhte Resorutin-Bildung auf. Analysen der KE-Behandlung der kardialen Fibroblasten zeigten hingegen, dass die Umsetzung des Farbstoffes im Vergleich zu den Kontrollzellen bei Konzentrationen unter 0,5 mg/ml signifikant erhöht und bei Konzentrationen ab 1 mg/ml signifikant vermindert war. Letzterer Effekt könnte für eine verminderte Vitalität der Zellen sprechen. Eindeutige RAGE abhängige Unterschiede hinsichtlich des reduzierenden/proliferativen Potentials wurde nicht festgestellt.



Zelltodanalysen: Die mittels PI-Färbung an konfluenten, unter Serumreduktion kultivierten Zellen durchgeführten Untersuchungen sollten klären, ob die AGE-reichen Nahrungsmittel-extrakte eine toxische Wirkung über einen Versuchszeitraum von 24 Std. induzierten. Anhand Abb. 4.11 lässt sich erkennen, dass das Brotkrustenextrakt bei keiner der verwendeten Fraktionen (BKE, BL) und Konzentrationen zu einer Beeinträchtigung der Vitalität beider Zelllinien führte. Bei der BKE-Behandlung der WT Zellen zeigte sich bei Konzentrationen von 10 bis 30 mg/ml eine eher verbesserte Vitalität. Das Kaffeeextrakt hingegen führte ab einer Konzentrationen von 1 mg/ml bei beiden Zelllinien zu einem signifikant vermehrten Zelltod, wobei durch mikroskopische

Betrachtungen bei 3 mg/ml der Hauptteil der Zellen im Zellkulturüberstand auftrat. Zudem konnte gezeigt werden, dass die RAGE KO Zellen bei einer Konzentration von 1 mg/ml deutlich empfindlicher als die WT Zellen reagierten. Aufgrund dieser Daten wurden für weitere Analysen hauptsächlich 10 mg/ml der Brotkrustenfraktionen sowie Konzentrationen unterhalb von 1 mg/ml des Kaffeeextraktes verwendet.



Zellzahlbestimmungen: Die Bestimmung des Proliferationsvermögens der Zellen durch Alamar Blue (Abb. 4.10) muss nicht zwingend mit der existierenden Zellzahl übereinstimmen. Vielmehr kann auch eine vermehrte Umsetzung des Farbstoffes nur für eine Aktivierung der Zellen sprechen ohne in einer vermehrten Zellzahl zu resultieren. Weiterführende Zellzählungsanalysen sollten deshalb zeigen, ob die verschiedenen AGE-reichen Extrakte zu einer Wachstumsproliferation bzw. Wachstumsarretierung führen. Die BKE/BL-Behandlung der zu Beginn subkonfluenten Zellen führte nur bei den WT Zellen zum Erreichen einer erhöhten Endzellzahldichte nach sieben Tagen. Die verwendeten nicht toxischen KE-Konzentrationen von 0,3 und 0,5 mg/ml (PI-Analyse) hingegen inhibierten das Zellwachstum im Vergleich zu den Kontrollzellen bei beiden Zelllinien. Die WT Zellen proliferierten unter dieser KE-Behandlung langsamer, wohingegen bei den RAGE KO Zellen die Zellzahl nach sieben Tagen sogar unter die Ausgangszellzahl von 5000/cm² sank. Dies weist wiederum auf eine erhöhte Empfindlichkeit der RAGE KO Zellen gegenüber diesem Extrakt hin.

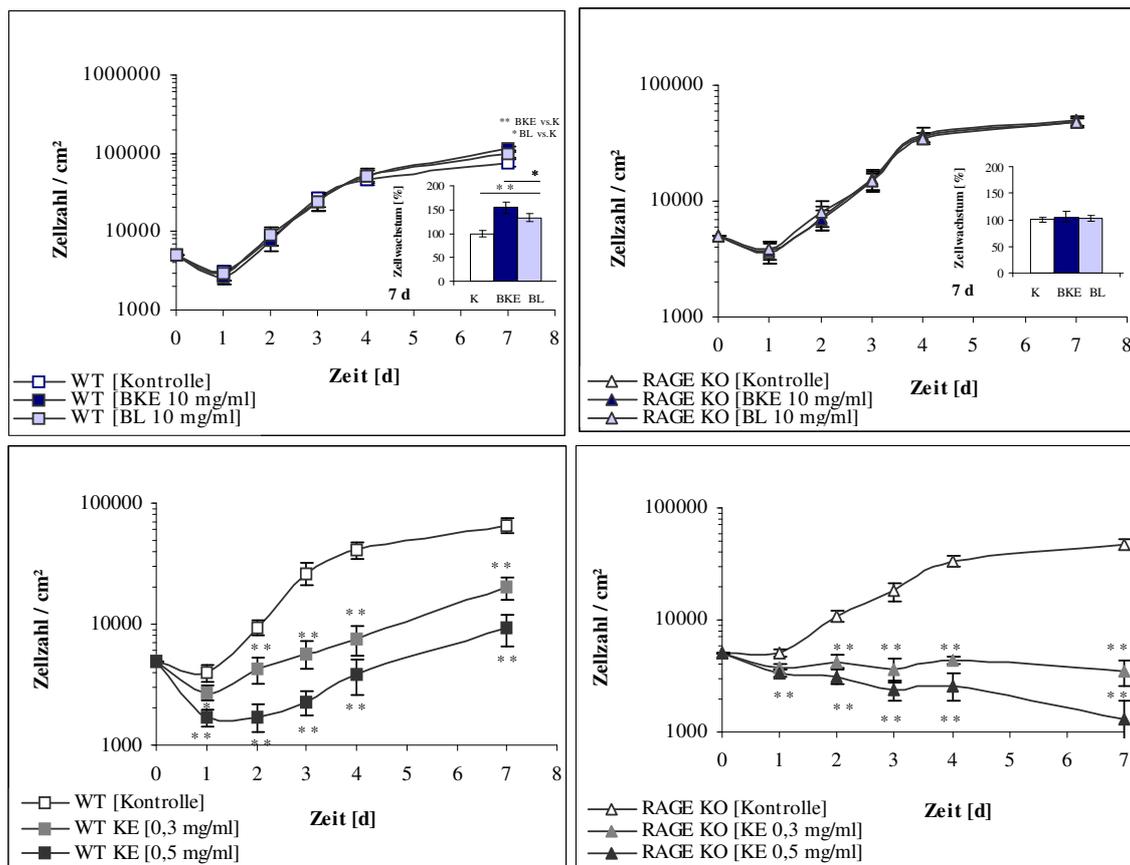


Abb. 4.12: Wachstumskinetiken der WT- und RAGE KO Zellen bei Nahrungsmittel-extrakt-Behandlung. Die beiden Zelllinien wurden mit einer Zellzahl von 5000/cm² ausgesät und nach 5 Std. mit den verschiedenen Nahrungsmittel-AGE Extrakten für die angegebenen Tage unter Standardbedingungen kultiviert. Die Zellzahl wurde mittels Zellmessgerät bestimmt. Die Analysen wurden in drei bis acht voneinander unabhängigen Experimenten verifiziert ($MW_{\text{aller Experimente}} \pm \text{SEM}$; * $P \leq 0,05$ vs. Kontrolle; ** $P \leq 0,01$ vs. Kontrolle).

Zellzyklusanalysen: Parallele Analysen des Zellzykluses ergaben, dass bei einer Behandlung der subkonfluenten WT Zellen mit den beiden Brotkrustenextrakt-Fractionen (BKE; BL) nach vier Tagen signifikant mehr Zellen in der S-Phase auftraten, wohingegen die Zellzahl in der G1-Phase abnahm. Dieser Effekt konnte bei den RAGE KO Zellen nicht gefunden werden.

Eine KE-Behandlung beider Zelllinien führte konzentrationsabhängig bereits nach 48 Std. zu einer deutlichen und signifikanten Erhöhung der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus bei gleichzeitiger Abnahme des Anteils der Zellen in der proliferativen S-Phase. Diese Ergebnisse stimmen mit der moderat erhöhte Zellzahl der WT Zellen durch BKE/BL-Behandlung sowie den durch KE induzierten Wachstumsstopp beider Zelllinien überein.

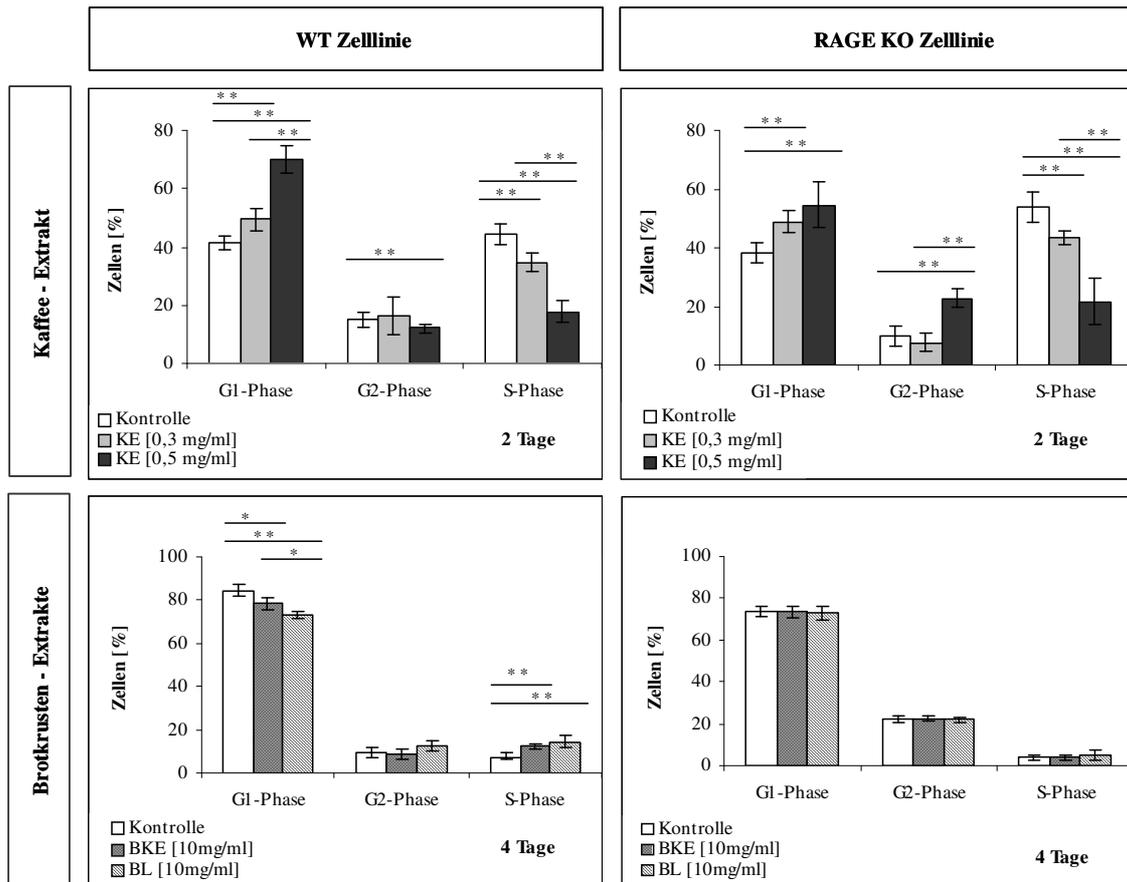


Abb. 4.13: Analyse des Einflusses der Extrakt-Behandlung auf den Zellzyklus der Zelllinien

Subkonfluente WT- und RAGE KO Zellen wurden mit KE (0,3 & 0,5 mg/ml) für 2 Tage sowie mit BKE und BL (10 mg/ml) für 4 Tage unter Standardbedingungen kultiviert. Danach wurden die Zellzyklusanalysen durchflusszytometrisch durchgeführt. ($MW_{\text{aller Experimente}} \pm \text{SEM}$; $n = 3$; $*P \leq 0,05$ vs. unbehandelte Kontrollzellen; $**P \leq 0,01$ vs. unbehandelte Kontrollzellen).

Einfluss der AGE-reichen Nahrungsmittlextrakte auf die zelluläre Morphologie: Neben der bereits beschriebenen Wachstumsarretierung durch das KE-Extrakt kam es bei der Behandlung beider Zelllinien mit diesem Extrakt innerhalb von vier Tagen zu morphologischen Veränderungen. Diese Effekte konnten bei der Brotkrustenextrakt-Behandlung, unabhängig von der verwendeten Fraktion, nicht beobachtet werden (Abb. 4.14). Die KE behandelten kardialen Fibroblasten zeigten, im Gegensatz zu den BKE/BL-behandelten Zellen, mikroskopisch eine Zellvolumenvergrößerung und verstärkte Strukturierung des Zytoplasmas. Dies könnte wie unter Abb. 4.2 beschrieben auf den Prozess der Zellalterung hinweisen, der jedoch in sich anschließenden Experimenten ausgeschlossen wurde (Daten nicht aufgeführt). Folglich können die Ergebnisse auch auf die Induktion einer Onkose/Nekrose hinweisen (Abb. 4.15).

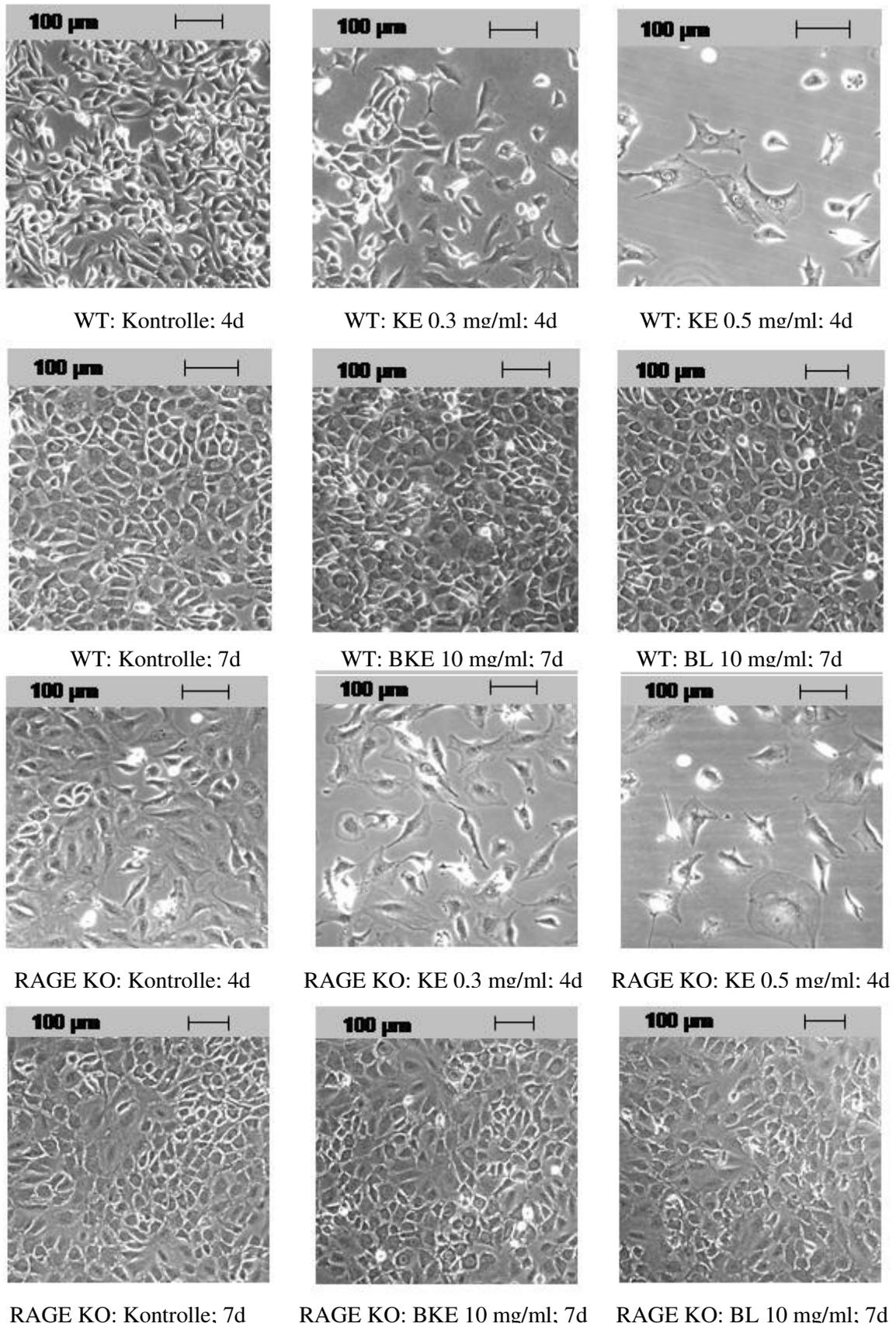


Abb. 4.14: Phasenkontrastaufnahmen der WT- und RAGE KO Zelllinien nach viertägiger KE- und siebentägiger Brotkrustenextrakt-Behandlung.

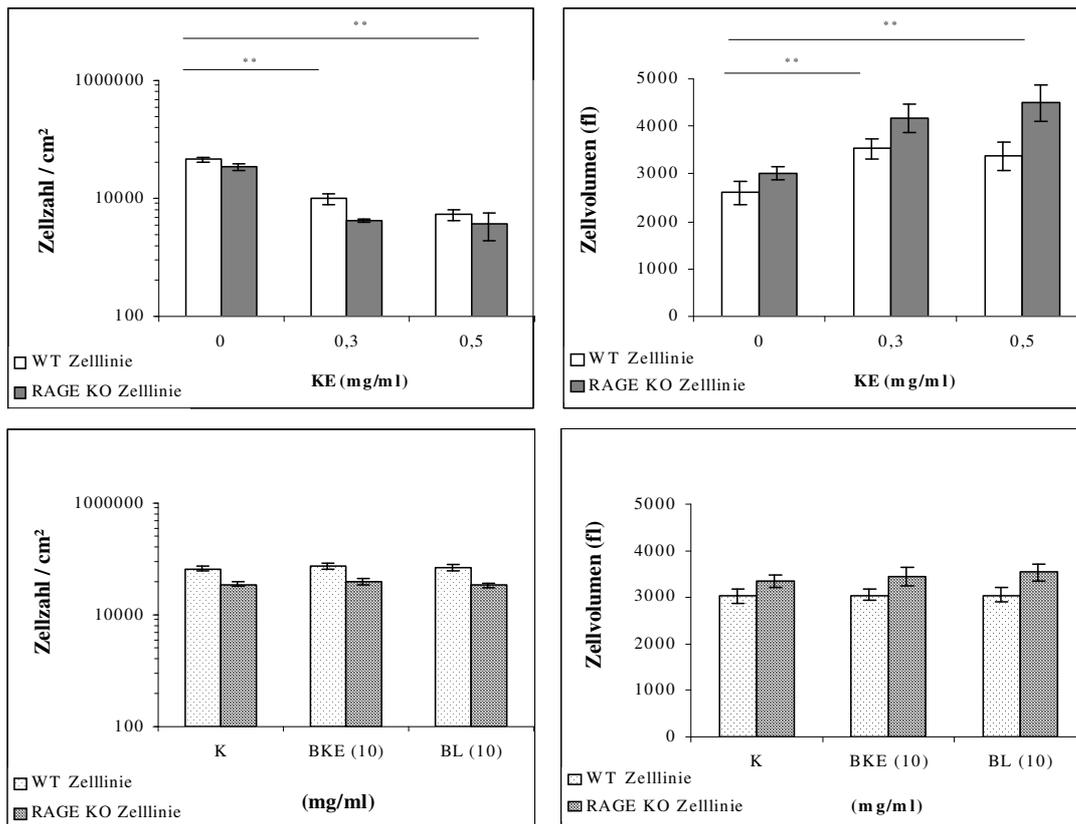


Abb. 4.15: Längerfristiger Einfluss der AGE-reichen Nahrungsmittel-extrakte auf subkonfluente WT und RAGE KO Zellen. Die beiden Zelllinien wurden mit einer Zellzahl von 5000/cm² ausgesät und nach 5 Std. mit den angegebenen AGE-reichen Nahrungsmitteln (BKE, BL, KE) für 4 Tage kultiviert. Die Zellzahl und das Zellvolumen wurden mittels Zellmessgerät bestimmt. ($MW_{\text{aller Experimente}} \pm SEM$; $n = 3$; $**P \leq 0,01$ Kontrolle vs. Behandlung).

4.2.3 Analyse des Einflusses der Nahrungsmittel-AGE Extrakte auf intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismen

Messung des oxidativen Stresses (ROS) durch DCFH-DA: Literaturdaten zeigen, dass AGE-modifizierte Proteine zu einer Induktion des zellulär oxidativen Stresses über eine vermehrte ROS-Produktion beitragen können (87). Daher wurde im Folgenden untersucht, ob die verschiedenen Nahrungsmittel-AGE Extrakte eine entsprechende Radikalproduktion induzierten. Diese Analyse konnte mit den RAGE KO Zellen nicht erfolgen, da die dort vorhandene GFP-Expression verwendbare durchflusszytometrisch basierte Methoden störte. Anhand Abb. 4.16 A1/B1 ist zu erkennen, dass die ROS-Produktion der konfluenten unter Serumreduktion kultivierten WT Zellen durch die BKE- und KE-Behandlung konzentrationsabhängig zunahm. Dabei war die Antwort der Zellen auf die KE-Behandlung im Vergleich zum BKE-Extrakt deutlich stärker. So führte die BKE-Behandlung in der höchsten Konzentration mit 10 mg/ml zu einer signifikanten, aber nur moderat vermehrten ROS Produktion ($170 \% \pm 45$). Im Gegensatz dazu induzierte eine nicht toxische KE-Konzentration von 0,5 mg/ml eine ~ vierfach höhere ROS-Produktion ($672 \% \pm 143$) im Vergleich zum BKE-Extrakt. Die Kurzzeitstimulation von 10 min (Abb. 4.16 A2/B2) der verschiedenen Brotkrustenextrakt-Fractionen trugen zu einer ähnlichen moderat vermehrten ROS Produktion bei. Dabei war für die Gesamtfraction (BKE, 10 mg/ml) kein signifikanter Unterschied bei der ROS-Produktion zwischen 10 und 45 Minuten Stimulationszeit nachweisbar

[A1: $BKE_{45 \text{ min}}$ 170 % \pm 45 \leftrightarrow A2: $BKE_{10 \text{ min}}$: 162 % \pm 20]. Diese oxidative Stressentwicklung war vergleichbar mit der durch 25 μM H_2O_2 induzierten DCF-Produktion. Die Kurzzeitstimulation der WT Zellen durch KE (0,5 mg/ml) zeigte im Vergleich zu der 45 minütigen Behandlung eine geringere ROS-Produktion [$KE_{10 \text{ min}}$: 375 % \pm 144 \leftrightarrow $KE_{45 \text{ min}}$: 672 % \pm 143], die bei Konzentrationen von $\geq 0,3$ mg/ml die durch H_2O_2 induzierte DCF-Produktion (202 % \pm 34) und die DCF-Bildung der verschiedenen Brotkrustenextrakt-Fractionen weit überschritt.

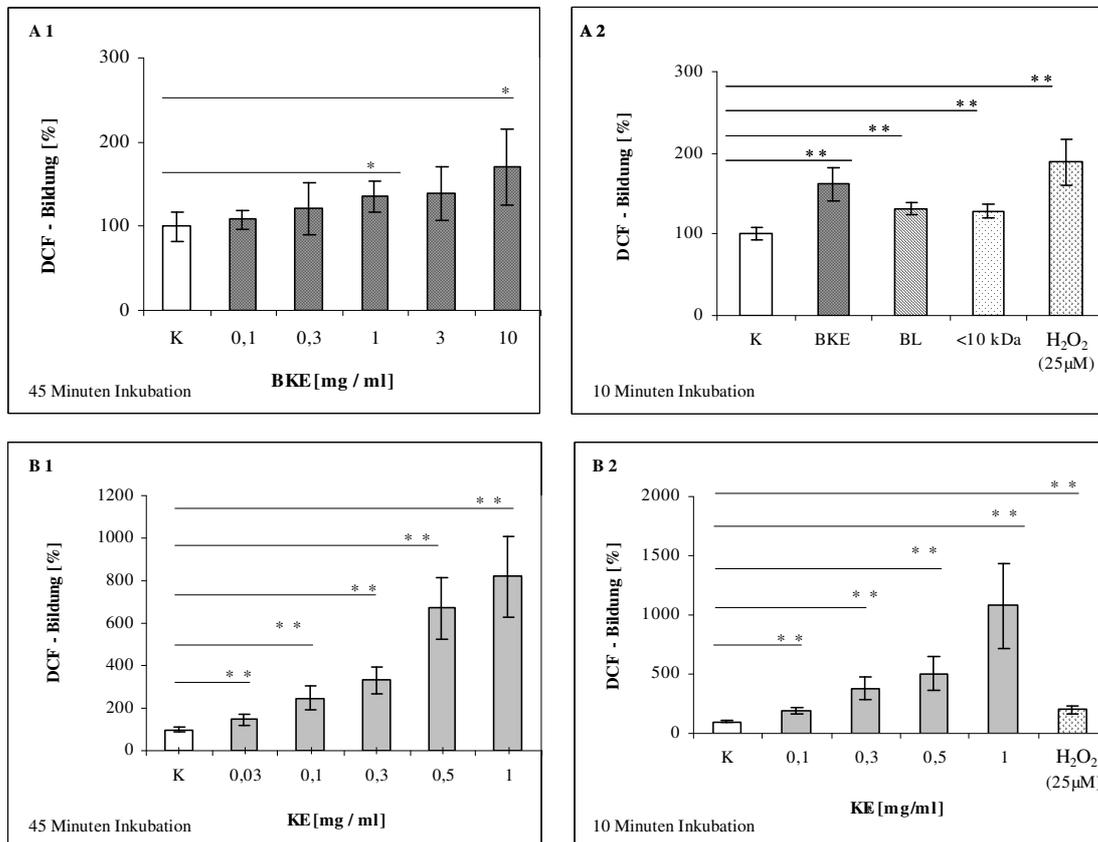


Abb. 4.16: Analyse der ROS-Produktion durch AGE-Nahrungsmittlextrakt Behandlung

Die ROS-Produktion wurde durch die vermehrte DCF-Bildung relativ zu den Kontrollzellen, welche jeweils auf 100 % normiert wurden, bestimmt. Die konfluenten unter Serumreduktion kultivierten WT Zellen wurden nach der entsprechenden Inkubationszeit mit dem jeweiligen angegebenen Nahrungsmittel-AGE Extrakt durchflusszytometrisch vermessen. Die Analysen wurden in mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten verifiziert ($MW_{\text{aller Experimente}} \pm \text{SEM}$; * $P \leq 0,05$ vs. unbehandelte Kontrolle; ** $P \leq 0,01$ vs. unbehandelte Kontrolle).

Messung des oxidativen Potentials der AGE-Nahrungsmittlextrakte durch Oxyblot-Analyse: Aufgrund der Tatsache, dass die Messung des oxidativen Stresses nur bei den WT Zellen durchführbar war, wurde der oxidative Effekt der AGE-Nahrungsmittlextrakt Behandlung mittels des OxyBlots analysiert. Durch hohe ROS-Konzentrationen können Proteinseitenketten von Aminosäuren (Lysin, Arginin, Threonin) oxidiert werden, wodurch neue Carbonylgruppen entstehen. Der Gehalt an Proteincarbonylen ist somit ein allgemeines Kennzeichen für Proteinoxidationsreaktionen, der nach 24 stündiger Behandlung der Zellen über Dot Blot Analysen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen mittels OxyBlot quantifiziert wurde.

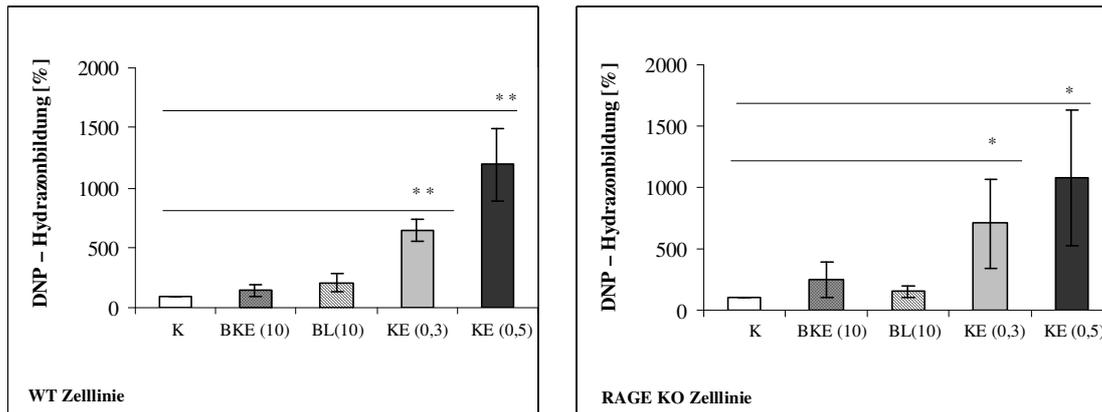


Abb. 4.17: Analyse der oxidativen Effekte der AGE-Nahrungsmittlextrakte durch Oxyblot Analyse

Die oxidativen Effekte der AGE-Nahrungsmittlextrakte (BKE, BL:10 mg/ml; KE: 0,3 sowie 0,5 mg/ml) wurde nach 24stündiger Behandlung der WT- und RAGE KO Zellen (konfluent, unter Serumreduktion) durch den Proteincarbonylgehalt mittels Oxyblot im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen (Normierung auf 100 %) bestimmt. (MW_{aller Experimente} ± SEM; n = 4, * P ≤ 0,05 vs. unbehandelte Kontrolle; ** P ≤ 0,01 vs. unbehandelte Kontrolle).

Wie in Abb. 4.17 dargestellt, führte die 24stündige Behandlung mit den verschiedenen Brotkrustenfraktionen beider Zelllinien im Vergleich zu den Kontrollen (100 %) zu keiner vermehrten Oxidation von zellulären Proteinen. Die KE-Behandlung hingegen induzierte eine bei beiden Zelllinien vergleichbar signifikant vermehrte Proteincarbonyl-Bildung, die sich mit steigender KE-Konzentration erhöhte [WT: KE_{0,3 mg/ml}: 647 % ± 92, KE_{0,5 mg/ml}: 1191 % ± 302 / RAGE KO: KE_{0,3 mg/ml}: 704 % ± 366, KE_{0,5 mg/ml}: 1079 % ± 552]. Die bei der KE-Behandlung gemessene stark vermehrte DCF-Fluoreszenz der WT Zellen korreliert, im Gegensatz zur Behandlung mit den Brotkrustenextrakt Fraktionen, mit der deutlich gesteigerten Proteincarbonyl-Bildung (Abb. 4.18). Die bei Behandlung der RAGE KO Zellen mit beiden AGE-reichen Nahrungsmittlextrakten (BKE/BL und KE) theoretisch zu erzielende DCF-Produktion sollte ähnlich jener der WT Zellen verlaufen, da durch die Oxyblot Analyse keine zelllinienspezifischen Unterschiede hinsichtlich der Proteincarbonyl-Bildung festgestellt wurden.

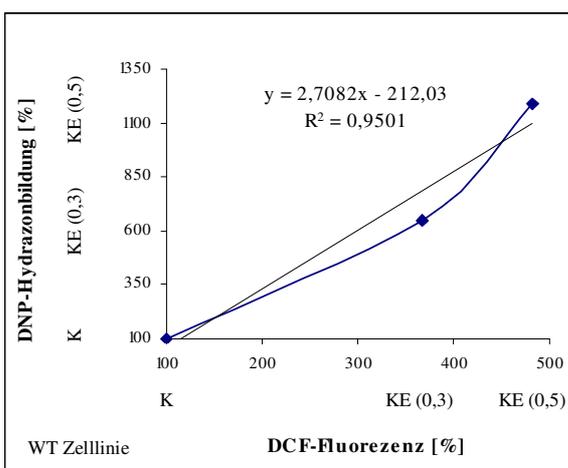


Abb. 4.18 Darstellung der Korrelation ($R^2 = 0,95$) zwischen der DCF-Fluoreszenz und der Proteincarbonylbildung (Oxyblot) der WT Zellen durch KE-Behandlung.

Nahrungsmittel-AGE Extrakt vermittelte Modulation der Aktivität der MAP Kinasen ERK1/2^{MAPK}, p38^{MAPK} und der Akt Kinase: Es wurde beschrieben, dass AGE-modifizierte Proteine verschiedene Signalkaskaden induzieren können, die die MAP-Kinasen - ERK1/2^{MAPK} und p38^{MAPK} - einschließen (88). Zusätzlich sollte das Verhalten der Akt Kinase analysiert werden, da eine Aktivierung der Kinase mit einem Zellüberleben assoziiert wird.

Zeitkinetik: Zur Bestimmung des Einflusses der Nahrungsmittel AGE-Extrakte auf die Aktivierung dieser Kinasen wurden zuerst zeitabhängige Stimulationsversuche mit den WT Zellen durchgeführt. Hierbei wurden phosphospezifische/aktivierungsspezifische Antikörper für die angegebenen Kinasen verwendet und die durch Western-Blot erhaltenen Werte mittels GAPDH bzw. Aktin auf die Proteinbeladung normalisiert. Durch diese zeitkinetischen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die p38^{MAPK} signifikant durch die BKE- als auch durch die KE-Behandlung aktiviert wurde (Abb. 4.19). Allerdings zeigten sich Unterschiede im Hinblick auf die gefundenen Kinetiken. Eine KE-Stimulation führte zu einer sehr schnellen und ausgeprägten Aktivierung der p38^{MAPK} nach 5 min, die anschließend abfiel und aber bis 120 min signifikant gegenüber den Kontrollzellen erhöht blieb. Bei den BKE behandelten Zellen hingegen wurde die maximale p38^{MAPK} Aktivierung erst nach 60 min erzielt, wobei die Aktivierung ebenfalls bis 120 min anhielt. Die mit dem Zellüberleben assoziierte Akt Kinase wurde bei beiden Nahrungsmittel-AGE Extrakten nach 5 min (KE) sowie 10 min (BKE) vorübergehend in ihrer Aktivität reprimiert und erreichte nach 120 min wieder das Kontrollniveau. Die ERK1/2^{MAPK} wurde im Hinblick auf die Kinetik und Aktivierungsintensitäten durch das BKE und KE unterschiedlich reguliert. Das BKE führte bereits nach 5 min zu einer starken und signifikanten ERK1/2^{MAPK} Aktivierung, die über den weiteren Stimulationszeitraum erhalten blieb. Das KE hingegen bewirkte eine kurzfristige und wesentlich geringere Phosphorylierung der ERK1/2^{MAPK} nach 5 min, die anschließend sogar unter das Kontrollniveau sank und ab einem Zeitpunkt von 30 min von einer signifikanten Reprimierung der Phosphorylierung der ERK1/2^{MAPK} gesprochen werden konnte. Diese Signaltransduktionsanalysen zeigen, dass die beiden verwendeten AGE-reichen Extrakte (BKE/KE) die untersuchten Signalwege verschieden stark und zu unterschiedlichen Zeitpunkten beeinflussen.

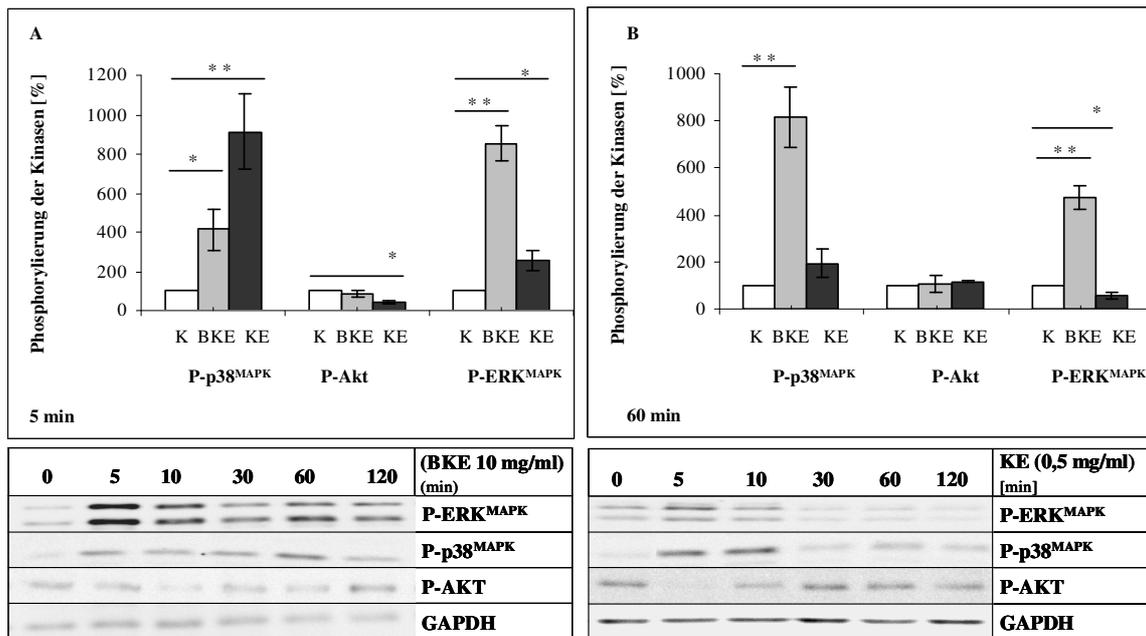


Abb. 4.19: Zeitabhängiger Einfluss der Extraktbehandlung auf die Aktivität verschiedener Kinasen

Konfluente unter serumreduzierten Bedingungen gewachsene WT Zellen wurden mit BKE (10 mg/ml) bzw. KE (0,5 mg/ml) zu den angegebenen Zeitpunkten stimuliert und die veränderte Aktivierung der Kinasen mittels phospho-/aktivierungsspezifischer Antikörper durch Western-Blot Analyse detektiert, wobei die unbehandelten Kontrollen auf 100 % normiert wurden. (MW \pm SEM; n = 3; *P \leq 0,05 vs. unbehandelte Kontrolle; **P \leq 0,01 vs. unbehandelte Kontrolle). Die Tabelle mit den dazugehörigen Werten befindet sich im Anhang (Anhang Tabelle 2).

Konzentrationsabhängige Untersuchungen - 1. Kaffee-Extrakt Analysen: Fünfminütige konzentrationsabhängige KE-Stimulationsversuche (0,03 bis 0,5 mg/ml) zeigten, in Übereinstimmung mit den kinetischen Versuchen (Abb. 4.20), dass die p38^{MAPK} Aktivität ab einer Konzentration von 0,1 mg/ml signifikant bei WT- wie RAGE KO Zellen gesteigert wurde. Die ERK1/2^{MAPK} wurde bis zur Konzentration von 0,1 mg/ml moderat aktiviert, wobei nur bei den RAGE KO Zellen Signifikanzniveau erreicht wurde. Konzentrationen ab 0,1 mg/ml führten bei der RAGE KO Zelllinie zu einer deutlich stärkeren Aktivierung als bei der WT Zelllinie. Bei den WT Zellen führte die fünfminütige KE-Stimulation über den gesamten Konzentrationsbereich zu einer signifikanten Inhibition der Akt Kinase Aktivität, wohingegen bei den RAGE KO Zellen keine Aktivitätsveränderung der Akt Kinase festzustellen war.

KE-Stimulationsversuche beider Zelllinien über einen Zeitraum von 1 Std. erzielten ab 0,3 mg/ml KE eine p38^{MAPK} Aktivierung, die bei den WT Zellen wesentlich geringer als zum fünfminütigen Stimulationszeitpunkt ausfiel. Analysen der ERK1/2^{MAPK} Aktivität ergaben, dass diese bei den WT Zellen in einer konzentrationsabhängigen, signifikanten Aktivitätsverminderung resultierte. Die RAGE KO Zellen hingegen wiesen eine moderat vermehrte ERK1/2^{MAPK} Aktivität im Vergleich zu den Kontrollzellen auf, die jedoch geringer als nach der fünfminütigen Stimulation war. Die AKT Kinase Aktivität der WT Zellen zeigte nach 60 min KE-Behandlung Kontrollniveau, wohingegen bei den RAGE KO Zellen noch eine tendenzielle Stimulation der Aktivität in der höchsten Konzentration (0,5 mg/ml) nachweisbar war.

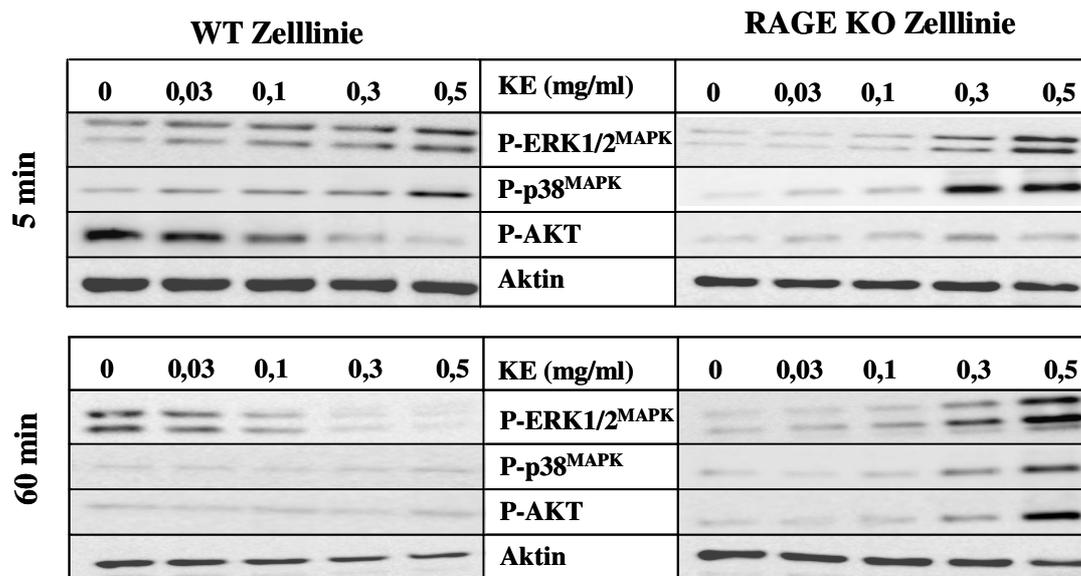


Abb. 4.20: Konzentrationsabhängiger Einfluss der Extraktbehandlung auf die Aktivität verschiedener Kinasen Konfluente unter Serumreduktion kultivierte WT- und RAGE KO Zellen wurden mit verschiedenen KE-Konzentrationen stimuliert und die Aktivierung intrazellulärer Signalwege mittels phospho-/aktivierungsspezifischer Antikörper zu den angegebenen Zeitpunkten durch Western-Blot Analyse detektiert, wobei die unbehandelten Kontrollen auf 100 % normiert wurden. Die Versuche wurden in vier bis acht voneinander unabhängigen Experimenten verifiziert (MW \pm SEM; *P \leq 0,05 vs. unbehandelte Kontrolle; **P \leq 0,01 vs. unbehandelte Kontrolle). Die dazugehörigen Tabellen mit den entsprechenden Werten sind im Anhang Tabelle 3 aufgeführt.

Konzentrationsabhängige Untersuchungen - 2.BKE/BL-Analysen: Die konzentrationsabhängige fünfminütige BKE/BL Stimulation (0,1-10 mg/ml) resultierte bei beiden Zelllinien in einer vermehrten ERK1/2^{MAPK} Aktivierung, wobei der Effekt mit dem Gesamtextrakt (BKE) bei den WT Zellen stärker ausgeprägt war (Abb. 4.21a). Die RAGE KO Zellen erreichten erst ein vergleichbares ERK1/2^{MAPK} Stimulationsniveau ab einer Konzentration von 10 mg/ml. Die BL-Stimulation führte im Vergleich zu BKE zu einer geringeren ERK1/2^{MAPK} Aktivierung mit geringeren zelllinienspezifischen Unterschieden. Auf die AKT Kinase Aktivität hatten beide Brotkrustenextrakte keinen oder nur geringfügigen Einfluss. BKE/BL-Stimulationsversuche über einen Zeitraum von 1 Std. führten ebenfalls zu einer Aktivierung bei ERK1/2^{MAPK} beider Zelllinien. Eine vermehrte Phosphorylierung der p38^{MAPK} konnte in Übereinstimmung mit den kinetischen Untersuchungen nach 60 min (Abb. 4.19) bei der BKE/BL-Behandlung beider Zelllinien gefunden werden. Allerdings wiesen die WT Zellen eine stärkere Phosphorylierung als die RAGE KO Zellen auf. Die AKT Kinase Aktivität war wiederum unbeeinflusst.

Vergleichende Untersuchungen des Gesamtextraktes vs. der löslichen Fraktion (BL) bezüglich der Aktivierung der Signalwege ERK1/2^{MAPK}- sowie p38^{MAPK} zeigten, dass das Gesamtextrakt den ERK1/2^{MAPK} Signalweg nur nach 5 min tendenziell bei beiden Zelllinien stärker als die lösliche Fraktion aktivierte - ein Effekt, der bei dem späteren Stimulationszeitpunkt von 60 min für den ERK1/2^{MAPK}- sowie p38^{MAPK} Signalweg nicht gefunden werden konnte.

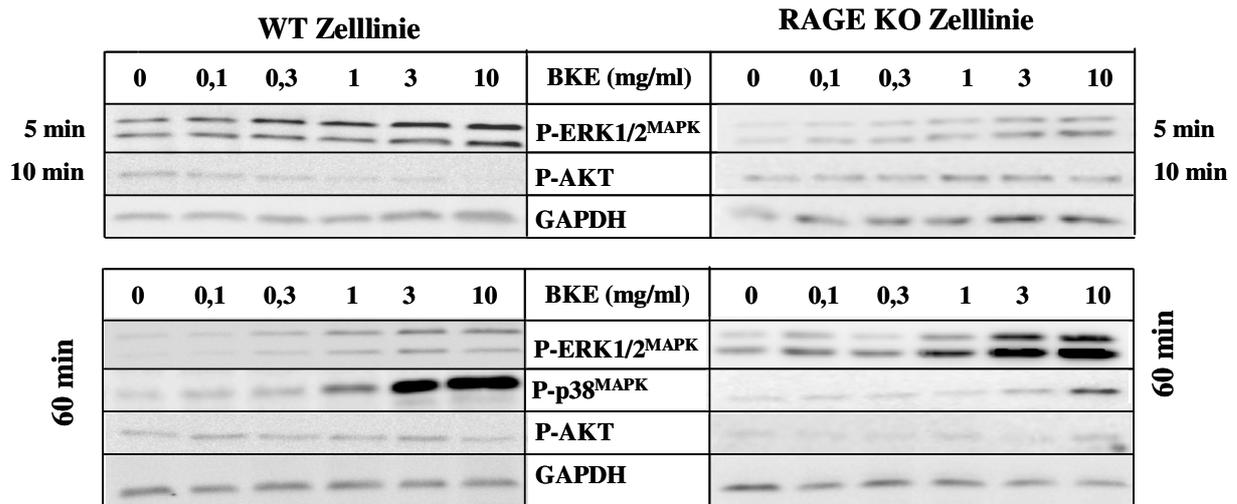


Abb. 4.21a: Analyse des Einflusses der BKE-Behandlung auf die Stimulation verschiedener Kinasen beider Zelllinien Konfluente unter Serumreduktion kultivierte WT- und RAGE KO Zellen wurden mit verschiedenen BKE/BL-Konzentrationen stimuliert und die Aktivierung intrazellulärer Signalwege mittels phospho-/aktivierungsspezifischer Antikörper zu den angegebenen Zeitpunkten durch Western-Blot Analyse detektiert, wobei die unbehandelten Kontrollen auf 100 % normiert wurden. (MW \pm SEM; n = 5; *P \leq 0,05 vs. unbehandelte Kontrollzellen; **P \leq 0,01 vs. unbehandelte Kontrollzellen). Die dazugehörigen Tabellen mit den entsprechenden Werten sind im Anhang Tabelle 4 aufgeführt.

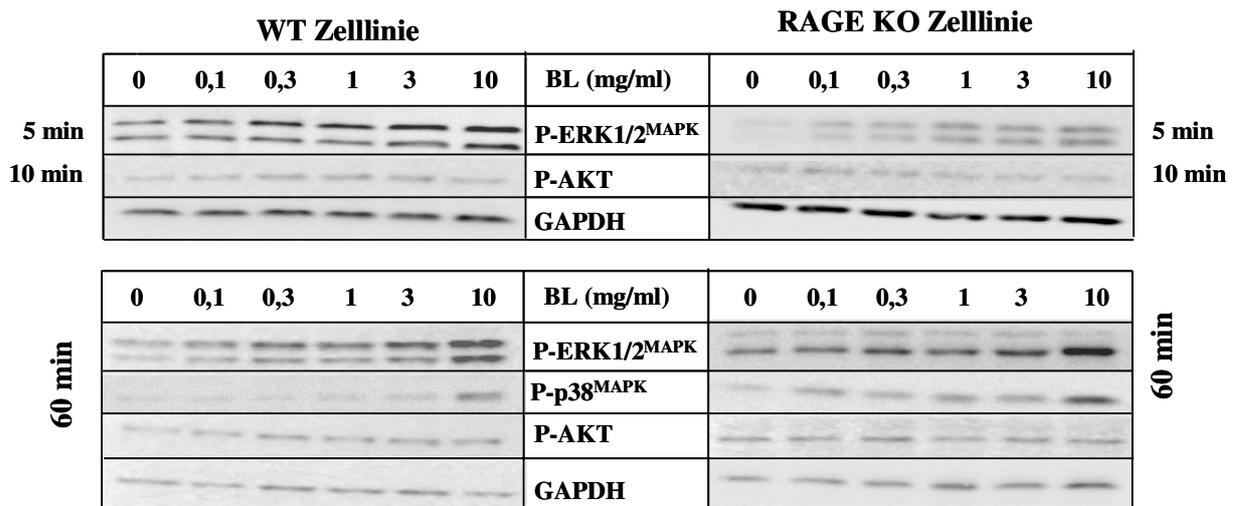


Abb. 4.21b: Analyse des Einflusses der BL-Behandlung auf die Stimulation verschiedener Kinasen beider Zelllinien Die Durchführung erfolgte wie unter Abb. 4.21 a angegeben und die Tabelle mit den dazugehörigen Werten ist im Anhang Tabelle 5 zu finden.

Vergleichende Untersuchungen hinsichtlich einer möglichen Involvement des RAGE-Rezeptors bei der Induktion des ERK1/2^{MAPK}- sowie p38^{MAPK} Signalweges sind in Abb. 4.22. dargestellt. Diese Daten zeigen, dass der RAGE Rezeptor bei der ERK1/2^{MAPK} und p38^{MAPK} Aktivierung bei der BKE/BL-Behandlung involviert zu sein scheint. Denn beide MAP-Kinasen wurden bei den WT Zellen bei Konzentration <10 mg/ml stärker aktiviert als die RAGE KO Zellen. Allerdings wird weiterhin ersichtlich, dass die RAGE KO Zellen auch ohne diesen Rezeptor auf die BKE/BL-Behandlung mit einer Aktivierung dieser Kinasen ansprechen. Dabei sind die Effekte beider Zelllinien unter Verwendung der Höchstkonzentration von 10 mg/ml ähnlich stark ausgeprägt. Unter Verwendung des AGE-reichen KE konnte eine Beteiligung des RAGE Rezeptors hinsichtlich der Aktivierung dieser beiden MAP-Kinasen nicht gefunden werden.

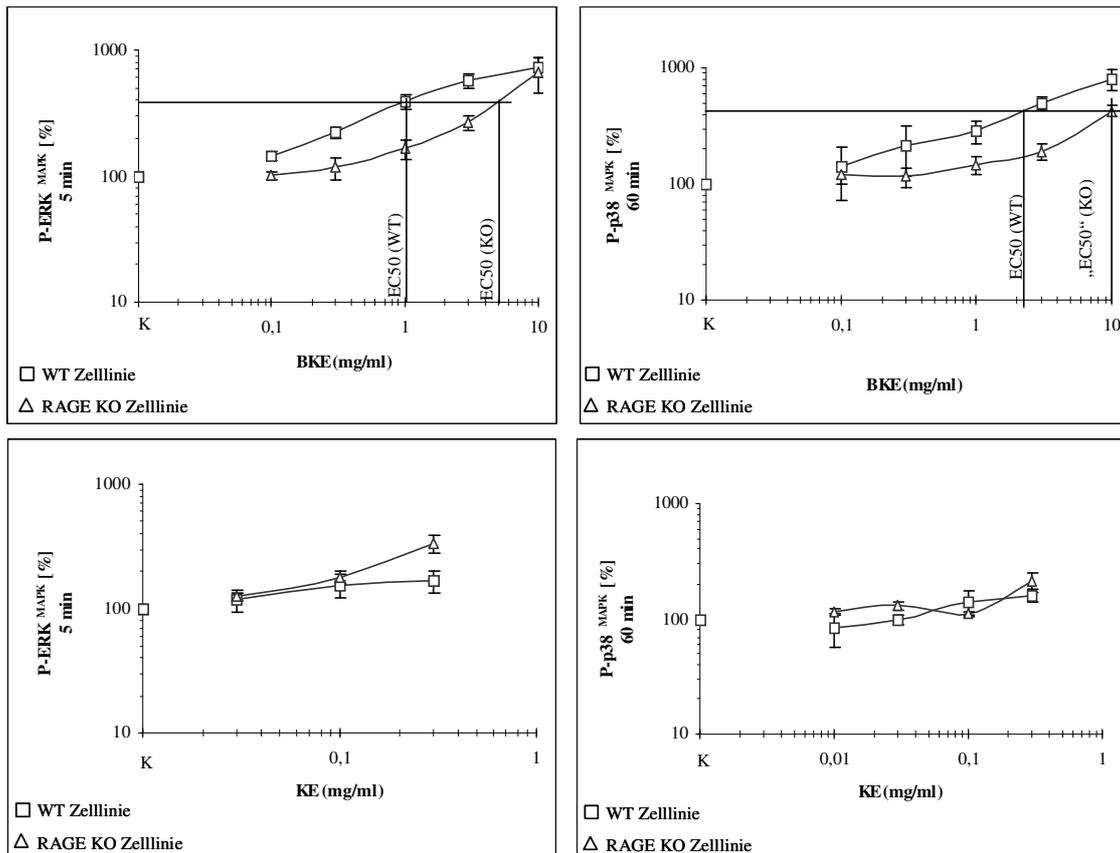


Abb. 4.22: Darstellung des möglichen Einflusses des RAGE Rezeptors auf die Stimulation der ERK1/2^{MAPK} sowie p38^{MAPK} durch die BKE-/KE-Behandlung. Hierfür wurden die in Abb. 4.20 & 4.21 dargestellten Ergebnisse für die Aktivierung der ERK1/2^{MAPK} (5 min) - sowie p38^{MAPK} (60 min) bei BKE-/KE-Behandlung beider Zelllinien aufgetragen.

Nahrungsmittel-AGE vermittelte Modulation verschiedener Transkriptionsfaktoren: Die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 können durch verschiedene externe Faktoren u.a. AGE-modifizierte Proteine aber auch ROS, Zytokine, Wachstumsfaktoren und UV-Strahlung in ihrer Aktivität induziert werden (88, 89).

Die BKE/BL-Behandlung der beiden Zelllinien führte zeitabhängig zu einer signifikant vermehrten Bindung von NF- κ B an die spezifischen Bindungsmotive des transfizierten Plasmides (Maximum: 6 Std.). Dieser Effekt war bei den WT Zellen signifikant stärker ausgeprägt (WT: 6 Std. BKE: 252 % \pm 39, BL: 242 % \pm 40 / RAGE KO: 6 Std. BKE: 196 % \pm 27; BL: 146 % \pm 28). Das KE hingegen führte zu einer moderaten NF- κ B Aktivierung beider Zelllinien mit vergleichbaren Stimulationsniveaus. Die BKE/BL-Behandlung der WT Zellen resultierte nach 4 Std. in einer moderat, aber signifikant vermehrten Bindungsaktivität des AP-1 Transkriptions-faktors (WT: 4 Std. BKE: 130 % \pm 20, BL: 175 % \pm 51). Bei den RAGE KO Zellen hingegen zeigte sich keine AP-1 Aktivierung, vielmehr sank die AP-1Aktivität bei BKE-Behandlung nach 18 bis 30 Std. signifikant ab, ein Effekt der mit der BL-Fraktion nicht gefunden wurde. Die KE-Behandlung beider Zelllinien hingegen führte nur zu einer tendenziellen, aber nicht eindeutig signifikanten vermehrten AP-1 Bindungsaktivität über den betrachteten Versuchszeitraum.

Somit scheinen wiederum die RAGE exprimierenden WT Zellen stärker auf die BKE/BL-Behandlung als die RAGE KO Zellen hinsichtlich der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-

κ B und AP-1 anzusprechen. Jedoch kann die BKE/BL-Behandlung der RAGE KO Zellen auch ohne RAGE Rezeptor zu einer vermehrten NF- κ B beitragen.

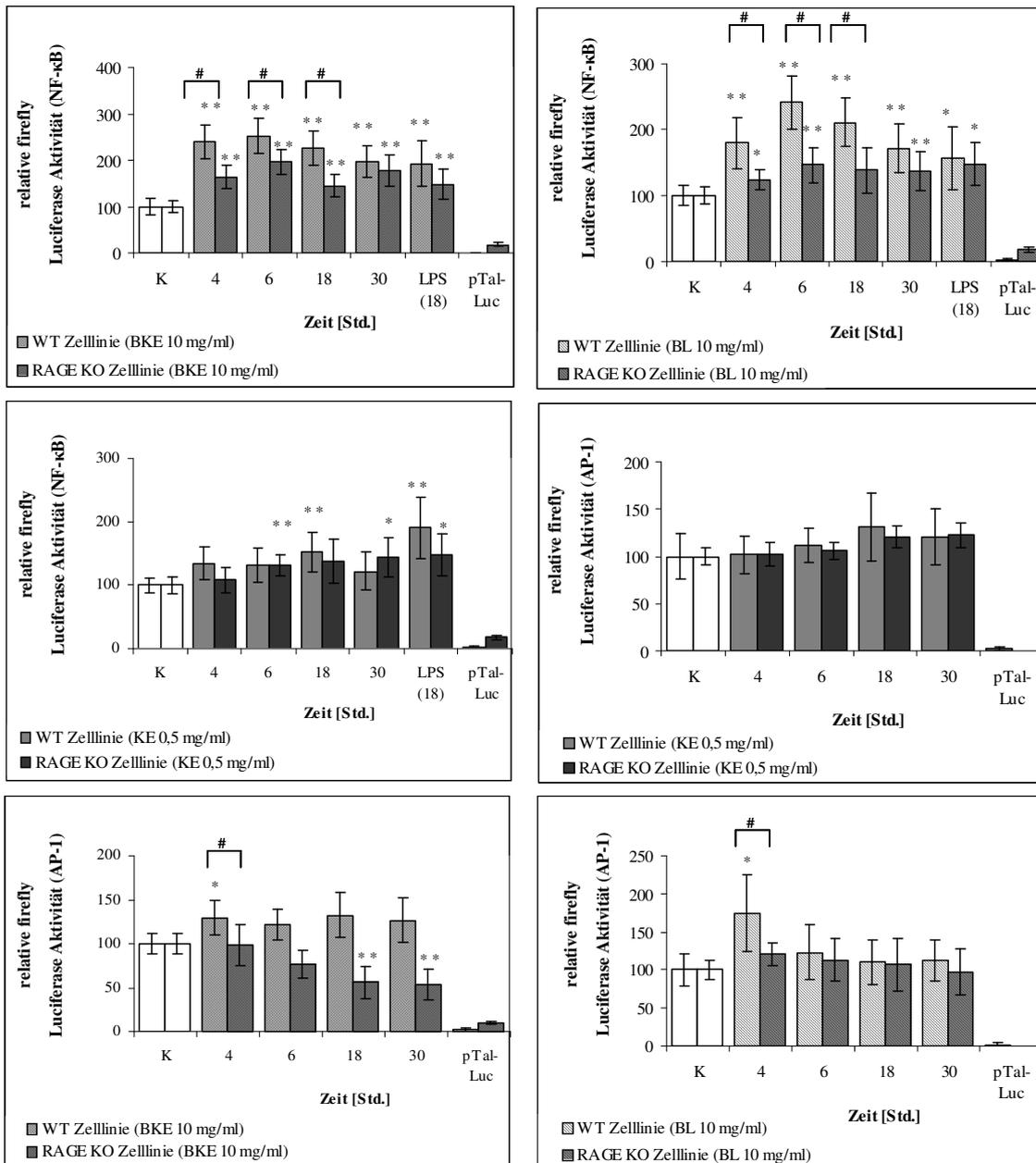


Abb. 4.23: Einfluss der Nahrungsmittel-AGE Extraktbehandlung auf die Bindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1. Die subkonfluent kultivierten Zellen wurden nach 16 Std. mit den jeweiligen Reporter- und Referenzplasmid 1:10 mit TransFektin transfiziert. Nach 24 Std. wurden die Zellen zeitabhängig mit den entsprechenden Extrakten stimuliert, anschließend lysiert und die Luciferaseaktivitäten chemiluminometrisch bestimmt. Aus den Mittelwerten der firefly und renilla Luciferaseaktivität wurde der Quotient bestimmt, wobei die Kontrollen auf 100 % normiert wurden. Die Versuche wurden in drei bis fünf voneinander unabhängigen Experimenten verifiziert ($MW_{\text{aller Experimente}} \pm SEM$; * $P \leq 0,05$ vs. unbehandelter Kontrolle; ** $P \leq 0,01$ vs. unbehandelter Kontrolle; # WT- vs. RAGE KO Behandlung).

4.2.4 Analyse des Einflusses des Brotkrustenextraktes auf transkriptionelle Expressionsveränderungen mittels cDNA-Microarray Analyse

Eine durch die Behandlung mit den AGE-reichen Nahrungsmitteln veränderte Signaltransduktion sollte sich in Genexpressionsveränderungen fortsetzen (89). Hierfür wurden cDNA-Microarray Analysen unter Verwendung von konfluent nicht proliferierenden WT Zellen und der BL-Fraktion (BL:10mg/ml; 24 Std.) durchgeführt. Dieses AGE-reiche Nahrungsmittlextrakt könnte eventuell eine RAGE/AGE-Rezeptorabhängigkeit zeigen und führte im Gegensatz zum KE selbst in hohen Konzentrationen zu keiner Vitalitätsbeeinträchtigung der Fibroblasten. Hierbei sollten einerseits Gene untersucht werden, die mit kardialer Fibrose (Kollagene, MMPs, Timps) in Zusammenhang stehen. Zum anderen sollten Genen identifiziert werden, die durch die BL-Behandlung besonders stark reguliert wurden.

In Tabelle 4.4 wurden die Gene aufgeführt, die bei der Entwicklung einer Gewebsfibrose in vielen Fällen involviert sind. Besonders Augenmerk wurde auf die Expression der Isoformen des *transforming growth factors Tgf- β 1,-2,-3* gelegt, da dieser Wachstumsfaktor zumeist für eine vermehrte Expression von Proteinen der EZM, insbesondere der Kollagene 1,-3,-4, verantwortlich gemacht wird (18). Die cDNA-Microarray Analysen Daten zeigten allerdings, dass die einzelnen *Tgf- β* Isoformen durch BL-Behandlung im Vergleich zu den Kontrollzellen vermindert exprimiert wurden. Weitere Wachstumsfaktoren wie Endothelin 1 (*End1*) und der *connective tissue growth factor (Ctgf)*, die mit einer Fibroseinduktion assoziiert werden, wurden durch die BL-Behandlung ebenfalls tendenziell vermindert exprimiert. Die mRNA-Expression der vorwiegend im Myokard exprimierten Kollagene (Kollagen Typ I, III, IV, V, VI) hatte sich im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert. Bei den weiteren analysierten EZM Proteinen (Fibuline, Laminine sowie Fibronectin) zeigten zwei Gene - das Fibulin 5 (*Fbln5*) sowie Laminin beta 2 (*Lamb2*) - eine durch BL-Behandlung tendenziell verminderte Expression. Auch die mRNA-Expression der MMPs, einschließlich der *Mmp2,-9,-13,-14*, wurde durch BL-Behandlung nicht verändert reguliert. Die Inhibitoren der MMPs hingegen - die *Tipms1, -2, -3* - wiesen durch die BL-Behandlung hinsichtlich des mRNA-Expressionsniveaus Unterschiede auf. Das *Timp1* mRNA Niveau wurde moderat vermehrt exprimiert, wohingegen die *Timp2* und *Timp3* eine verminderte mRNA-Expression zeigten. Weiterhin bewirkte die BL-Behandlung der WT Zellen keine Transformation der Fibroblasten zu Myofibroblasten, da bekannte Markergene wie das „*alpha 2 smooth muscle actin*“ (*Acta2*) sowie *Tropomyosin-1 alpha (Tpm1)* nicht vermehrt exprimiert wurden. Zusammenfassend zeigten jene Daten, dass die BL-Behandlung die Entwicklung einer kardialen Fibrose nicht induzieren sollte.

| | Genname | Kurzform Genname | Genbank Nummer | rel. FE Kontrolle ± STABW | rel. FE BL ± STABW | Genexpressionsänderung BL / Kontrolle | t-Test |
|---|-------------------------------|---------------------|-------------------|------------------------------|-----------------------|--|--------|
| Wachstumsfaktoren | | | | | | | |
| <i>transforming growth factor</i> | transforming growth factor 1 | <i>Tgfb 1</i> | NM_011577 | 933 ± 233 | 607 ± 37 | 0,7 | 0,029 |
| | transforming growth factor 2 | <i>Tgfb 2</i> | NM_009367 | 464 ± 59 | 388 ± 13 | 0,8 | 0,043 |
| | transforming growth factor 3 | <i>Tgfb 3</i> | NM_011595 | 1798 ± 254 | 1144 ± 171 | 0,6 | 0,005 |
| EZM-Bestandteile | | | | | | | |
| <i>Kollagene</i> | | | | | | | |
| | Prokollagen, Typ 1, alpha 1 | <i>Col1a1</i> | NM_007742 | 1873 ± 745 | 1795 ± 453 | 1,0 | 0,860 |
| | Prokollagen, Typ 1, alpha 2 | <i>Col1a2</i> | NM_007743 | 20546 ± 1157 | 17276 ± 744 | 0,8 | 0,003 |
| | Prokollagen, Typ 3, alpha 1 | <i>Col3a1</i> | NM_009930 | 3749 ± 1030 | 5054 ± 1025 | 1,3 | 0,150 |
| | Prokollagen, Typ 4, alpha 1 | <i>Col4a1</i> | NM_009931 | 2343 ± 693 | 1876 ± 183 | 0,8 | 0,210 |
| | Prokollagen, Typ 4, alpha 5 | <i>Col4a5</i> | NM_007736 | 3124 ± 535 | 2572 ± 488 | 0,8 | 0,200 |
| | Prokollagen, Typ 4, alpha 6 | <i>Col4a6</i> | NM_053185 | 1379 ± 115 | 1094 ± 107 | 0,8 | 0,019 |
| | Prokollagen, Typ 5, alpha 1 | <i>Col5a1</i> | NM_015734 | 2369 ± 190 | 1969 ± 218 | 0,8 | 0,060 |
| | Prokollagen, Typ 5, alpha 2 | <i>Col5a2</i> | NM_007737 | 9040 ± 1727 | 6841 ± 299 | 0,8 | 0,050 |
| | Prokollagen, Typ 5, alpha 3 | <i>Col5a3</i> | NM_016919 | 232 ± 38 | 218 ± 33 | 0,9 | 0,600 |
| | Prokollagen, Typ 6, alpha 1 | <i>Col6a1</i> | NM_009933 | 9629 ± 1672 | 10880 ± 702 | 1,1 | 0,200 |
| | Prokollagen, Typ 6, alpha 2 | <i>Col6a2</i> | NM_146007 | 5741 ± 825 | 4839 ± 266 | 0,8 | 0,070 |
| | Prokollagen, Typ 7, alpha 1 | <i>Col7a1</i> | NM_007738 | 195 ± 45 | 130 ± 45 | 0,7 | 0,120 |
| | Prokollagen, Typ 8, alpha 1 | <i>Col8a1</i> | NM_007739 | 573 ± 230 | 260 ± 12 | 0,5 | 0,040 |
| | Prokollagen, Typ 9, alpha 1 | <i>Col9a1</i> | NM_007740 | 91 ± 55 | 145 ± 61 | 1,6 | 0,300 |
| | Prokollagen, Typ 11, alpha 1 | <i>Col11a1</i> | NM_007729 | 158 ± 56 | 148 ± 26 | 0,9 | 0,740 |
| | Prokollagen, Typ 11, alpha 2 | <i>Col11a2</i> | NM_009926 | 93 ± 28 | 114 ± 43 | 1,2 | 0,500 |
| | Prokollagen, Typ 12, alpha 1 | <i>Col12a1</i> | NM_007730 | 326 ± 163 | 81 ± 21 | 0,2 | 0,027 |
| | Prokollagen, Typ 16, alpha 1 | <i>Col16a1</i> | NM_028266 | 1279 ± 216 | 1155 ± 107 | 0,9 | 0,323 |
| | Prokollagen, Typ 18, alpha 1 | <i>Col18a1</i> | NM_009929 | 208 ± 51 | 301 ± 86 | 1,4 | 0,191 |
| <i>Fibuline</i> | | | | | | | |
| | Fibulin 1 | <i>Fbln1</i> | NM_010180 | 411 ± 120 | 610 ± 97 | 1,5 | 0,050 |
| | Fibulin 2 | <i>Fbln2</i> | NM_010181 | 7037 ± 1820 | 4288 ± 9 | 0,6 | 0,027 |
| | Fibulin 5 | <i>Fbln5</i> | NM_010182 | 2220 ± 612 | 1026 ± 83 | 0,5 | 0,011 |
| <i>Laminine</i> | | | | | | | |
| | Laminin alpha 4 | <i>Lama4</i> | NM_010681 | 601 ± 51 | 597 ± 148 | 1,0 | 0,968 |
| | Laminin beta 1 | <i>Lamb1</i> | NM_008482 | 1122 ± 195 | 1088 ± 50 | 1,0 | 0,727 |
| | Laminin beta 2 | <i>Lamb2</i> | NM_008483 | 685 ± 164 | 490 ± 105 | 0,7 | 0,087 |
| <i>Fibronectin</i> | | | | | | | |
| | Fibronectin | <i>Fn1</i> | NM_010233 | 389 ± 90 | 407 ± 57 | 1,0 | 0,740 |
| <i>Myofibroblastenmarker</i> | | | | | | | |
| | actin, alpha 2, smooth muscle | <i>Acta2</i> | NM_007392 | 10795 ± 2360 | 10760 ± 1774 | 1,0 | 0,980 |
| | Tropomyosin 1, alpha | <i>Tpm1</i> | NM_024427 | 177 ± 51 | 199 ± 40 | 1,1 | 0,517 |
| EZM-Bestandteilkonzentrationen regulierende Enzyme | | | | | | | |
| <i>Matrix-Metalloproteinasen</i> | | | | | | | |
| | Matrix-Metalloproteinase 2 | <i>Mmp2</i> | NM_008610 | 763 ± 108 | 693 ± 31 | 0,9 | 0,230 |
| | Matrix-Metalloproteinase 3 | <i>Mmp3</i> | NM_010809 | 7021 ± 1382 | 9287 ± 246 | 1,3 | 0,019 |
| | Matrix-Metalloproteinase 9 | <i>Mmp9</i> | NM_013599 | 23 ± 17 | 27 ± 15 | 1,2 | 0,714 |
| | Matrix-Metalloproteinase 10 | <i>Mmp10</i> | NM_019471 | 180 ± 130 | 124 ± 20 | 0,7 | 0,397 |
| | Matrix-Metalloproteinase 11 | <i>Mmp11</i> | NM_008606 | 656 ± 124 | 670 ± 67 | 1,0 | 0,847 |
| | Matrix-Metalloproteinase 13 | <i>Mmp13</i> | NM_008607 | 183 ± 61 | 233 ± 14 | 1,3 | 0,145 |
| | Matrix-Metalloproteinase 14 | <i>Mmp14</i> | NM_008608 | 4971 ± 265 | 4320 ± 277 | 0,9 | 0,029 |
| | Matrix-Metalloproteinase 16 | <i>Mmp16</i> | NM_019724 | 363 ± 159 | 307 ± 42 | 0,8 | 0,496 |
| | Matrix-Metalloproteinase 19 | <i>Mmp19</i> | NM_021412 | 155 ± 29 | 184 ± 38 | 1,2 | 0,319 |
| | Matrix-Metalloproteinase 24 | <i>Mmp24</i> | NM_010808 | 1143 ± 301 | 1312 ± 114 | 1,1 | 0,306 |
| <i>Tissue Inhibitor of Matrix-Metalloproteinases</i> | | | | | | | |
| | Tissue Inhibitor of MMPs 1 | <i>Timp1</i> | NM_011593 | 1041 ± 252 | 1563 ± 90 | 1,5 | 0,007 |
| | Tissue Inhibitor of MMPs 2 | <i>Timp2</i> | NM_011594 | 5735 ± 1176 | 3805 ± 106 | 0,7 | 0,021 |
| | Tissue Inhibitor of MMPs 3 | <i>Timp3</i> | NM_011595 | 6691 ± 2576 | 1312 ± 189 | 0,2 | 0,043 |

Tabelle 4.4: Darstellung des Einflusses einer 24stündigen BL-Behandlung auf die Expression von Fibrose assoziierten Genen. Für diese Untersuchungen wurden konfluente, nicht proliferierende, unbehandelte WT-Zellen (n=5) im Vergleich zu 24 Std. mit BL (10 mg/ml) behandelten WT Zellen (n=5) verwendet und mittels cDNA-Microarray analysiert. Die Genexpressionsänderung wurde wie folgt berechnet: rel. FE der BL-Behandlung / rel. FE der Kontrolle. Der Faktor 1 spricht z.B. eine unveränderte Genexpression unter der BL-Behandlung; Faktor 0,5 für eine um die Hälfte verminderte Genexpression unter der BL-Behandlung und Faktor für eine doppelt so hohe Genexpression unter der BL-Behandlung. Blau unterlegte Gene stellen all jene Gene dar, die laut Literatur besonders relevant für die Entwicklung einer kardialen Fibrose sind.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit sollten Zielgene identifiziert werden, die durch die BL-Behandlung beeinflusst werden und mit den bis dato ermittelten Effekten der WT Zellen (erhöhte Resorutin-Bildung, moderat vermehrte ROS-Produktion, Aktivierung der ERK1/2^{MAPK}, p38^{MAPK} und des Transkriptionsfaktors NF-κB) in Verbindung stehen könnten. Die Auswahl- sowie Analyse Kriterien der c-DNA Microarraydaten wurden wie in Abschnitt 4.1.4 gewählt, wobei eine statistisch signifikante Veränderung mit $P \leq 0,01$ erfüllt wurde. Durch Anwendung dieser Analyse Kriterien wiesen von den 22691 existenten Gensequenzen 105 Sequenzen eine veränderte Expression auf, von denen 22 mit einer unbekanntem und 83 Gensequenzen mit einer bekannten Funktion assoziiert werden konnten. Von den 83 bekannten Gensequenzen wurden bei Vergleich

unbehandelte Kontrollzellen vs. BL-Behandlung 49 Gensequenzen (44 Gene) vermehrt und 34 Gensequenzen (34 Gene) vermindert exprimiert (Abb. 4.24).

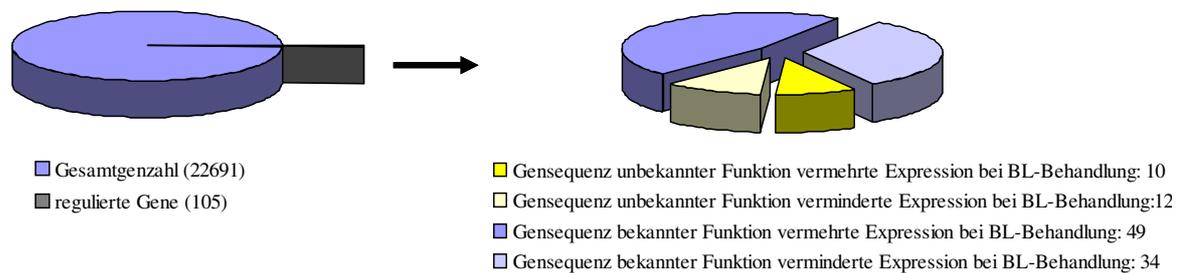


Abb. 4.24: Darstellung der veränderten Genexpression zwischen den unbehandelten Kontroll- und den mit BL behandelten WT Zellen, ausgewertet mittels *Microarray Suite 4.0* Auswertprogramm und MS Excel.

In Abb. 4.25 ist eine Zusammenfassung der Genklassifikation dieser Daten dargestellt, wobei sich die Genklasse der pro-/antioxidativen Gensysteme (10 % der differentiell regulierten Gene) als besonders interessant herausstellte. Bei der Analyse der bekannten Gensequenzen bestätigte sich, dass sehr große Expressionsunterschiede bei Genen auftraten, die mit pro- und/oder antioxidativen Eigenschaften [Mangan-Superoxiddismutase (*Mn-Sod*), Ceruloplasmin (*Cp*), Vanin-1 (*Vnn1*), und Vanin-3 (*Vnn3*), Metallothionein 1 (*Mt1*), Haptoglobin (*Hp*), Aldehyddehydrogenase 3a1 (*Aldh3a1*) N-myc downstream regulated 1 (*NdrG1*), Suppressor of lin 12 (*Sell*)] assoziiert werden. Aufgrund dieser Feststellung wurden weitere Gene, die mit Redoxprozessen in Verbindung stehen, unter Verwendung der Chipdaten, näher analysiert (Tabelle 4.5).

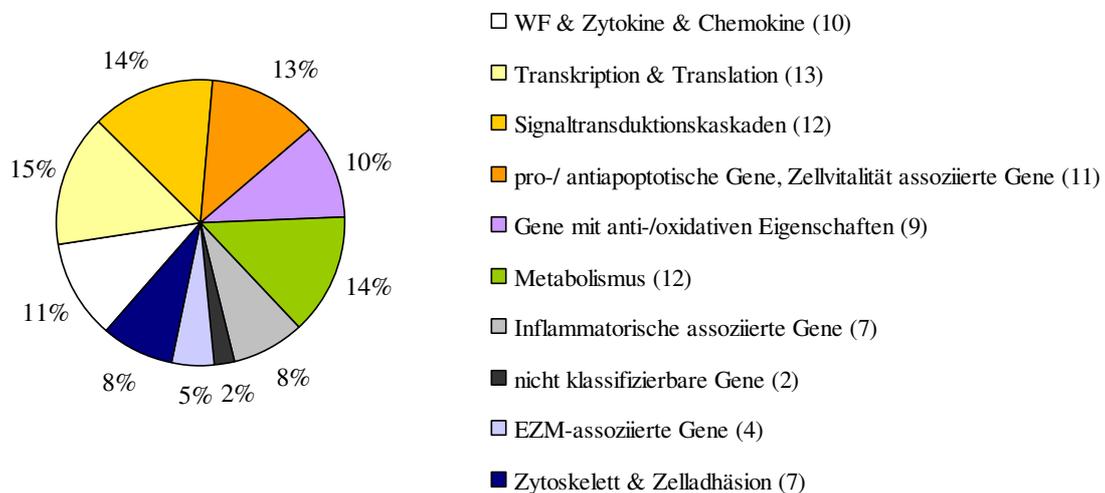


Abb. 4. 25: Molekulare Klassifizierung der signifikant regulierten Gene mittels des NCBI-OMIM und der NCBI-Nukleotid Datenbank.

| | Genname | Kurzform Genname | Genbank Nummer | rel. FE Kontrolle ± STABW | rel. FE BL ± STABW | Genexpressionsänderung BL / Kontrolle | t-Test |
|--|--|----------------------------|-------------------|------------------------------|-----------------------|--|-----------------|
| Gene, assoziiert mit prooxidativen Eigenschaften | | | | | | | |
| <i>NAD(P)H-Oxidase</i> | Cytochrom b-245, beta Polypeptid | <i>gp91^{phox}</i> | NM_007807 | 55 ± 29 | 108 ± 41 | 2,0 | 0,135 |
| | NAD(P)H Oxidase 4 | <i>Nox4</i> | NM_015760 | 30 ± 20 | 7 ± 2 | 0,2 | 0,060 |
| <i>Xanthin-Oxidoreduktase</i> | Xanthin-Dehydrogenase | <i>Xdh</i> | NM_011723 | 734 ± 211 | 761 ± 19 | 1,0 | 0,780 |
| <i>mitochondriale Atmungskette</i> | | | | | | | |
| Komplex I | | | | | | | |
| NADH Dehydrogenase Ubichinon | 1 alpha Subkomplex, 1 | <i>Ndufa1</i> | NM_019443 | 3205 ± 972 | 4729 ± 370 | 1,5 | 0,022 |
| | 1 alpha Subkomplex, 2 | <i>Ndufa2</i> | NM_010855 | 1620 ± 967 | 2303 ± 224 | 1,4 | 0,056 |
| | 1 alpha Subkomplex, 4 | <i>Ndufa4</i> | NM_010886 | 3907 ± 1193 | 4730 ± 631 | 1,2 | 0,250 |
| | 1 alpha Subkomplex, 6 | <i>Ndufa6</i> | NM_025987 | 2402 ± 187 | 3826 ± 417 | 1,6 | 0,060 |
| | 1 alpha Subkomplex, 7 | <i>Ndufa7</i> | NM_023202 | 4524 ± 813 | 5476 ± 476 | 1,2 | 0,080 |
| | 1 beta Subkomplex, 5 | <i>Ndub5</i> | NM_025316 | 1260 ± 442 | 1665 ± 63 | 1,3 | 0,100 |
| | 1 beta Subkomplex, 9 | <i>Ndub9</i> | NM_023172 | 4845 ± 1305 | 6076 ± 433 | 1,3 | 0,110 |
| | Flavoprotein 1 | <i>Ndulfv1</i> | NM_13366 | 3158 ± 127 | 3210 ± 127 | 1,0 | 0,820 |
| | Flavoprotein 2 | <i>Ndulfv2</i> | NM_028388 | 2510 ± 188 | 2562 ± 237 | 1,0 | 0,800 |
| | Fe-S Protein 3 | <i>Ndulfs3</i> | NM_026688 | 2199 ± 520 | 2436 ± 43 | 1,1 | 0,367 |
| | Fe-S Protein 4 | <i>Ndulfs4</i> | NM_010887 | 867 ± 215 | 922 ± 160 | 1,1 | 0,695 |
| Komplex II (Succinat Dehydrogenase) | Untereinheit A, Flavoprotein | <i>Sdha</i> | NM_023291 | 3266 ± 384 | 3753 ± 242 | 1,1 | 0,080 |
| Komplex III (Ubiquinol Cytochrom C Reduktase) | core Protein 1 | <i>Uqcrc1</i> | NM_025407 | 3217 ± 116 | 3493 ± 5 | 1,1 | 0,006 |
| <i>No-Synthase</i> | | | | | | | |
| | neuronale Form (1) | <i>Nos1</i> | NM_008712 | nicht exprimiert | | | |
| | induzierbare Form (2) | <i>Nos2</i> | NM_010927 | nicht exprimiert | | | |
| | endotheliale Form (3) | <i>Nos3</i> | NM_008713 | nicht exprimiert | | | |
| <i>Cytochrome P450</i> | | | | | | | |
| | Familie 1, Unterfamilie B, Polypeptid 1 | <i>Cyp1b1</i> | NM_009994 | 4031 ± 529 | 5012 ± 274 | 1,2 | 0,014 |
| | Familie 4, Unterfamilie F, Polypeptid 13 | <i>Cyp4f13</i> | NM_130882 | 168 ± 37 | 177 ± 44 | 1,1 | 0,768 |
| | Familie 39, Unterfamilie A, Polypeptid 1 | <i>Cyp39a1</i> | NM_018887 | 359 ± 43 | 247 ± 7 | 0,7 | 0,004 |
| | Familie 2, Unterfamilie D, Polypeptid 22 | <i>Cyp2c22</i> | NM_019823 | 511 ± 144 | 559 ± 25 | 1,1 | 0,503 |
| | Familie 51 | <i>Cyp51</i> | NM_020010 | 1083 ± 183 | 743 ± 60 | 0,7 | 0,011 |
| <i>Lipoxygenasen</i> | Arachidon-Lipoxygenase 3 | <i>Aloxe 3</i> | NM_011786 | 115 ± 18 | 143 ± 83 | 1,2 | 0,616 |
| Markergenes oxidativen Stresses | | | | | | | |
| | Stress induziertes Protein | <i>Sip</i> | NM_021897 | 2741 ± 304 | 2752 ± 187 | 1,0 | 0,950 |
| | N-myc downstream regulated 1 | <i>Ndrg1</i> | NM_008681 | 432 ± 71 | 191 ± 57 | 0,4 | 0,002 |
| | suppressor of lin-12 | <i>Sel1</i> | NM_011344 | 162 ± 49 | 38 ± 30 | | 0,004 |
| <i>Vanin-Genfamilie</i> | | | | | | | |
| | Vanin-1 | <i>Vnn1</i> | NM_011704 | 1607 ± 799 | 5676 ± 46 | 3,5 | 0,0003 |
| | Vanin-3 | <i>Vnn3</i> | NM_011979 | 87 ± 29 | 401 ± 30 | 4,6 | 0,0001 |
| Gene, assoziiert mit antioxidativen Eigenschaften | | | | | | | |
| <i>Superoxiddismutase-Familie</i> | | | | | | | |
| | Catalase | <i>Cat</i> | NM_009804 | 776 ± 176 | 805 ± 311 | 1,0 | 0,8910 |
| | Superoxide Dismutase 1, zytosolisch | <i>Cu-Zn-Sod</i> | NM_011434 | 2490 ± 835 | 3764 ± 93 | 1,5 | 0,0267 |
| | Superoxide Dismutase 2, mitochondrial | <i>Mn-Sod</i> | NM_013671 | 1070 ± 238 | 3208 ± 146 | 3,0 | 4,70E-06 |
| | Superoxide Dismutase 3, extrazellulär | <i>Ec-Sod</i> | NM_011435 | 492 ± 70 | 583 ± 105 | 1,2 | 0,270 |
| <i>Glutathion assoziierte Gene</i> | | | | | | | |
| | γ-Glutamylcystein Synthetase | <i>Gcs</i> | NM_008129 | 621 ± 78 | 729 ± 102 | 1,2 | 0,200 |
| | Glutathion-Peroxidase 1 | <i>Gpx1</i> | NM_008160 | 1726 ± 241 | 1996 ± 36 | 1,2 | 0,065 |
| | Glutathion-Peroxidase 4 | <i>Gpx4</i> | NM_008162 | 3227 ± 372 | 4913 ± 224 | 1,5 | 0,0002 |
| | Glutathion-Reductase 1 | <i>Gsr</i> | NM_010344 | 515 ± 99 | 558 ± 52 | 1,1 | 0,298 |
| | Glutathion-S-Transferase, mu 1 | <i>Mgst1</i> | NM_019946 | 7550 ± 1420 | 10639 ± 1406 | 1,4 | 0,035 |
| | Glutathion-S-Transferase, mu 2 | <i>Mgst2</i> | NM_174995 | 148 ± 123 | 290 ± 59 | 2,0 | 0,070 |
| | Glutathion-S-Transferase, mu 3 | <i>Mgst3</i> | NM_025589 | 641 ± 291 | 952 ± 70 | 1,5 | 0,074 |
| | Glutathion-S-Transferase, omega 1 | <i>Gsto1</i> | NM_010362 | 2501 ± 466 | 2365 ± 413 | 0,9 | 0,686 |
| <i>Übergangsmetall-bindende Enzyme</i> | | | | | | | |
| | Ceruloplasmin | <i>Cp</i> | NM_007752 | 740 ± 161 | 1713 ± 129 | 2,3 | 0,0001 |
| | Metallothionein-1 | <i>Mt1</i> | NM_013602 | 2518 ± 924 | 4967 ± 998 | 2,0 | 0,008 |
| | Metallothionein-2 | <i>Mt2</i> | NM_008630 | 1060 ± 262 | 1933 ± 352 | 1,8 | 0,024 |
| | Heme Oxygenase 1 | <i>Hmox1</i> | NM_010442 | 1269 ± 123 | 1970 ± 129 | 1,6 | 0,001 |
| | Haptoglobin | <i>Hp</i> | NM_017370 | 82 ± 105 | 583 ± 62 | 7,0 | 0,0001 |
| <i>Thioredoxin assoziierte Gene</i> | | | | | | | |
| | Peroxiredoxin 1 | <i>Prdx1</i> | NM_011034 | 6301 ± 1356 | 8364 ± 647 | 1,3 | 0,027 |
| | Peroxiredoxin 2 | <i>Prdx2</i> | NM_011563 | 2250 ± 792 | 3059 ± 38 | 1,4 | 0,084 |
| | Peroxiredoxin 3 | <i>Prdx3</i> | NM_007452 | 1963 ± 482 | 2364 ± 165 | 1,2 | 0,146 |
| | Peroxiredoxin 4 | <i>Prdx4</i> | NM_016764 | 151 ± 33 | 180 ± 46 | 1,2 | 0,411 |
| | Thioredoxin Reduktase 1 | <i>Txnrd1</i> | NM_015762 | 2075 ± 445 | 2175 ± 245 | 1,0 | 0,694 |
| | Thioredoxin Reduktase 2 | <i>Txnrd2</i> | NM_013711 | 99 ± 13 | 103 ± 29 | 1,0 | 0,850 |
| | Thioredoxin bindende Protein | <i>Txnip</i> | NM_023719 | 2837 ± 1163 | 1554 ± 92 | 0,5 | 0,068 |
| <i>Aldehyd-Dehydrogenase</i> | | | | | | | |
| | Aldehyd-Dehydrogenase Familie 3 | <i>Aldh3a1</i> | NM_007436 | 860 ± 518 | 1872 ± 78 | 2,2 | 0,011 |
| | Unterfamilie A1 | | | | | | |

Tabelle 4.5: Darstellung des Einflusses des BL-Extraktes auf wichtigste zelluläre pro-/antioxidative Gene, analysiert mittels der cDNA-Microarray Daten. Die Durchführung und Auswertung der cDNA-Microarrays erfolgte wie in Tabelle 4.4 angegeben. Grün unterlegte Gene erfüllten die Ausgangskriterien der Gen-Chip Analyse (*present*, mindestens zweifache Veränderung, $P \leq 0,01$), wohingegen blau unterlegte Gene eine hohe Expressionsveränderung aufwiesen, jedoch nicht alle Kriterien erfüllten.

In Abschnitt 4.2.5 wurde der Einfluss der AGE-reichen Nahrungsmittlextrakte auf jene für die Entwicklung einer kardialen Fibrose wichtigen Gene (Tabelle 4.4: blau unterlegte Gene), vorwiegend mittels RT-PCR, analysiert. Die Analyse der durch die BL-Behandlung stark regulierten pro-/antioxidativen Gene wurde in Abschnitt 4.2.6 weitergehend beschrieben.

4.2.5 Einfluss der Nahrungsmittelextrakte auf die mögliche Entwicklung einer kardialen Fibrose und zelluläre, morphologische Veränderungen

Einfluss des BKE/BL-Extraktes auf Fibrose assoziierte Genmarker:

Im Anschluss sollten die durch cDNA-Microarray analysierten Gene (Tabelle 4.4; blau unterlegte Gene), die an der Ausbildung einer potentiellen Fibrose involviert sein könnten, durch RT-PCR verifiziert werden. Die BKE-Behandlung beider Zelllinien induzierte nach 4 Std. eine kurzfristige aber nicht signifikant vermehrte *Tgf-β1* mRNA-Expression (bedingt durch einen „Ausreißer“), die jedoch nach 6 Std. wieder auf Kontrollniveau sank. *Tgf-β2* und *Tgf-β3* hingegen wurden durch die BKE-Behandlung vermindert exprimiert, wobei der Effekt bei den WT Zellen lang anhaltender ausgeprägt war. Die BL-Behandlung hingegen führte bei beiden Zelllinien zu keiner veränderten mRNA-Expression der TGF-β Isoformen, obschon die cDNA-Microarray Daten nach 24 Std. eine tendenzielle Verminderung der Expression aller drei *Tgf-β*-Isoformen auswiesen.

transforming growth factor

| WT Zellen | <i>Tgf-β1</i> | | <i>Tgf-β2</i> | | <i>Tgf-β3</i> | |
|-----------|---------------|----------|------------------|----------|-----------------|----------|
| Std. | BKE | BL | BKE | BL | BKE | BL |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 4 | 418 ± 117 | 145 ± 27 | 78 ± 5 * | 98 ± 7 | 62 ± 7 * | 89 ± 10 |
| 6 | 157 ± 57 | 123 ± 32 | 68 ± 10 * | 91 ± 3 | 88 ± 7 | 99 ± 5 |
| 18 | 168 ± 26 | 129 ± 22 | 83 ± 9 | 107 ± 3 | 85 ± 7 | 110 ± 8 |
| 32 | 98 ± 25 | 130 ± 3 | 63 ± 5 ** | 117 ± 4 | 75 ± 7 * | 123 ± 21 |
| 64 | 89 ± 38 | 103 ± 16 | 71 ± 7 * | 114 ± 16 | 70 ± 8 * | 114 ± 16 |

| RAGE KO | <i>Tgf-β1</i> | | <i>Tgf-β2</i> | | <i>Tgf-β3</i> | |
|---------|---------------|----------|-----------------|----------|-----------------|----------|
| Std. | BKE | BL | BKE | BL | BKE | BL |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 4 | 201 ± 65 | 166 ± 53 | 67 ± 6 * | 97 ± 10 | 71 ± 7 * | 100 ± 11 |
| 6 | 160 ± 30 | 183 ± 32 | 85 ± 15 | 96 ± 9 | 99 ± 4 | 99 ± 9 |
| 18 | 140 ± 16 | 134 ± 14 | 107 ± 32 | 94 ± 5 | 106 ± 2 | 90 ± 8 |
| 32 | 122 ± 40 | 115 ± 26 | 87 ± 5 | 125 ± 20 | 104 ± 18 | 103 ± 9 |
| 64 | 122 ± 54 | 165 ± 64 | 100 ± 0 | 102 ± 7 | 109 ± 26 | 91 ± 9 |

Tabelle 4.6 a: Darstellung der Expressionsanalysen des *transforming growth factors*. Konfluente unter Serumreduktion kultivierte WT-, RAGE KO Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit BKE/BL (10 mg/ml) behandelt und anschließend RNA isoliert. Die aufgelisteten Gene wurden durch RT-PCR Analyse quantifiziert und auf 18 S rRNA normiert, wobei die unbehandelten Kontrollzellen auf 100 % gesetzt wurden. ($MW_{\text{aller Experimente}} \pm \text{SEM}$; $n = 3$; * $P \leq 0,05$ vs. unbehandelte Kontrolle; ** $P \leq 0,01$ vs. unbehandelte Kontrolle). Die blaue Markierung repräsentierte die WT-Zellen, wohingegen RAGE KO Zellen durch die grüne Markierung gekennzeichnet wurden.

Bei der Analyse der mRNA-Expression der MMPs zeigte sich, dass diese zumeist nicht signifikant verändert reguliert wurden (*Mmp2*, *Mmp14*). Einzig eine tendenziell vermehrte *Mmp9* mRNA-Expression konnte durch BL-Behandlung sowie eine tendenziell vermehrte *Mmp13* mRNA-Expression bei beiden Fraktionen gefunden werden. Ein Vergleich der RT-PCR Daten mit den cDNA-Microarray Ergebnissen zeigte, dass die MMPs durch die Brotkrustenextraktbehandlung im Allgemeinen wenig beeinflusst wurden.

Matrixmetalloproteinasen

| WT Zellen | <i>Mmp2</i> | | <i>Mmp9</i> | | <i>Mmp13</i> | | <i>Mmp14</i> | |
|-----------|-------------|----------|-------------|-----------|-------------------|----------|--------------|----------|
| Std. | BKE | BL | BKE | BL | BKE | BL | BKE | BL |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 4 | 71 ± 12 | 88 ± 22 | 119 ± 21 | 508 ± 101 | 195 ± 20 * | 136 ± 24 | 77 ± 10 | 109 ± 11 |
| 6 | 79 ± 6 | 134 ± 31 | 127 ± 17 | 316 ± 22 | 215 ± 42 | 114 ± 15 | 96 ± 32 | 94 ± 14 |
| 18 | 118 ± 32 | 144 ± 16 | 124 ± 22 | 150 ± 15 | 207 ± 57 | 122 ± 29 | 89 ± 7 | 115 ± 7 |
| 32 | 105 ± 37 | 161 ± 14 | 142 ± 46 | 187 ± 56 | 202 ± 70 | 134 ± 31 | 77 ± 14 | 127 ± 6 |
| 64 | 121 ± 41 | 125 ± 28 | 35 ± 10 * | 59 ± 18 | 147 ± 26 | 130 ± 32 | 78 ± 11 | 139 ± 15 |

| RAGE KO | <i>Mmp2</i> | | <i>Mmp9</i> | | <i>Mmp13</i> | | <i>Mmp14</i> | |
|---------|-------------|---------|-------------|------------------|--------------|-----------|--------------|----------|
| Std. | BKE | BL | BKE | BL | BKE | BL | BKE | BL |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 4 | 84 ± 6 | 104 ± 9 | 144 ± 19 | 350 ± 48 | 207 ± 99 | 352 ± 142 | 111 ± 21 | 123 ± 20 |
| 6 | 78 ± 28 | 108 ± 6 | 235 ± 66 | 444 ± 68 | 172 ± 91 | 308 ± 122 | 108 ± 17 | 100 ± 15 |
| 18 | 98 ± 4 | 118 ± 2 | 131 ± 51 | 267 ± 6 * | 144 ± 63 | 151 ± 60 | 104 ± 10 | 88 ± 10 |
| 32 | 134 ± 37 | 143 ± 9 | 96 ± 57 | 316 ± 79 | 191 ± 105 | 186 ± 46 | 144 ± 44 | 124 ± 19 |
| 64 | 113 ± 22 | 122 ± 9 | 159 ± 96 | 161 ± 4 * | 144 ± 44 | 154 ± 28 | 100 ± 9 | 83 ± 11 |

Tabelle 4.6 b: Darstellung der Expressionsanalysen der Matrixmetalloproteinasen. Hierbei erfolgte die Durchführung wie in Tabelle 4.6a angegeben.

Das mRNA Niveau der TIMPs wurde bei der BKE/BL-Behandlung unterschiedlich reguliert. Die *Timp1* zeigte bei beiden Extrakten und Zelllinien eine signifikant vermehrte Expression nach 4 Std., die bis zu 18 Std. anhielt, aber das Signifikanzniveau nicht immer erreichte. Das mRNA Niveau der *Timp2* sowie *Timp3* wurde durch die BKE/BL-Stimulation bei beiden Zelllinien nicht beeinflusst. Die gewonnenen RT-PCR Daten der WT Zellen stimmen nur begrenzt mit den cDNA-Microarray Analysen überein. Hier konnte eine nur schwach vermehrte *Timp1* Expression nachgewiesen werden, wohingegen *Timp2*, -3 beide vermindert exprimiert wurden.

tissue inhibitors of matrixmetalloproteinases

| WT Zellen | <i>Timp1</i> | | <i>Timp2</i> | | <i>Timp3</i> | |
|-----------|--------------------|--------------------|--------------|---------|-----------------|----------|
| Std. | BKE | BL | BKE | BL | BKE | BL |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 4 | 549 ± 63 ** | 897 ± 96 * | 91 ± 10 | 10 ± 15 | 98 ± 9 | 121 ± 5 |
| 6 | 664 ± 145 * | 862 ± 107 * | 111 ± 12 | 87 ± 4 | 88 ± 20 | 112 ± 12 |
| 18 | 578 ± 78 ** | 393 ± 139 | 119 ± 19 | 108 ± 4 | 75 ± 11 | 101 ± 6 |
| 32 | 357 ± 111 | 379 ± 116 | 108 ± 20 | 112 ± 6 | 74 ± 7 * | 132 ± 28 |
| 64 | 176 ± 37 | 170 ± 56 | 101 ± 17 | 99 ± 11 | 68 ± 6 * | 123 ± 13 |

| RAGE KO | <i>Timp1</i> | | <i>Timp2</i> | | <i>Timp3</i> | |
|---------|--------------------|--------------------|--------------|----------|-----------------|----------|
| Std. | BKE | BL | BKE | BL | BKE | BL |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 4 | 761 ± 151 * | 604 ± 115 * | 82 ± 6 | 105 ± 19 | 74 ± 9 | 100 ± 13 |
| 6 | 773 ± 152 * | 702 ± 164 | 93 ± 10 | 103 ± 5 | 95 ± 14 | 90 ± 4 |
| 18 | 404 ± 139 | 323 ± 198 | 91 ± 8 | 95 ± 7 | 80 ± 5 * | 90 ± 1 |
| 32 | 220 ± 118 | 213 ± 112 | 99 ± 23 | 125 ± 14 | 102 ± 36 | 110 ± 8 |
| 64 | 117 ± 22 | 160 ± 48 | 93 ± 7 | 113 ± 19 | 99 ± 20 | 104 ± 10 |

Tabelle 4.6 c: Darstellung der Expressionsanalysen der tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. Hierbei erfolgte die Durchführung wie in Tabelle 4.6a angegeben.

Bei der Analyse des Einflusses der BL-Behandlung auf die EZM-Proteine zeigte sich, dass über den analysierten Zeitraum von 4 bis 64 Std. das mRNA-Expressionsniveau der Prokollagene (*Coll1a1*, *Col3a1*, *Col4a1*) sowie des *Lamb2* und *Fbln5* beider Zelllinien nicht verändert wurde. Diese Daten entsprechen bis auf die *Fbln5* Expression (signifikant verminderte Expression) jenen, die mittels cDNA-Microarray Analyse gefunden wurden. Andere Effekte wurden bei der Verwendung des Gesamtextraktes erzielt. Hier führte diese Behandlung bei den WT Zellen langfristig (nach 64 Std.) zu einer verminderten mRNA-Expression von *Coll1a1*, *Col3a1* und *Fbln5*. Die mRNA-Expression des *Col4a1* sowie des *Lamb2* wurde hingegen nicht verändert. Bei

den RAGE KO Zellen konnte eine verminderte mRNA-Expression nach 64 Std. nur für das *Col3a1* gefunden werden. Alle anderen Gene wie *Coll1a1*, *Col4a1*, *Lamb2* und *Fbln5* zeigten kein verändertes Expressionsniveau.

Kollagene und EZM Proteine

| WT Zellen | <i>Coll1a1</i> | | <i>Col3a1</i> | | <i>Col4a1</i> | | <i>Lamb2</i> | | <i>Fbln5</i> | |
|-----------|-----------------|----------|-----------------|---------|---------------|----------|--------------|----------|-------------------|----------|
| Std. | BKE | BL | BKE | BL | BKE | BL | BKE | BL | BKE | BL |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 4 | 68 ± 12 | 89 ± 5 | 71 ± 24 | 78 ± 20 | 176 ± 39 | 178 ± 37 | 112 ± 5 | 131 ± 27 | 71 ± 10 * | 115 ± 12 |
| 6 | 117 ± 9 | 114 ± 20 | 70 ± 24 | 72 ± 18 | 158 ± 30 | 173 ± 20 | 124 ± 25 | 102 ± 6 | 60 ± 11 ** | 97 ± 4 |
| 18 | 70 ± 4 * | 108 ± 10 | 90 ± 4 | 97 ± 6 | 158 ± 49 | 110 ± 11 | 103 ± 30 | 120 ± 13 | 41 ± 3 * | 122 ± 20 |
| 32 | 68 ± 13 | 105 ± 15 | 76 ± 9 | 87 ± 21 | 115 ± 27 | 138 ± 26 | 99 ± 21 | 108 ± 9 | 52 ± 10 * | 130 ± 11 |
| 64 | 53 ± 4 * | 100 ± 8 | 43 ± 9 * | 76 ± 14 | 68 ± 22 | 146 ± 45 | 95 ± 15 | 103 ± 2 | 68 ± 6 * | 125 ± 19 |

| RAGE KO | <i>Coll1a1</i> | | <i>Col3a1</i> | | <i>Col4a1</i> | | <i>Lamb2</i> | | <i>Fbln5</i> | |
|---------|----------------|----------|-----------------|----------|---------------|----------|--------------|----------|--------------|----------|
| Std. | BKE | BL | BKE | BL | BKE | BL | BKE | BL | BKE | BL |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 4 | 114 ± 24 | 94 ± 7 | 103 ± 32 | 90 ± 21 | 113 ± 9 | 132 ± 22 | 88 ± 5 | 100 ± 17 | 85 ± 10 | 89 ± 25 |
| 6 | 81 ± 23 | 106 ± 7 | 109 ± 17 | 74 ± 21 | 127 ± 13 | 130 ± 16 | 110 ± 16 | 103 ± 8 | 80 ± 6 | 93 ± 12 |
| 18 | 76 ± 8 | 87 ± 6 | 94 ± 13 | 76 ± 13 | 120 ± 15 | 103 ± 11 | 102 ± 2 | 92 ± 10 | 68 ± 16 | 91 ± 19 |
| 32 | 117 ± 29 | 113 ± 15 | 103 ± 22 | 104 ± 33 | 155 ± 48 | 137 ± 14 | 115 ± 33 | 109 ± 5 | 78 ± 19 | 112 ± 28 |
| 64 | 85 ± 23 | 106 ± 1 | 74 ± 6 * | 138 ± 79 | 124 ± 7 | 133 ± 43 | 113 ± 23 | 105 ± 11 | 82 ± 25 | 136 ± 38 |

Tabelle 4.6 d: Darstellung der Expressionsanalysen der EZM-Proteine (Prokollagene, Laminine, Fibuline). Hierbei erfolgte die Durchführung wie in Tabelle 4.6a angegeben.

RT-PCR Analysen der zeitabhängigen BKE-Stimulation beider Zelllinien führten zu einer kurzfristigen aber nicht signifikanten Induktion der Myofibroblastenmarker *Acta2* sowie *Tpm1* (4 Std.), welche jedoch langfristig (nach 64 Std.) deutlich und signifikant unter das Kontrollniveau sanken. Diese Effekte konnten mit der löslichen Brotkrustenfraktion nicht beobachtet werden. Nur bei den WT Zellen sank die *Tpm1* mRNA-Expression nach 64 Std. signifikant unter das Kontrollniveau.

Myofibroblastenmarkergene

| WT Zellen | <i>Acta2</i> | | <i>Tpm1</i> | | RAGE KO | <i>Acta2</i> | | <i>Tpm1</i> | |
|-----------|------------------|----------|-----------------|-----------------|---------|------------------|----------|-----------------|----------|
| Std. | BKE | BL | BKE | BL | Std. | BKE | BL | BKE | BL |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 4 | 503 ± 147 | 154 ± 17 | 144 ± 15 | 103 ± 2 | 4 | 157 ± 65 | 119 ± 12 | 95 ± 3 | 113 ± 12 |
| 6 | 433 ± 131 | 106 ± 17 | 114 ± 9 | 78 ± 10 | 6 | 143 ± 42 | 104 ± 10 | 103 ± 3 | 88 ± 4 |
| 18 | 48 ± 11 * | 101 ± 7 | 88 ± 9 | 78 ± 9 | 18 | 53 ± 10 * | 84 ± 5 | 83 ± 9 | 98 ± 3 |
| 32 | 94 ± 28 | 94 ± 18 | 89 ± 15 | 87 ± 12 | 32 | 125 ± 51 | 132 ± 6 | 86 ± 20 | 97 ± 4 |
| 64 | 39 ± 31 * | 101 ± 25 | 70 ± 6 * | 85 ± 4 * | 64 | 63 ± 2 * | 82 ± 20 | 77 ± 5 * | 94 ± 16 |

Tabelle 4.6 e: Darstellung der Expressionsanalysen der Myofibroblasten assoziierten Genmarker. Hierbei erfolgte die Durchführung wie in Tabelle 4.6a angegeben.

Einfluss des Kaffeextraktes auf Fibrose assoziierte Genmarker: Analysen des Einflusses des Kaffeextraktes auf die Entwicklung einer kardialen Fibrose wurden durch konzentrationsabhängige Untersuchungen an WT Zellen (24 Std.) durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die unterschiedlichen KE-Konzentrationen zu keiner Veränderung der Expression der verschiedenen *Tgf-β Isoformen* führten.

transforming growth factor

| WT KE (mg/ml) | <i>Tgf-β1</i> | <i>Tgf-β2</i> | <i>Tgf-β3</i> |
|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 0 | 100 | 100 | 100 |
| 0,01 | 128 ± 4 | 93 ± 16 | 91 ± 6 |
| 0,03 | 125 ± 7 | 96 ± 10 | 100 ± 5 |
| 0,1 | 114 ± 7 | 94 ± 10 | 94 ± 2 |
| 0,3 | 121 ± 11 | 95 ± 7 | 99 ± 3 |
| 0,8 | 148 ± 9 * | 108 ± 19 | 94 ± 9 |

Tabelle 4.7.a: Darstellung der Expressionsanalysen des transforming growth factors β Konfluente unter Serumreduktion kultivierte WT Zellen wurden für mit den angegebenen KE-Konzentrationen für 24 Std. behandelt und anschließend RNA isoliert. Die aufgelisteten Gene wurden durch RT-PCR Analyse quantifiziert und auf 18 S rRNA normalisiert, wobei die unbehandelten Kontrollzellen auf 100 % normiert wurden. (MW_{aller Experimente} ± SEM, n = 3, *P ≤ 0,05 vs. unbehandelte Kontrolle; **P ≤ 0,01 vs. unbehandelte Kontrolle).

Die MMP mRNA-Expression hingegen wurden differentiell reguliert. Besonders bei den höheren Konzentrationen (KE: 0,8 mg/ml) wurde eine signifikant verminderte mRNA-Expression der *Mmp2* und *Mmp14* gefunden. Das Expressionsniveau der *Mmp13* wurde durch keine der verwendeten KE-Konzentrationen beeinflusst, wohingegen die *Mmp9* mRNA bei allen Konzentrationen eindeutig signifikant vermindert wurde. Die Inhibitoren der MMPs - die TIMPs – wurden durch die KE-Behandlung nicht verändert reguliert.

| Matrixmetalloproteinasen | | | | <i>tissue inhibitors of matrixmetalloproteinases</i> | | | |
|--------------------------|----------------|-----------------|--------------|--|--------------|--------------|--------------|
| WT KE (mg/ml) | <i>Mmp2</i> | <i>Mmp9</i> | <i>Mmp13</i> | <i>Mmp14</i> | <i>Timp1</i> | <i>Timp2</i> | <i>Timp3</i> |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 0,01 | 93 ± 19 | 22 ± 10* | 96 ± 8 | 120 ± 18 | 85 ± 16 | 89 ± 10 | 96 ± 11 |
| 0,03 | 89 ± 16 | 18 ± 6** | 88 ± 5 | 101 ± 12 | 101 ± 8 | 91 ± 12 | 94 ± 0 |
| 0,1 | 98 ± 18 | 23 ± 13* | 99 ± 4 | 97 ± 19 | 97 ± 18 | 93 ± 2 | 80 ± 9 |
| 0,3 | 97 ± 22 | 37 ± 18* | 92 ± 1 | 84 ± 14 | 117 ± 23 | 87 ± 18 | 93 ± 13 |
| 0,8 | 55 ± 8* | 21 ± 3** | 105 ± 15 | 60 ± 3** | 147 ± 87 | 93 ± 23 | 94 ± 19 |

Tabelle 4.7 b: Darstellung der Expressionsanalysen der Matrixmetalloproteinasen und der *tissue inhibitors of metalloproteinases* Hierbei erfolgte die Durchführung wie in Tabelle 4.7a angegeben.

Die mRNA-Expression der EZM-Proteine wie *Lamb2*, *Fbln5* und *Col4a1* wurden durch die Behandlung mit dem AGE-reichen KE-Extrakt nicht verändert reguliert. Bei *Colla1* sowie *Col3a1* wurde bei hohen KE-Konzentrationen ein vermindertes mRNA-Niveau der beiden Gene gefunden. Analysen der beiden Myofibroblastenmarkergene zeigten keine veränderte Expression dieser Gene bei KE-Behandlung.

| Kollagene und EZM Proteine | | | | Myofibroblastenmarker | | | |
|----------------------------|-----------------|----------------|---------------|-----------------------|--------------|----------------|-------------|
| WT KE (mg/ml) | <i>Colla1</i> | <i>Col3a1</i> | <i>Col4a1</i> | <i>Lamb2</i> | <i>Fbln5</i> | <i>Acta2</i> | <i>Tpm1</i> |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 0,01 | 100 ± 14 | 69 ± 11 | 204 ± 85 | 96 ± 9 | 91 ± 8 | 96 ± 4 | 96 ± 5 |
| 0,03 | 94 ± 3 | 93 ± 14 | 201 ± 72 | 104 ± 3 | 103 ± 17 | 90 ± 12 | 98 ± 13 |
| 0,1 | 78 ± 10 | 77 ± 21 | 90 ± 51 | 105 ± 1 | 114 ± 11 | 88 ± 12 | 95 ± 9 |
| 0,3 | 80 ± 4* | 88 ± 16 | 212 ± 100 | 105 ± 5 | 118 ± 4 | 95 ± 15 | 96 ± 10 |
| 0,8 | 60 ± 3** | 32 ± 7* | 151 ± 56 | 95 ± 13 | 90 ± 11 | 48 ± 8* | 126 ± 12 |

Tabelle 4.7 c: Darstellung der Expressionsanalysen der EZM-Proteine und Myofibroblastenmarker. Hierbei erfolgte die Durchführung wie in Tabelle 4.7a angegeben.

Die allgemeine verminderte mRNA Genexpression bei der höchsten KE-Konzentration von 0,8 mg/ml ist relativ überraschend und mag eventuell mit dem allgemein toxischen Potential des KE korrelieren. Allerdings zeigte sich auch, dass besonders die MMPs (besonders die *MMP9*) in ihrer mRNA-Expression unter KE-Behandlung vermindert wurden. Um zu analysieren, ob dies auch einen Einfluss auf die Aktivität dieser Enzyme ausübt, wurden Zymographien mit unterschiedlichen KE-Konzentrationen an konfluenten unter Serumreduktion kultivierten WT-Zellen durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass zymographisch nur die Aktivität der MMP2 (~66 kDa) bestimmt werden konnte, deren Aktivität ab einer Konzentration von 0,1 mg/ml vermindert wurde. Eine Veränderung der MMP2-Aktivität durch die BKE-Behandlung der Zelllinie wurde nicht gefunden.

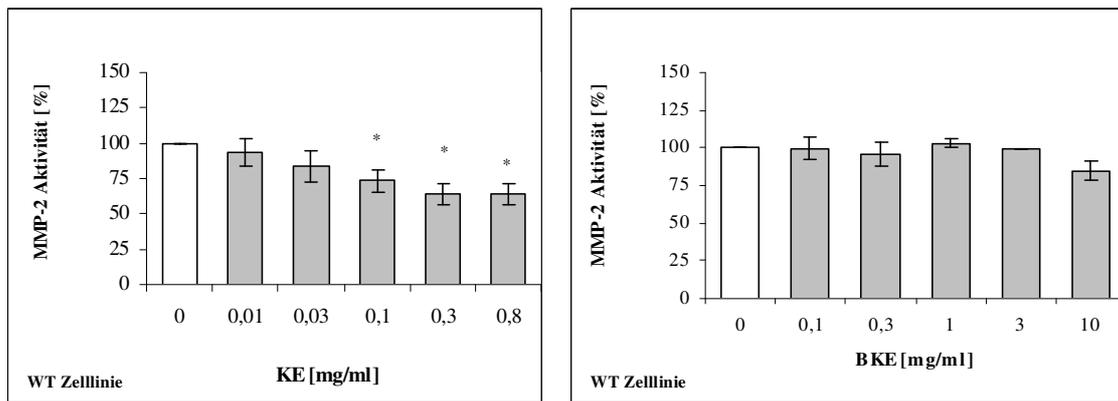


Abb. 4.26: Analyse des Einflusses des KE/BKE-Extraktes auf die MMP2-Aktivität der WT Zelllinie
 Konfluente unter Serumreduktion kultivierte WT Zellen wurden mit den angegebenen KE-/BKE-Konzentrationen stimuliert, nach 24 Std. der Zellkulturüberstand abgenommen und die Zellzahl zu jeder Probe bestimmt. Die MMP2-Aktivität wurde durch Zymographie analysiert, wobei die unbehandelten Kontrollen auf 100 % normiert wurden. ($MW_{\text{aller Experimente}} \pm \text{SEM}$; $n = 5$ (KE); $n = 2$ (BKE) * $P \leq 0,05$ vs. unbehandelte Kontrollzellen).

4.2.6 Analyse des Einflusses der AGE-reichen Brotkrustenfraktionen auf die vermehrte mRNA-Expression von pro-/antioxidativen Genen

Validierung der Chipdaten durch RT-PCR Analyse: Essentielle pro- sowie antioxidative Gene wurden durch RT-PCR Analyse mittels zeitabhängiger Stimulation unter Verwendung der BKE/BL-Fraktion (10 mg/ml) anhand der WT- sowie RAGE KO Zelllinie verifiziert. Die Ergebnisse sind repräsentativ in Abb.4.27 und in Tabelle 4.8 aufgeführt.

| | MFB WT | | | | | | RAGE KO | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------|--|---|---|-----|----|----|---------|---|---|-----|----|----|---|---|---|----|----|----|---|---|---|----|----|----|
| | BL | | | BKE | | | BL | | | BKE | | | | | | | | | | | | | | |
| | prooxidative Gene | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 0 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 0 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 0 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 0 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 |
| <i>gp91^{phox}</i> | [Gel bands] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Nox4</i> | [Gel bands] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Xdh</i> | [Gel bands] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Gene, assoziiert mit „oxidativen Stressantworten“ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Sip</i> | [Gel bands] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Vnn1</i> | [Gel bands] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Vnn3</i> | [Gel bands] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | antioxidative Gene | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Sod 1</i> | [Gel bands] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Sod 2</i> | [Gel bands] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Sod3</i> | [Gel bands] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Cat</i> | [Gel bands] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Cp</i> | [Gel bands] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Mt1</i> | [Gel bands] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Mt2</i> | [Gel bands] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | „housekeeping Gen“ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>18S</i> | [Gel bands] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Abb. 4.27: Verifizierung der cDNA Microarray Resultate durch RT-PCR Analysen
 Konfluente unter Serumreduktion kultivierte WT- sowie RAGE KO Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit BKE bzw. BL (10 mg/ml) behandelt, die RNA isoliert, Gene per RT-PCR Reaktionen quantifiziert und das jeweilige Expressionsniveau durch einen 18 S rRNA Abgleich normalisiert. In dieser Abbildung ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Analyse prooxidativer Gene: Die funktionelle $gp91^{phox}$ Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase wurde laut cDNA-Microarray vermehrt exprimiert, erreichte jedoch kein Signifikanzniveau. RT-PCR Analysen zeigten eine eindeutig rezeptorunabhängig vermehrte mRNA-Expression (~ 2,5 bis 3fache) dieser NAD(P)H-Oxidase Untereinheit bei beiden Fraktionen, die allgemein über den Versuchszeitraum erhöht blieb. Eine homologe Untereinheit der $gp91^{phox}$ stellt das *Nox4* dar, welches laut cDNA-Microarray Daten nur in sehr geringen Mengen exprimiert wird. Bei den RT-PCR Analysen zeigte sich ein meist nach 4 Std. signifikant vermindertes mRNA-Expressionsniveau dieser Untereinheit, welches anschließend wieder auf Kontrollniveau anstieg. Differenzen hinsichtlich der cDNA-Microarray Analysen und den RT-PCR Ergebnissen zeigten sich bei der *Xdh*. Bei den cDNA-Microarray Analysen konnten keinerlei mRNA-Expressionsveränderungen dieses Genes gefunden werden. Die zeitabhängigen BKE/BL-Stimulation beider Zelllinien führte jedoch zu einer vermehrten *Xdh* mRNA-Expression, wobei der Effekt bei den WT mit dem Gesamtextrakt am stärksten ausgeprägt war.

Gene, assoziiert mit prooxidativen Eigenschaften

| WT (Std.) | $gp91^{phox}$ | | <i>Nox4</i> | | <i>Xdh</i> | |
|--------------|-------------------|--------------------|-----------------|-----------------|--------------------|--------------------|
| | BKE | BL | BKE | BL | BKE | BL |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 4 | 231 ± 31 * | 244 ± 39 | 31 ± 8 * | 47 ± 9 * | 233 ± 26 * | 121 ± 3 |
| 8 | 290 ± 65 | 237 ± 25 * | 82 ± 11 | 96 ± 8 | 494 ± 116 * | 149 ± 7 * |
| 16 | 282 ± 43 * | 274 ± 37 ** | 133 ± 34 | 123 ± 13 | 504 ± 34 ** | 189 ± 20 ** |
| 32 | 202 ± 34 | 193 ± 16 * | 119 ± 32 | 87 ± 13 | 476 ± 121 * | 161 ± 2 ** |
| 64 | 173 ± 37 | 181 ± 14 * | 97 ± 9 | 116 ± 2 | 313 ± 40 * | 174 ± 10 * |

| RAGE KO (Std.) | $gp91^{phox}$ | | <i>Nox4</i> | | <i>Xdh</i> | |
|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|----------|-------------------|-------------------|
| | BKE | BL | BKE | BL | BKE | BL |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 4 | 239 ± 35 | 393 ± 30 | 31 ± 4 ** | 91 ± 2 | 181 ± 10 * | 147 ± 11 * |
| 8 | 307 ± 50 * | 382 ± 144 | 59 ± 14 | 87 ± 24 | 190 ± 16 * | 164 ± 13 * |
| 16 | 304 ± 41 * | 361 ± 167 | 68 ± 19 | 99 ± 11 | 157 ± 3 * | 140 ± 9 * |
| 32 | 190 ± 25 | 339 ± 57 * | 74 ± 25 | 109 ± 37 | 159 ± 29 | 136 ± 10 |
| 64 | 177 ± 39 | 330 ± 43 * | 74 ± 31 | 109 ± 5 | 115 ± 18 | 129 ± 15 |

Tabelle 4.8 a: Analyse der zeitabhängigen Expressionsveränderung von prooxidativen Genen durch die BKE/BL-Behandlung beider Zelllinien. Darstellung der Expression von pro-/antioxidativer Gene nach zeitabhängiger BKE/BL-Behandlung der WT- und RAGE KO Zelllinien im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen (n = 3; MW ± SEM; *P ≤ 0,05 vs. unbehandelte Kontrolle; **P ≤ 0,01 vs. unbehandelte Kontrolle).

Analyse von Genen, die mit „oxidativen Stressantworten“ assoziiert werden: Mittels cDNA-Microarray Analyse wurde eine erhöhte Expression der Vanin-Gene (*Vnn1*, *Vnn3*) nach BL-Behandlung nachgewiesen. Diese Effekte konnten auch bei den folgenden RT-PCR Studien bei beiden Zelllinien mit den BKE/BL-Fraktionen gefunden werden. Allerdings wurde *Vnn1* bei den RAGE KO Zellen deutlich schwächer induziert als bei der RAGE exprimierenden WT Zelllinie. Die *Vnn3* mRNA Stimulation durch die Behandlung war hingegen bei beiden Zelllinien vergleichbar ausgeprägt. Ein Markergen des oxidativen Stresses, das *stress induced protein (Sip)*, wurde weder bei den cDNA-Microarray Analyse noch bei den verifizierenden RT-PCR Analysen verändert exprimiert.

Gene, assoziiert mit oxidativen Stressantworten

| WT (Std.) | Vnn1 | | Vnn3 | | Sip | |
|--------------|-------------|-------------|--------------|--------------|----------|---------|
| | BKE | BL | BKE | BL | BKE | BL |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 4 | 304 ± 71 | 275 ± 25 * | 506 ± 161 | 823 ± 85 * | 93 ± 14 | 97 ± 5 |
| 8 | 628 ± 154 * | 318 ± 12 ** | 1233 ± 389 | 926 ± 177 | 95 ± 6 | 97 ± 6 |
| 16 | 769 ± 276 | 213 ± 51 * | 1326 ± 393 * | 838 ± 128 ** | 86 ± 5 * | 99 ± 5 |
| 32 | 493 ± 85 * | 247 ± 67 | 1339 ± 422 | 793 ± 91 * | 89 ± 8 | 110 ± 5 |
| 64 | 410 ± 77 * | 239 ± 26 * | 688 ± 224 | 639 ± 47 * | 79 ± 15 | 98 ± 9 |

| RAGE KO (Std.) | Vnn1 | | Vnn3 | | Sip | |
|-------------------|------------|-----------|--------------|--------------|----------|----------|
| | BKE | BL | BKE | BL | BKE | BL |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 4 | 148 ± 16 | 146 ± 22 | 511 ± 81 * | 631 ± 88 * | 88 ± 6 | 111 ± 19 |
| 8 | 199 ± 22 * | 148 ± 8 * | 1143 ± 220 * | 1457 ± 279 * | 99 ± 8 | 106 ± 13 |
| 16 | 206 ± 21 * | 139 ± 7 * | 1496 ± 267 * | 1103 ± 422 | 98 ± 2 | 88 ± 14 |
| 32 | 208 ± 67 | 140 ± 9 * | 743 ± 198 | 670 ± 375 | 107 ± 26 | 103 ± 11 |
| 64 | 148 ± 38 | 124 ± 19 | 685 ± 136 * | 512 ± 198 | 90 ± 4 | 98 ± 17 |

Tabelle 4.8 b: Analyse der zeitabhängigen Expressionsveränderung von Genen, die mit „oxidativen Stressantworten“ assoziiert werden, durch BKE/BL-Behandlung beider Zelllinien Die Durchführung der Analysen erfolgte wie in Tabelle 4.8 a angegeben.

Analyse antioxidativer Gene: Hierbei wurde eine gute Korrelation zwischen cDNA-Microarray (Tabelle 4.5) und zeitabhängigen RT-PCR Studien (Tabelle 4.8a) für die *Cu-Zn-Sod*, *Mn-Sod*, *Cat*, *Mt2* sowie das *Cp* festgestellt. Die mRNA-Expressionen der zytosolischen *Cu-Zn Sod* sowie der *Cat* wurden unverändert unabhängig von der verwendeten Zelllinie exprimiert. Der mitochondriale *Mn-Sod* mRNA Gehalt wurde durch die Behandlung der WT- sowie RAGE KO Zellen stark induziert. Der Haupteffekt war nach 4-8 Std. nachweisbar und besonders stark bei den mit der BKE-Fraktion stimulierten WT Zellen ausgeprägt. Differenzen zwischen den cDNA-Microarray und RT-PCR Daten zeigten sich bei der Analyse der *Ec-Sod*. Mittels cDNA-Microarray Analysen der WT Zellen konnte kein verändertes *Ec-Sod* mRNA-Expressionsniveau durch BL-Behandlung gefunden werden. RT-PCR Analysen dieses Gens zeigten allerdings bei den WT Zellen eine moderate um das 1,5fache induziert *Ec-Sod* mRNA-Expression durch BKE/BL Stimulation. Dieser Effekt wurde jedoch nicht für die BKE/BL-Stimulation der RAGE KO Zellen gefunden. Die Metallothioneine sowie das Ceruloplasmin, zytosolische Übergangsmetallbindende Proteine, wurden durch die BL-Behandlung der WT Zellen bei der cDNA-Microarray Analyse zweifach vermehrt exprimiert. Diese vermehrte Expression konnte für das *Mt2* sowie das *Cp* durch die RT-PCR Analysen für beide Zelllinien und Fraktionen (BKE/BL) bestätigt werden. Weiterhin zeigte *Mt2* nach 4-8 Std. die stärkste Induktion des mRNA Gehaltes, wohingegen der *Cp* mRNA Gehalt sein Maximum nach einer 16stündigen Stimulation erreichte. *Mt1* wurde durch die Stimulation beider Zelllinien hingegen nur schwach bis nicht vermehrt transkribiert.

Deutlich wurde durch diese Versuche zudem, dass beide Zelllinien eine vermehrte Expression der beschriebenen pro-/antioxidativen Gene infolge der BKE/BL-Behandlung zeigten. Eine mittels des Gesamtextraktes besonders stark vermehrte Stimulation der *Xdh*-, *Vnn1*-, *Mn-Sod*-, *Ec-Sod*-, *Cp*-Gene wurde bei den RAGE exprimierenden WT Zellen gefunden.

Gene, assoziiert mit antioxidativen Eigenschaften

| WT (Std.) | <i>Cu-Zn-Sod</i> | | <i>Mn-Sod</i> | | <i>Ec-Sod</i> | |
|--------------|------------------|----------|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | BKE | BL | BKE | BL | BKE | BL |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 4 | 101 ± 5 | 115 ± 9 | 1266 ± 132 ** | 376 ± 8 ** | 123 ± 37 | 119 ± 2 |
| 8 | 121 ± 14 | 107 ± 9 | 1115 ± 135 ** | 338 ± 24 * | 173 ± 24 * | 147 ± 9 * |
| 16 | 123 ± 6 | 117 ± 10 | 1202 ± 156 ** | 346 ± 61 | 288 ± 106 | 151 ± 11 * |
| 32 | 89 ± 6 | 134 ± 7 | 915 ± 272 | 271 ± 61 | 219 ± 70 | 150 ± 1 * |
| 64 | 74 ± 10 | 139 ± 3 | 592 ± 114 * | 250 ± 49 | 263 ± 89 | 159 ± 10 * |

| RAGE KO (Std.) | <i>Cu-Zn-Sod</i> | | <i>Mn-Sod</i> | | <i>Ec-Sod</i> | |
|-------------------|------------------|----------|--------------------|--------------------|---------------|----------|
| | BKE | BL | BKE | BL | BKE | BL |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 4 | 104 ± 9 | 110 ± 12 | 666 ± 101 * | 500 ± 98 * | 94 ± 2 | 104 ± 10 |
| 8 | 122 ± 7 | 110 ± 5 | 661 ± 141 * | 438 ± 79 * | 121 ± 6 | 112 ± 6 |
| 16 | 112 ± 8 | 99 ± 13 | 488 ± 138 | 354 ± 26 ** | 112 ± 3 | 106 ± 10 |
| 32 | 123 ± 30 | 120 ± 7 | 381 ± 165 | 247 ± 39 | 119 ± 28 | 130 ± 14 |
| 64 | 114 ± 6 | 115 ± 7 | 236 ± 48 | 256 ± 79 | 106 ± 19 | 117 ± 15 |

| WT (Std.) | <i>Cat</i> | | <i>Mt1</i> | | <i>Mt2</i> | | <i>Cp</i> | |
|--------------|------------|----------|-------------------|------------------|----------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| | BKE | BL | BKE | BL | BKE | BL | BKE | BL |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 4 | 102 ± 33 | 105 ± 51 | 198 ± 37 | 123 ± 15 | 581 ± 152 * | 270 ± 47 | 325 ± 40 * | 153 ± 11 |
| 8 | 122 ± 20 | 132 ± 41 | 217 ± 31 * | 110 ± 6 | 453 ± 123 (*) | 205 ± 31 | 508 ± 124 * | 146 ± 19 |
| 16 | 137 ± 42 | 169 ± 31 | 165 ± 24 | 121 ± 7 * | 293 ± 67 | 237 ± 57 * | 525 ± 83 * | 192 ± 27 ** |
| 32 | 87 ± 31 | 188 ± 68 | 152 ± 56 | 127 ± 5 | 196 ± 67 | 162 ± 6 * | 529 ± 144 | 156 ± 1 * |
| 64 | 86 ± 22 | 160 ± 31 | 142 ± 41 | 129 ± 6 | 113 ± 18 | 124 ± 13 | 620 ± 228 | 128 ± 14 |

| RAGE KO (Std.) | <i>Cat</i> | | <i>Mt1</i> | | <i>Mt2</i> | | <i>Cp</i> | |
|-------------------|------------|----------|------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | BKE | BL | BKE | BL | BKE | BL | BKE | BL |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 4 | 76 ± 13 | 91 ± 43 | 155 ± 52 | 154 ± 12 * | 334 ± 46 * | 282 ± 30 * | 111 ± 5 | 181 ± 30 |
| 8 | 115 ± 16 | 165 ± 87 | 162 ± 40 | 135 ± 15 | 296 ± 35 * | 273 ± 33 * | 142 ± 10 * | 173 ± 16 * |
| 16 | 101 ± 12 | 160 ± 84 | 125 ± 37 | 114 ± 23 | 169 ± 37 | 86 ± 23 | 133 ± 4 * | 154 ± 13 * |
| 32 | 131 ± 61 | 173 ± 59 | 131 ± 22 | 138 ± 8 | 141 ± 63 | 141 ± 21 | 148 ± 42 | 164 ± 12 * |
| 64 | 95 ± 11 | 141 ± 31 | 124 ± 27 | 128 ± 12 | 71 ± 11 | 76 ± 19 | 122 ± 11 | 153 ± 28 |

Tabelle 4.8c: Analyse der zeitabhängigen Expressionsveränderung von antioxidativen Genen durch die BKE/BL-Behandlung beider Zelllinien. Die Durchführung der Analysen erfolgte wie in Tabelle 4.8 a angegeben.

Analyse des Einflusses des Kaffeeextraktes auf pro-/antioxidative Gene: Parallel wurde der Einfluss des Kaffeeextraktes mittels einer konzentrationsabhängigen Stimulation (24 Std.) der WT Zelllinie in Bezug auf die pro-/antioxidativen Gene analysiert. Hierbei zeigte sich (Tabelle 4.9), dass prooxidative Gene (*gp91^{phox}*, *Nox4*, *Xdh*) bei keiner Konzentration vermehrt exprimiert wurden, obwohl das KE-Extrakt eine starke oxidative Stressentwicklung induzierte (Abschnitt 4.2.3). Antioxidative Gene (*Cu-Zn-Sod*, *Mn-Sod*, *Ec-Sod*, *Cat*, *Mt1*, *Mt2*, *Cp*) wurden durch die KE-Behandlung ebenfalls in ihrer Expression nicht verändert. Bei den Genen wie *Sip*, *Vnn1*, *Vnn3*, die mit einer vermehrten Stressantwort assoziiert werden, wurde nur die *Vnn3* mRNA durch hohe KE-Konzentrationen (0,8 mg/ml) vermehrt induziert. Folglich wirken die beiden verwendeten Nahrungsmittel-AGE Extrakte verschieden: während die Behandlung mit der AGE-reichen Brotkrustenfraktion zu einer vermehrten mRNA-Expression verschiedener pro-/antioxidativer Gene führt, wurde der Effekt bei der Kaffeeextraktbehandlung nicht gefunden.

Gene, assoziiert mit antioxidativen Eigenschaften

| WT (KE mg/ml) | <i>Cu-Zn-Sod</i> | <i>Mn-Sod</i> | <i>Ec-Sod</i> | <i>Cat</i> | <i>Mt1</i> | <i>Mt2</i> | <i>Cp</i> |
|------------------|------------------|---------------|-----------------|------------|------------|-----------------|-----------|
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 0,01 | 154 ± 18 | 99 ± 20 | 90 ± 9 | 72 ± 17 | 95 ± 13 | 90 ± 14 | 118 ± 8 |
| 0,03 | 136 ± 16 | 111 ± 12 | 101 ± 12 | 96 ± 40 | 105 ± 12 | 96 ± 9 | 98 ± 6 |
| 0,1 | 145 ± 18 | 102 ± 20 | 91 ± 5 | 98 ± 36 | 116 ± 26 | 97 ± 10 | 98 ± 8 |
| 0,3 | 145 ± 51 | 95 ± 26 | 95 ± 2 | 116 ± 14 | 89 ± 7 | 82 ± 3 * | 76 ± 12 |
| 0,8 | 178 ± 25 | 122 ± 52 | 77 ± 3 * | 145 ± 51 | 110 ± 8 | 136 ± 12 | 144 ± 47 |

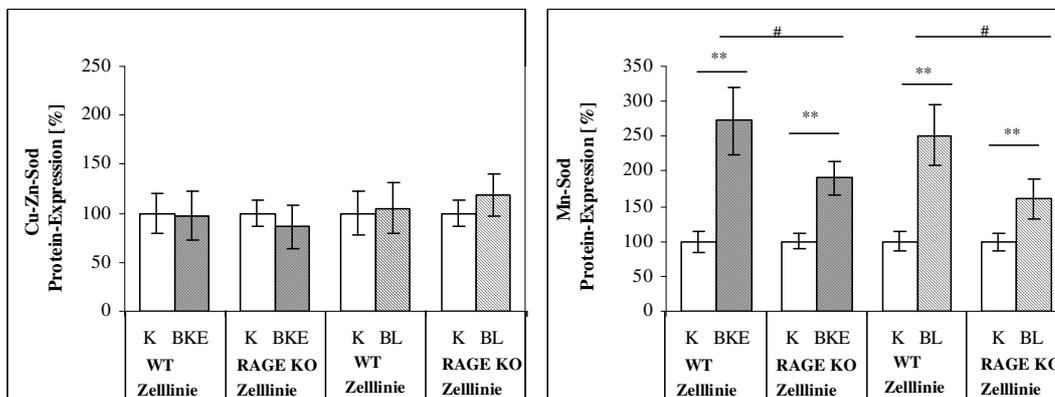
Gene, assoziiert mit oxidativen Stressantworten

Gene, assoziiert mit oxidativen Eigenschaften

| WT (KE mg/ml) | <i>Sip</i> | <i>Vnn1</i> | <i>Vnn3</i> | WT (KE mg/ml) | <i>gp91^{phox}</i> | <i>Nox4</i> | <i>Xdh</i> |
|------------------|------------|-------------|--------------------|------------------|----------------------------|-------------|------------|
| 0 | 100 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| 0,01 | 104 ± 10 | 96 ± 12 | 82 ± 26 | 0,01 | 91 ± 11 | 83 ± 10 | 65 ± 8 |
| 0,03 | 100 ± 9 | 94 ± 6 | 82 ± 16 | 0,03 | 103 ± 12 | 97 ± 8 | 86 ± 7 |
| 0,1 | 106 ± 14 | 113 ± 10 | 84 ± 27 | 0,1 | 119 ± 14 | 95 ± 5 | 82 ± 9 |
| 0,3 | 87 ± 16 | 114 ± 17 | 334 ± 95 | 0,3 | 97 ± 2 | 78 ± 17 | 73 ± 7 |
| 0,8 | 123 ± 44 | 140 ± 23 | 964 ± 210 * | 0,8 | 85 ± 2 | 92 ± 8 | 200 ± 62 |

Tabelle 4.9: Darstellung der Expressionsanalysen der pro-/antioxidativen Gene nach konzentrationsabhängiger KE-Behandlung der WT Zelllinie. Konfluente unter Serumreduktion kultivierte WT Zellen wurden für 24 Std. mit den angegebenen KE-Konzentrationen behandelt. Danach wurde RNA isoliert, die aufgelisteten Gene durch RT-PCR Analyse quantifiziert und auf 18 S rRNA normalisiert, wobei die unbehandelten Kontrollen auf 100 % normiert wurden. (MW_{aller Experimente} ± SEM; n = 3; * P ≤ 0,05).

Einfluss der AGE-Nahrungsmittlextrakte auf die Proteinexpression der Sods: Durch die RT-PCR Daten wurde gezeigt, dass die BKE/BL-Behandlung bei den WT Zellen sowohl eine vermehrte *Mn-* als auch *Ec-Sod* mRNA Expression induzierte. Diese Ergebnisse wurden durch Western-Blot Analyse auf Proteinebene überprüft. Die 24 stündige BKE/BL-Behandlung der WT Zellen führte zu einer signifikant um das 2,5 fache vermehrten *Mn-SOD* Expression. Die RAGE KO Zellen wurden durch diese Behandlung im Vergleich zu den WT Zellen signifikant geringer stimuliert (1,9fache) - ein Effekt der auf eine RAGE Abhängigkeit hinweist. Eine gute Korrelation von RT-PCR und Western-Blot Daten konnte auch in Bezug auf die Cu-Zn SOD gefunden werden. Weder die mRNA-Expression noch das Proteinniveau der zytosolischen Cu-Zn SOD änderte sich unter BKE/BL-Behandlung bei WT- und RAGE KO Zellen. Die *Ec-SOD* Protein Expressionsveränderungen wurden nur bei den WT Zellen analysiert, da sich nur bei diesem Zelltyp ein verändertes mRNA-Expressionsniveau unter Brotkrustenextrakt Behandlung gezeigt hatte. Hierbei konnte eine moderat, aber signifikant erhöhte Proteinexpression unter BKE/BL-Behandlung gefunden werden.



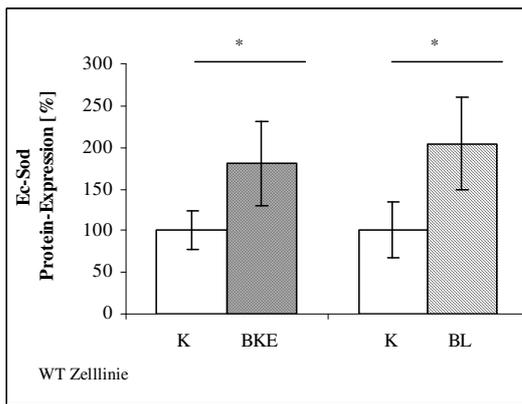


Abb. 4.28: Einfluss der AGE-reichen Brotkrustenextraktfraktionen auf die Protein-expression der SODs Konfluente unter Serumreduktion kultivierte WT- und RAGE KO Zellen wurden mit den BKE/BL-Fractionen (10 mg/ml) für 24 Std. stimuliert. Die Proteinexpression der Cu-Zn-/Mn-SOD wurde durch Western-Blot Analyse für beide Zelllinien, die Ec-SOD für die WT Zellen verifiziert. Die Kontrollzellen wurden auf 100 % normiert. Die Versuche wurden in drei bis fünf voneinander unabhängigen Versuchen verifiziert ($MW_{\text{aller Experimente}} \pm \text{SEM}$; * $P \leq 0,05$ vs. unbehandelten Kontrollzellen, ** $P \leq 0,01$ vs. unbehandelten Kontrollzellen; # WT- vs. RAGE KO Behandlung).

Einfluss der AGE-Nahrungsmittlextrakte auf den zellulären GSH-Gehalt: Glutathion wirkt hauptsächlich durch die funktionelle Sulfhydrylgruppe als ein wirkungsvolles zytosolisches Antioxidans, das direkt oder unter enzymatischer Katalyse der Glutathion-Peroxidase reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezien entgiften kann (90). Durch 24 stündige BKE/BL-Behandlung zeigte sich mittels ESR-Messung ein moderat jedoch signifikant vermehrter GSH-Gehalt der Zellen. Die KE-Behandlung beider Zelllinien führte hingegen zu einer Abnahme des zellulären GSH-Gehaltes, der nur bei den WT Zellen Signifikanzniveau erreichte. Vergleiche hinsichtlich des GSH-Gehaltes nach BKE/BL- (gesteigert) sowie KE-Behandlung (gemindert) zeigten wiederum die unterschiedliche Wirkung beider Extrakte.

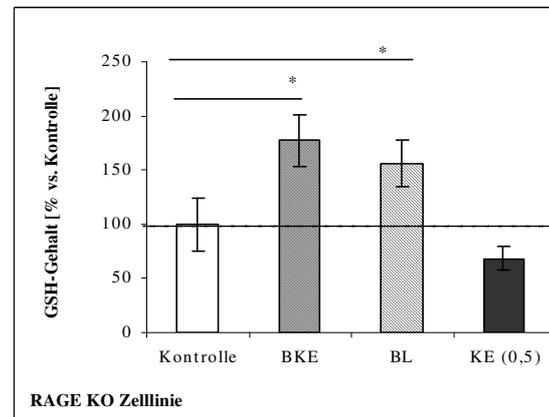
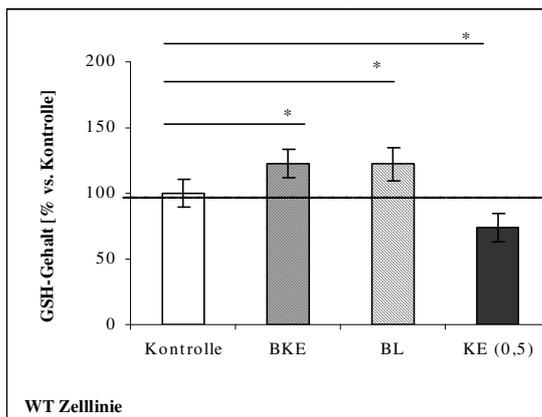


Abb. 4.29: Analyse des GSH-Gehaltes der Fibroblastenzelllinien nach Nahrungsmittlextraktbehandlung. Unter Serumreduktion kultivierte WT- und RAGE KO Zellen wurden für 24 Std. mit den angegebenen Extrakten (BKE, BL: 10 mg/ml; KE: 0,5 mg/ml) behandelt, abgelöst und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Phosphatpuffer pH 6,8 mit 0,1% TritonX100 aufgeschlossen. Der GSH-Gehalt wurde mittels ESR bestimmt, wobei die Werte auf den Proteingehalt normalisiert und auf die Kontrolle (100 %) bezogen wurden. ($MW_{\text{aller Experimente}} \pm \text{SEM}$; n (WT) = 5, n (RAGE KO) = 3 (* $P \leq 0,05$ vs. unbehandelte Kontrolle; ** $P \leq 0,01$ vs. unbehandelte Kontrolle).

Analyse der antioxidativen Kapazität des Brotkrustenextraktes durch Präkonditionierungsanalysen: Die RT-PCR sowie cDNA-Microarray Daten weisen darauf hin, dass die Fibroblasten nach der BKE/BL-Behandlung langfristig über eine gesteigerte antioxidative Kapazität verfügen und daher gegen oxidativen Stress geschützt sein sollten. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Präkonditionierungsexperimente durchgeführt. Durch eine Vorbehandlung der Zellen mit diesem AGE-reichen Extrakt sollte analysiert werden, ob dies die anschließend durch oxidativen Stress/toxische Agenzien (KE; H_2O_2 , UV-Strahlung) induzierte Zelltodentwicklung verminderte. Zuerst wurden verschiedene zelltodinduzierende Agenzien mittels PI-Färbung hinsichtlich der

prozentualen Zelltodentwicklung bestimmt. Die 24 stündige Behandlung der RAGE KO Zellen mit 0,25 mM H₂O₂ führte zu einer ~ 40% Zelltodentwicklung, wohingegen die WT Zellen diesen Effekt erst bei einer Behandlung mit 0,7 mM H₂O₂ zeigten. Ein ähnliches Verhalten der beiden Zelllinien wurde durch die KE-Behandlung im toxischen Bereich gefunden. Die KE Behandlung von 1 mg/ml führte bei den RAGE KO Zellen nach einer 24 stündigen Behandlung zu einer ~ 50% Zelltodentwicklung, wohingegen bei den WT Zellen eine Konzentration von 1,5 mg/ml erforderlich war (Tabelle 4.10). Als eine weitere Quelle der Zellschädigung wurde UV-Strahlung verwendet. Dabei wurden die WT Zellen für 2 min und die RAGE KO Zellen für 1 min mit 100 % (7,5 mW/cm²) UV-Licht bestrahlt.

| | | WT Zelllinie | RAGE KO Zelllinie |
|------------------------------------|------|--------------|-------------------|
| H ₂ O ₂ [mM] | 0 | 2 ± 0,3 | 4 ± 0,8 |
| | 0,15 | 1,8 ± 0,2 | 7 ± 1,5 ** |
| | 0,25 | 7,5 ± 3 | 37 ± 4,8 ** |
| | 0,7 | 33 ± 5 | 86 ± 2,5 ** |
| KE [mg/ml] | 0 | 7 ± 1,1 | 13 ± 3,3 |
| | 1 | 14 ± 4,8 * | 52,7 ± 4,1 ** |
| | 1,5 | 52 ± 5 ** | 78,4 ± 8,6 ** |

Tabelle 4.10: Bestimmung der Zelltodentwicklung durch H₂O₂- und KE-Behandlung
Konfluente unter Serumreduktion kultivierte Zellen wurden mit H₂O₂ bzw. KE mit den angegebenen Konzentrationen für 24 Std. behandelt und der Zelltod durchflusszytometrisch mittels PI-Färbung analysiert. (MW_{aller Experimente} ± SEM; n = 5, * P ≤ 0,05 vs. unbehandelte Kontrolle; ** P ≤ 0,01 vs. unbehandelte Kontrolle).

Wie in Tabelle 4.11 gezeigt, wurde der durch H₂O₂ bzw. KE bzw. UV-Licht verursachte Zelltod durch das Präkonditionieren mit BKE und BL um mehr als 50 % bei beiden Zelllinien signifikant reduziert. Der RAGE Rezeptor schien für den Präkonditionierungseffekt nicht hauptverantwortlich zu sein. Allerdings muss hierbei berücksichtigt werden, dass nur eine Konzentration von 10 mg/ml verwendet wurde. Eventuell würden sich bei geringeren Konzentrationen Unterschiede, ähnlich wie bei der Aktivierung der MAP-Kinasen (Abb. 4.22) und der TF (Abb. 4.23), zeigen.

| BKE | Zelltod WT Zelllinie | P: KE vs. BKE + KE | BKE | Zelltod RAGE KO | P: KE vs. BKE + KE |
|-----------------------------|----------------------|------------------------|-----------------------------|-----------------|------------------------|
| Kontrolle | 10 ± 4 | n = 5 = 0,05 | Kontrolle | 8 ± 3 | n = 5 = 0,01 |
| KE (1,5 mg/ml) | 38 ± 6 | | KE (1 mg/ml) | 52 ± 6 | |
| BKE + KE | 20 ± 5 | | BKE + KE | 7 ± 2 | |
| | | P: H2O2 vs. BKE + H2O2 | | | P: H2O2 vs. BKE + H2O2 |
| Kontrolle | 7 ± 1 | n = 4 = 0,01 | Kontrolle | 10 ± 4 | n = 4 = 0,01 |
| H2O2 (0,7mM) | 23 ± 5 | | H2O2 (0,25mM) | 54 ± 17 | |
| BKE + H2O2 | 4 ± 1 | | BKE + H2O2 | 20 ± 10 | |
| BL | Zelltod WT Zelllinie | P: KE vs. BL + KE | BL | Zelltod RAGE KO | P: KE vs. BL + KE |
| Kontrolle | 7 ± 1 | n = 9 = 0,01 | Kontrolle | 8 ± 1 | n = 7 = 0,01 |
| KE (1,5 mg/ml) | 46 ± 6 | | KE (1 mg/ml) | 73 ± 4 | |
| BL + KE | 25 ± 3 | | BL + KE | 25 ± 8 | |
| | | P: H2O2 vs. BL + H2O2 | | | P: H2O2 vs. BL + H2O2 |
| Kontrolle | 9 ± 2 | n = 13 = 0,01 | Kontrolle | 8 ± 3 | n = 4 = 0,01 |
| H2O2 (0,7mM) | 64 ± 8 | | H2O2 (0,25mM) | 27 ± 9 | |
| BL + H2O2 | 20 ± 3 | | BL + H2O2 | 8 ± 2 | |
| UV-Strahlung (100 %, 2 min) | Zelltod WT Zelllinie | P: UV vs. BL + UV | UV-Strahlung (100 %, 1 min) | Zelltod RAGE KO | P: UV vs. BL + UV |
| Kontrolle | 5 ± 1 | n = 3 = 0,01 | Kontrolle | 3 ± 1 | n = 3 = 0,01 |
| UV-Strahlung | 49 ± 4 | | UV-Strahlung | 16 ± 4 | |
| BL + UV | 38 ± 4 | | BL + UV | 10 ± 1 | |

Tabelle 4.11: Darstellung von Brotkrustenextrakt - Präkonditionierungsexperimente unter Verwendung verschiedener zellschädigender Agenzien. Konfluente unter Serumreduktion kultivierte WT- und RAGE KO Zellen wurden für 24 Std. mit ± BKE/BL (10 mg/ml) behandelt, zweimal gewaschen und für weitere 24 Std. mit H₂O₂ bzw. KE bzw. UV-Licht in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Der Anteil des Zelltodes wurde durchflusszytometrisch mittels PI-Färbung analysiert, wobei die Zunahme des Zelltodes im Vergleich zu den Kontrollen ersichtlich wird. (MW_{aller Experimente} ± SEM; Signifikanzangaben: induzierter Zelltod (KE/H₂O₂/UV-Licht) vs. Präkonditionierung mit BL/BKE; ANOVA-Analyse).

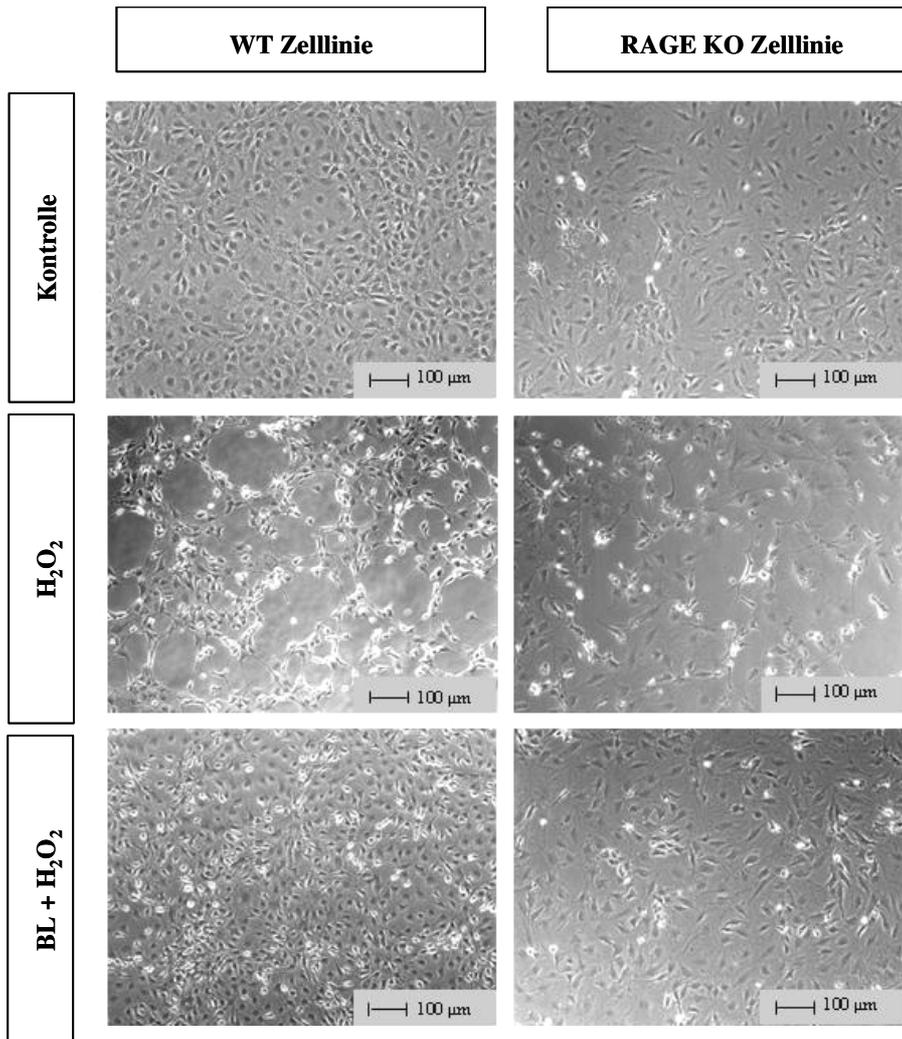


Abb. 4.30: Repräsentative Darstellung der BL-Präkonditionierung der WT und RAGE KO Zellen und anschließender Behandlung mit H_2O_2 Die Zellen wurden für 24 Std. \pm BL/PBS vorinkubiert, danach zweimal gewaschen und mit H_2O_2 (WT: 0,7 mM; RAGE KO: 0,25 mM) für weitere 24 Std. inkubiert und anschließend fotografiert.

Diese Präkonditionierungsexperimente wurden auf primäre Rattenkardiomyozyten, den funktionellen Zelltyp des Herzens, übertragen. Die für 16 Std. \pm BKE/BL bzw. PBS präkonditionierten primären Zellen wurden anschließend durch Ischämie/Reperfusion geschädigt. Messungen des durch Membranschädigung freigesetzten LDHs zeigten, dass auch die Rattenkardiomyozyten vor oxidativen Stressschäden geschützt werden konnten, wobei der Effekt mit dem Gesamtextrakt deutlicher als mit der löslichen Fraktion ausgeprägt war.

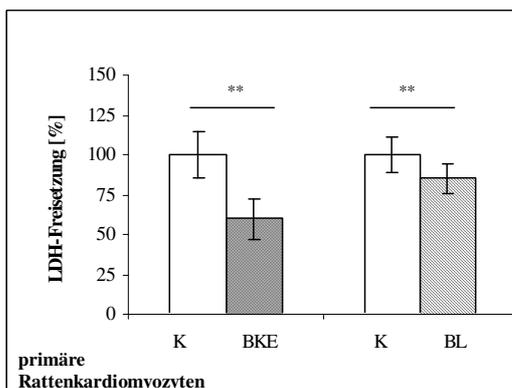


Abb. 4.31: Präkonditionierung primärer Rattenkardiomyozyten vor Ischämie/Reperfusionsschäden Primäre Rattenkardiomyozyten wurden für 16 Std. \pm BKE/BL (10 mg/ml) präkonditioniert und danach für 3 Std. in Hypoxie (1% O_2 , 37 °C) mit Ringerpuffer pH 6,2 inkubiert (Ischämie). Anschließend wurde mit Ringerpuffer pH 7,4 unter aeroben Zellkulturbedingungen (16 % O_2 , 37 °C) Reperfusion induziert. Der Anteil des Zelltodes im Vergleich zu den Kontrollzellen wurde mittels LDH-Assay analysiert. (MW aller Experimente \pm SEM; n = 4 (BKE), n = 7 (BL); ** P \leq 0,01 vs. un behandelter Kontrollen).

4.2.6.1 Analyse des Einflusses von Inhibitoren auf die Wirkung des Brotkrustenextraktes

Analyse des Einflusses der ERK1/2^{MAPK} (U0126) und p38^{MAPK} (SB203580) Inhibitoren auf die BL vermittelte induzierte Wirkung bezüglich pro-/antioxidativer Gene: Unter Verwendung eines ERK1/2^{MAPK}- (U0126) sowie p38^{MAPK} Inhibitors (SB203580) sollte die Beteiligung dieser intrazellulären Signalkaskaden auf die BL-stimulierte Expression von pro-/antioxidativen Genen bestimmt werden. Bei diesen Analysen wurden nur WT Zellen verwendet, da bei beiden Zelllinien die durch BL-Stimulation induzierten Effekte in Bezug auf die pro-/antioxidativen Gene analog verliefen. U0126 wirkt über die Inhibierung der vorgeschalteten MEK 1/2 Kinasen, sodass die ERK1/2^{MAPK} nicht mehr phosphoryliert werden kann. Der p38^{MAPK} Inhibitor SB203580 ist hingegen ein direkter kompetitiver Inhibitor dieser Kinase. Die p38^{MAPK} kann inhibitorunabhängig von übergeordneten Kinasen weiterhin phosphoryliert werden. Deshalb wurde zur Überprüfung der Inhibierung des p38^{MAPK} Signalweges ein Substrat dieser Kinase, die MAPKAPK-2 untersucht. Die Wirksamkeit der Inhibitoren wurde durch Western-Blot Analysen überprüft. U0126 (10 µM) inhibierte zu ~ 85% die Aktivierung der ERK1/2^{MAPK} Kinase und S203580 (5 µM) zu 65% die Phosphorylierung des p38^{MAPK} Substrats.

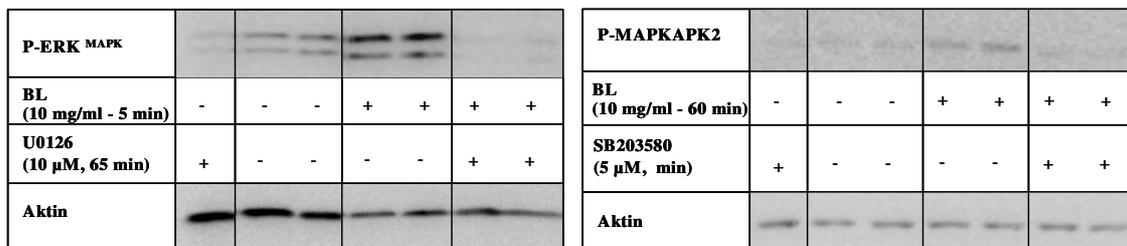


Abb.4.32: Analyse des Einflusses der Inhibitoren auf die Inhibierung der dazugehörigen Kinasen P-ERK1/2^{MAPK} (U0126) sowie P-MAPKAPK2 (SB203580) Konfluente unter Serumreduktion kultivierte WT Zellen wurden für 1 Std. mit dem jeweiligen Inhibitor (A: U0126-10µM; B: SB203580-5µM) vorbehandelt und anschließend mit BL (10 mg/ml) für 5 min (A: P-ERK1/2^{MAPK}) bzw. 60 min (B: P-MAPKAPK-2) stimuliert. Die Inhibierung der intrazellulären Signalwege wurde mittels phosphospezifischer Antikörper durch Western-Blot Analyse detektiert und auf die Aktin Beladung normiert.

Zusätzlich zu der Wirkung der beiden Inhibitoren wurde der Einfluss des Antioxidants N-Acetylcystein (NAC) auf die Expression wichtiger pro-/antioxidativer Gene mittels RT-PCR analysiert. Die Verwendung von NAC ergab sich aus der Fragestellung, ob eine vorherige Reduktion des zellulären oxidativen Stresses die Expression der pro-/antioxidativer Gene beeinflusst. Hierfür wurden WT Zellen mit dem jeweiligen Inhibitor/Antioxidant für 1 Std. vorinkubiert, für 16 Std. mit dem BL-Extrakt stimuliert und nach RNA-Isolation die angegebenen Gene per RT-PCR quantifiziert.

Wie in Abb. 4.33 dargestellt, inhibierte U0126 signifikant die durch BL induzierte Expression der *Mn-Sod*, *Mt2*, *gp91^{phox}* und *Vnn3*. Dies weist darauf hin, dass bei diesen Genen der ERK1/2^{MAPK} Signalweg involviert ist. Einen tendenziellen Einfluss hatte der Signalweg auf das *Cp*. Die durch BL-Stimulation vermehrte Expression der *Ec-Sod*, *Vnn1* sowie der *Xdh* wurde durch den Inhibitor U0126 nicht beeinflusst.

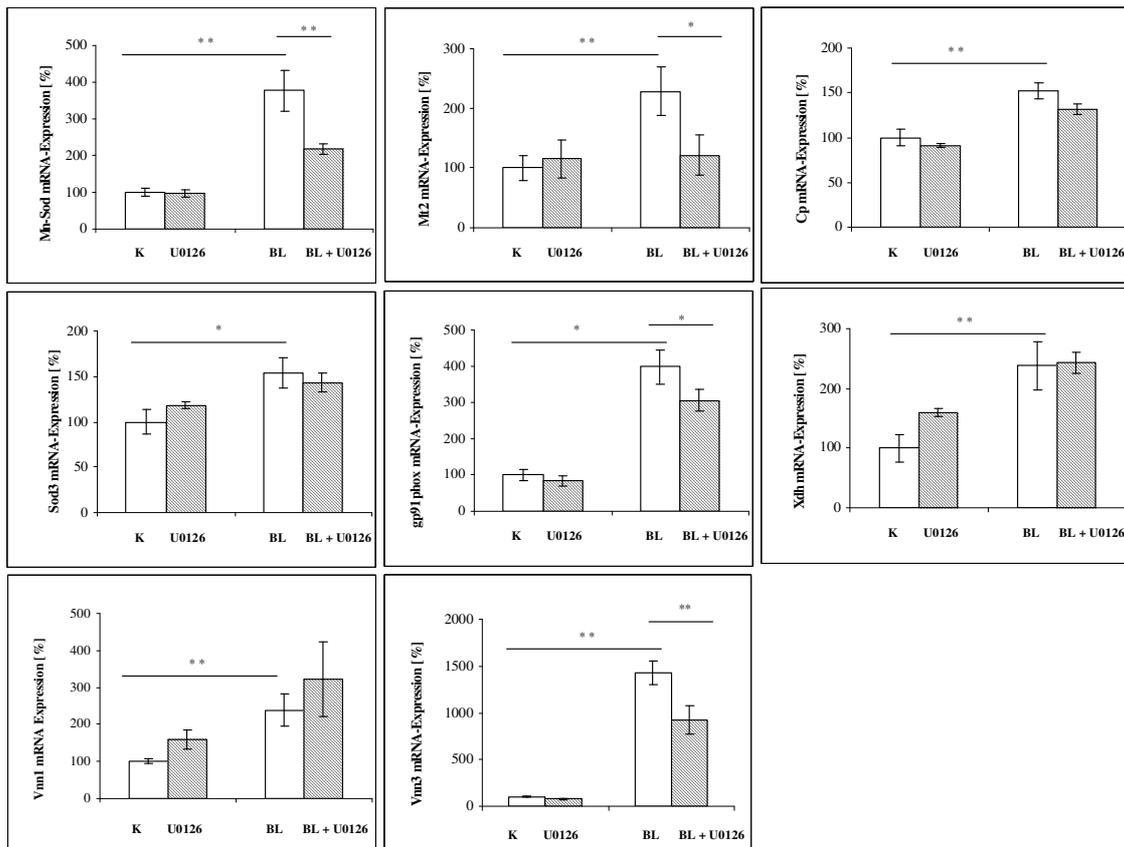
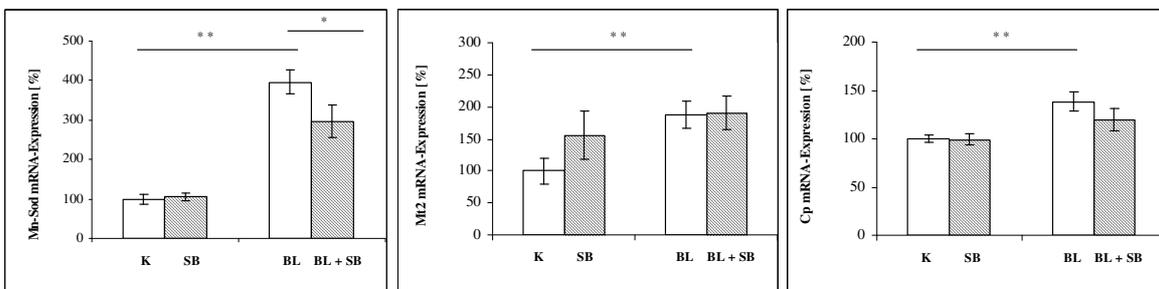


Abb. 4.33: Analyse des Einflusses des ERK1/2^{MAPK} Signalweges mittels U0126 Inhibitor auf die BL-aktivierte Expression unterschiedlicher pro-/antioxidativer Gene Hierfür wurde die konfluent unter Serumreduktion kultivierten WT Zellen in vier Behandlungsgruppen unterteilt: Gruppe 1: Kontrollzellen; Gruppe 2: Inhibitorinkubation mit U0126 (10 µM); Gruppe 3: BL-Stimulation (10 mg/ml) für 16 Std.; Gruppe 4: Inhibitorvorinkubation für 1 Std. und anschließende BL-Behandlung für 16 Std.. Anschließend wurde RNA isoliert, die Gene per RT-PCR Reaktionen quantifiziert und das jeweilige Expressionsniveau durch einen 18 S rRNA Abgleich normalisiert und auf die Kontrollen (100 %) normiert. (MW ± SEM; n = 6; *P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; ANOVA-Analyse).

Bei der Analyse des p38^{MAPK} Signalweges mittels SB203580 Inhibitor (Abb. 4.34) zeigte sich, dass die durch BL-Behandlung induzierte *Mn-Sod* und *Vnn3* Expression signifikant von dieser Kinase abhängig war. Keinen Einfluss zeigte dieser Inhibitor auf die vermehrte Expression der Gene *Mt2*, *Cp*, *Ec-Sod*, *gp91^{phox}*, *Xdh* und *Vnn1*.



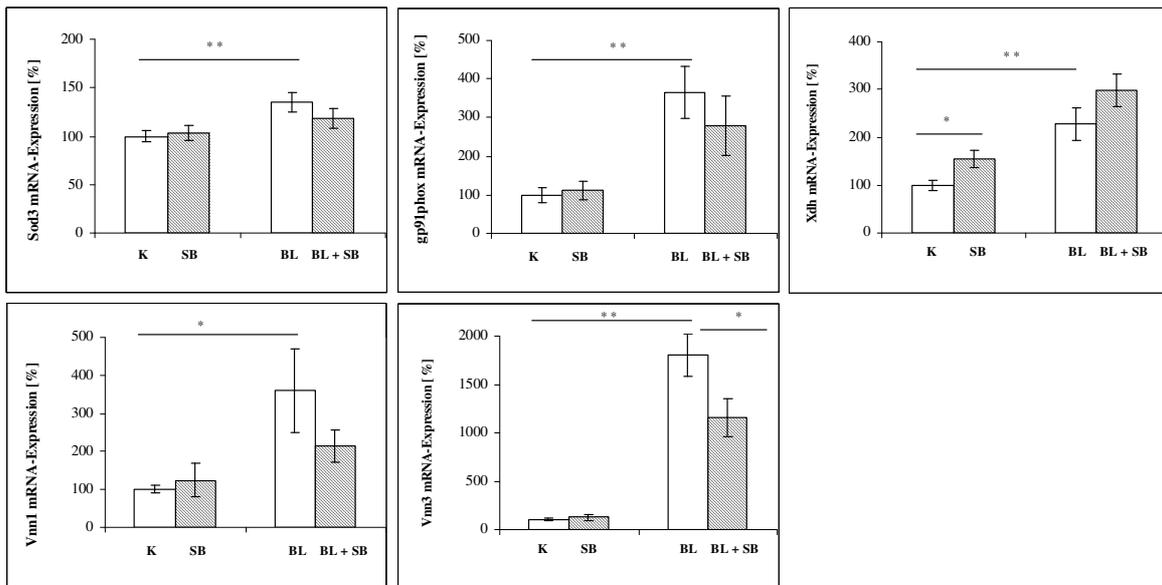


Abb. 4.34: Analyse des Einflusses des p38^{MAPK} Signalweges mittels SB203580 Inhibitor auf die BL-stimulierte Expression unterschiedlicher pro-/antioxidativer Gene. Die Durchführung erfolgte wie in Abb. 4.33 beschrieben, wobei in diesen Experimenten der Inhibitors SB203580 (5 µM) verwendet wurde. (MW ± SEM; n = 6; * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; ANOVA-Analyse).

Die NAC-Behandlung der WT Zellen führte bei anschließender BL-Behandlung zu einer verminderten Expression von *gp91^{phox}*, *Mt2*, *Vnn1* und *Vnn3*, wohingegen die restlich analysierten Gene durch NAC nicht verändert exprimiert wurden.

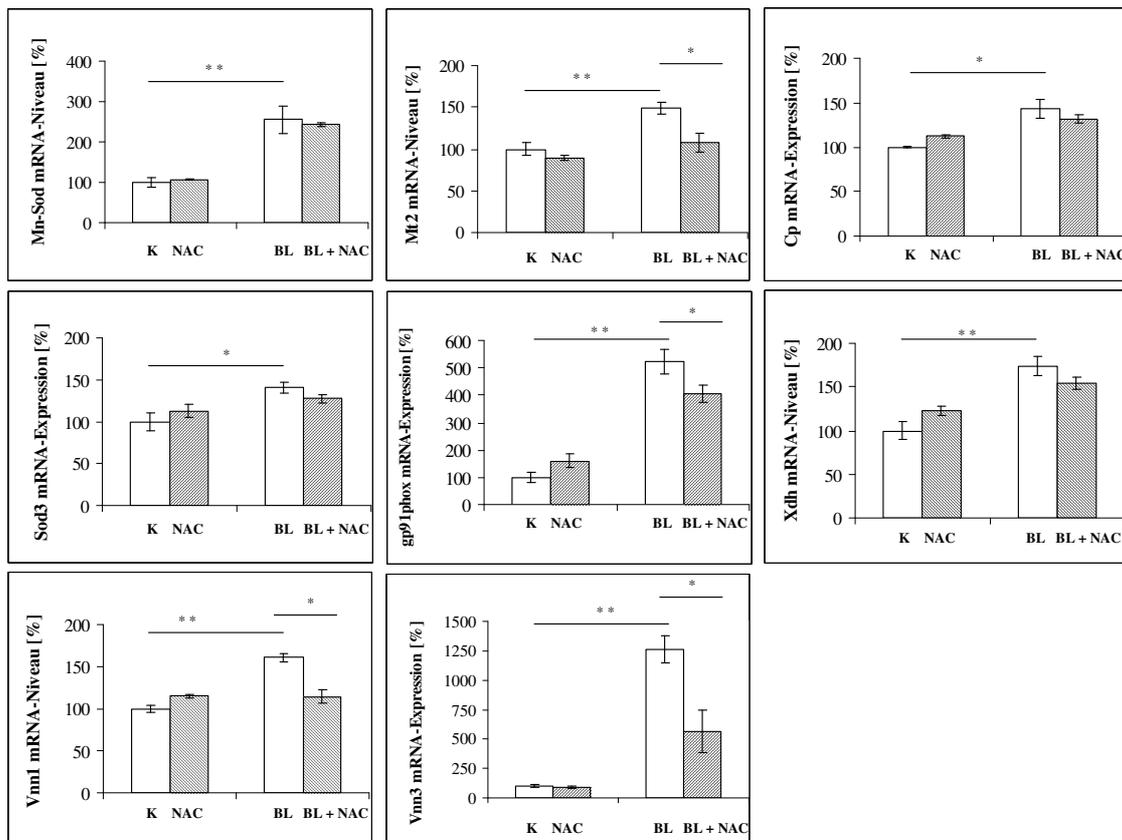


Abb. 4.35: Analyse des Einflusses des Antioxidants NAC auf die BL-stimulierte Expression unterschiedlicher pro-/antioxidativer Gene. Die Durchführung erfolgte wie in Abb. 4.33 beschrieben, wobei in diesen Experimenten das Antioxidant NAC (200 µM) verwendet wurde. (MW ± SEM; n = 6; * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; ANOVA-Analyse).

Analyse des Einflusses der ERK1/2^{MAPK}(U0126), p38^{MAPK} (SB203580) Inhibitoren und des Antioxidants NAC auf den BL vermittelten Präkonditionierungseffekt: Der Einfluss der Inhibitoren (U0126, SB203580) und des Antioxidants NAC auf den Präkonditionierungseffekt wurde anhand der WT Zelllinie untersucht, da diese die durch BL-Stimulation induzierte vermehrte Expression pro-/antioxidativer Gene modulierten. Die Präkonditionierung erfolgte wie in Abschnitt 3.13 beschrieben, wobei Zellchargen mit dem jeweiligen Inhibitor/Antioxidant für 1 Std. vorinkubiert wurden. Der jeweilige Inhibitor/NAC wurde mit der BL-Fraktion nach 24 Std. Inkubation durch zweimaliges Waschen entfernt.

Der durch H₂O₂ induzierte Zelltod konnte durch vorherige Präkonditionierung mit BL um mehr als 70% (Abb.4.36 A&B), der durch KE induzierte Zelltod um 40 % (Abb.4.36 C) vermindert werden. Der Inhibitor U0126 führte, je nach Zelltod induzierender Substanz, zu unterschiedlichen Präkonditionierungsergebnissen. So wurde der BL vermittelte Präkonditionierungseffekt durch Vorinkubation mit U0126 komplett aufgehoben, wenn die WT Zellen anschließend mit KE für 24 Std. geschädigt wurden (Abb. 4.36C). Dieser Effekt war jedoch bezüglich der H₂O₂-Behandlung deutlich schwächer ausgeprägt (Verminderung des Präkonditionierungseffektes um ~15 %; Abb.4.36A). Dies weist auf verschiedene Wirkmechanismen von H₂O₂ und KE hin. Andererseits scheint der ERK1/2^{MAPK} Signalweg an den BL vermittelten Präkonditionierungseffekten, zumindest zu einem Teil, mitzuwirken.

Der Effekt des Inhibitor SB203580 wurde nur in Bezug auf den H₂O₂ vermittelten Zelltod nach BL Präkonditionierung analysiert, da der BL vermittelte Präkonditionierungseffekt durch U0126 bei anschließender KE-Behandlung komplett aufgehoben wurde (Abb. 4.36). Hierbei zeigte sich ein ähnlicher Effekt wie mit U0126, der jedoch noch eine größere Variabilität aufwies (Abb. 4.36 B). Durch den Einsatz des Antioxidants NAC, das eine Erhöhung der zellulären antioxidativen Kapazität zu Beginn des Experiments bewirkte, wurde der schützende BL vermittelte Präkonditionierungseffekt um ~ 50 % signifikant nach der folgenden H₂O₂ Behandlung gemindert (Abb. 4.37). Durch dieses Ergebnis lässt sich ableiten, dass eine Induktion von moderatem oxidativen Stress mittels der BL-Fraktion für die folgende vermehrte Expression von antioxidativen Genen notwendig ist, um final vor starken toxischen oxidativen Stressschäden zu schützen.

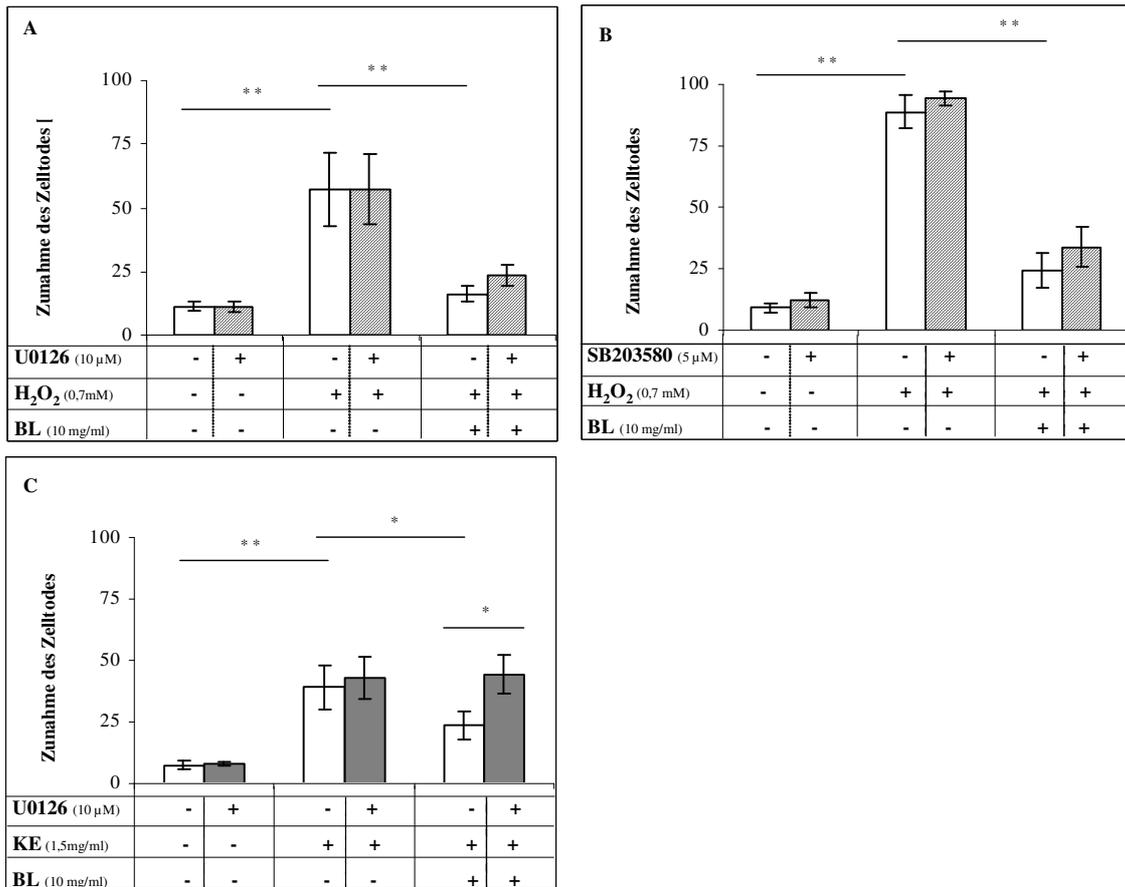


Abb. 4.36: Analyse des Einflusses der Inhibitoren U0126 und SB203580 auf den durch BL-Stimulation induzierten Präkonditionierungseffekt Die unter Serumreduktion kultivierten WT Zellen wurden sechsfach verschieden behandelt: Charge 1: Kontrollzellen; Charge 2: alleinige Inhibitorbehandlung; Charge 3: Präkonditionierung mit BL für 16 Std., zweimaliges Waschen, Behandlung mit Zelltod induzierenden Substanz (H₂O₂, KE) für 24 Std.; Charge 4: Inhibitorvorinkubation für 1 Std., BL-Behandlung (16 Std.), zweimaliges Waschen, Behandlung mit Zelltod induzierenden Substanz für 24 Std.; Charge 5: Inhibitorvorinkubation, nach 17 Std. zweimaliges Waschen; Inkubation mit Zelltod induzierenden Substanzen (24 Std.); Charge 6: nach 24 Std. zweimaliges Waschen Behandlung mit Zelltod induzierenden Substanz (24 Std.). Der Zelltod der einzelnen Chargen wurde mittels PI-Färbung durchflusszytometrisch bzw. mittels LDH-Freisetzung ermittelt. (MW ± SEM; n = 5 für U0126 Inhibitorstudien, n = 4 für SB203580 Inhibitorstudien; * P ≤ 0,05, ** P ≤ 0,01 mittels ANOVA-Analyse)

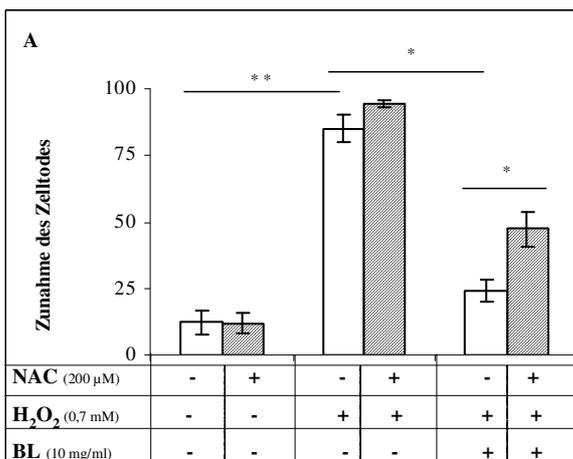


Abb. 4.37: Analyse des Einflusses des Antioxidants NAC auf den durch BL-Stimulation induzierten Präkonditionierungseffekt Für diese Versuche wurden die unter Serumreduktion kultivierten WT Zellen analog zu den unter Abb. 4.36 durchgeführten Versuchen behandelt. Dabei wurde anstelle des Inhibitors NAC (200 µM) verwendet. Der Zelltod der einzelnen Chargen wurde mittels PI-Färbung durchflusszytometrisch bzw. mittels LDH-Freisetzung ermittelt. (MW ± SEM; n = 3; * P ≤ 0,05, ** P ≤ 0,01 mittels ANOVA-Analyse)

4.2.7 Analyse einer niedermolekularen Brotkrustenextrakt-Fraktion (≤ 10 kDa) und des Pronyl-L-Lysin modifiziertem BSAs auf pro-/antioxidative Gene sowie den Präkonditionierungseffekt

In fortführenden Untersuchungen wurden Verbindungen analysiert, die für die antioxidative Wirkung des Brotkrustenextraktes verantwortlich sein könnten. Dafür wurde einerseits die im Organismus mit hoher Wahrscheinlichkeit absorbierbare ≤ 10 kDa Fraktion des BL-Extraktes sowie andererseits Pronyl-L-Lysin modifiziertes BSA verwendet, da Pronyl-L-Lysin als singuläre Wirksubstanz aus dem Brotkrustenextrakt isoliert und mit antioxidativen Eigenschaften assoziiert wurde (64).

4.2.7.1 Analyse der ≤ 10 kDa Fraktion des löslichen Brotkrustenextraktes

Proliferations- und Zellvitalitätsprüfung: Der Einfluss der ≤ 10 kDa Fraktion des BL-Extraktes auf das Proliferationsvermögen der beiden Zelllinien sowie deren Zelltodentwicklung wurde mittels Alamar Blue Assay (A) und durchflusszytometrisch mittels PI-Färbung (B) bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass auch diese Fraktion zu einer tendenziell vermehrten Alamar Blue Umsetzung führte. Die außerdem durchgeführten Zelltodanalysen wiesen auf keine toxische Wirkung hin.

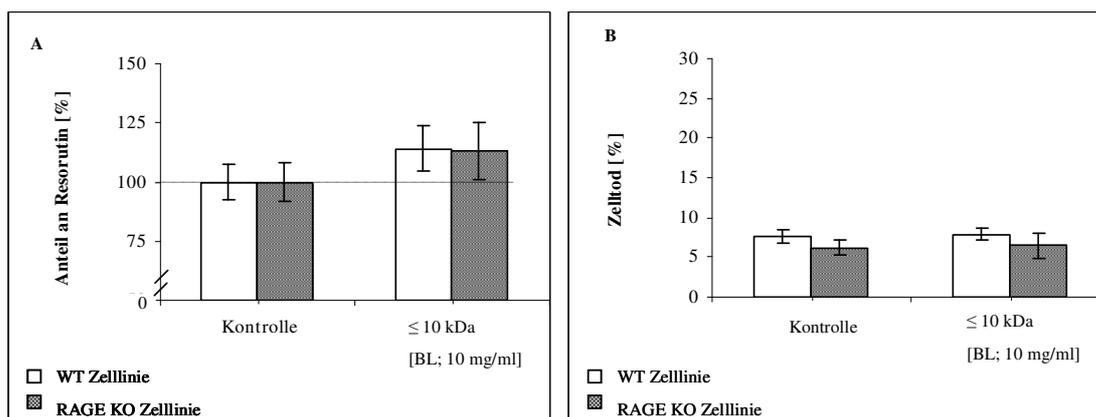


Abb. 4.38: Analyse des Einflusses der ≤ 10 kDa Fraktion des BL auf das Proliferationsvermögen und die Zelltodentwicklung beider Zelllinien **A:** Die Zellen wurden subkonfluent mit der ≤ 10 kDa Fraktion des BL (10 mg/ml) für 24 Std. behandelt und die proliferative-/reduzierende Kapazität durch Zugabe von Alamar Blue mittels Absorptionmessung bestimmt. **B:** Konfluente unter Serumreduktion kultivierte Zellen wurden mit der ≤ 10 kDa Fraktion des BL (10 mg/ml) für 24 Std. behandelt und der Zelltod durchflusszytometrisch mittels PI-Färbung analysiert. (MW_{aller Experimente} \pm SEM; n = 3).

Messung des oxidativen Stresses: Der Einfluss des ≤ 10 kDa BL-Fraktion konnte mittels der DCFH-DA Methode wiederum nur anhand der WT Zelllinie (siehe Abschnitt 4.2.3) ermittelt werden. Wie in Abb. 4.39A dargestellt, führte auch die ≤ 10 kDa BL-Fraktion zu einer moderaten aber signifikant vermehrten ROS-Produktion. Eine signifikant vermehrte Proteincarbonyl-Bildung im Vergleich zu den Kontrollzellen konnte durch diese Behandlung jedoch nicht gefunden werden (Abb. 39B).

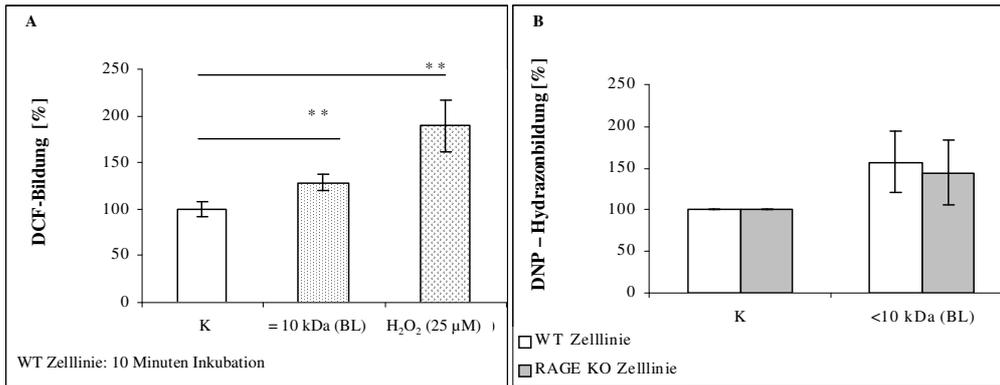
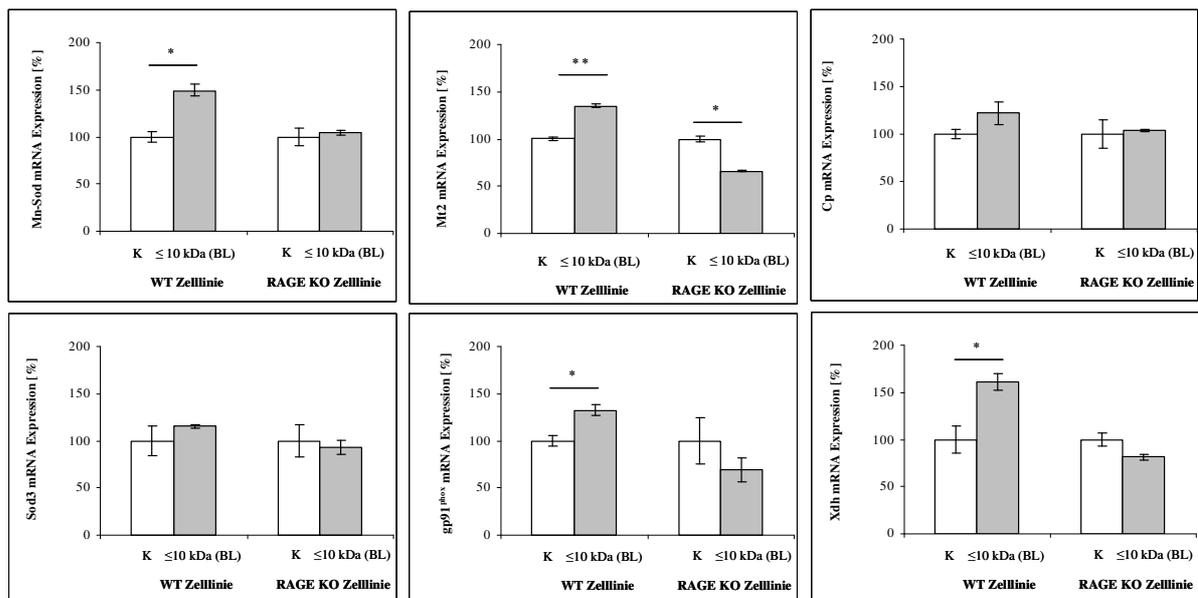


Abb. 4.39: Analyse des Einflusses der $\le 10\text{ kDa}$ Fraktion des BL auf die Entwicklung des oxidativen Stresses **A:** Die ROS-Produktion wurde durch die vermehrte DCF-Bildung relativ zu den Kontrollzellen, welche jeweils auf 100 % normiert wurden, bestimmt. Die konfluenten unter Serumreduktion kultivierten WT Zellen wurden nach 10 minütiger Inkubationszeit mit der $\le 10\text{ kDa}$ Fraktion des BL-Extrakt behandelt und anschließend durchflusszytometrisch vermessen. **B:** Die oxidativen Effekte der $\le 10\text{ kDa}$ Fraktion des BL wurden nach 24stündiger Behandlung anhand der konfluenten unter serumreduzierenden kultivierten WT- und RAGE KO Zellen durch den Proteincarbonylgehalt mittels Oxyblot im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (Normierung auf 100 %) bestimmt. (MW aller Experimente \pm SEM; n = 4).

Einfluss der $\le 10\text{ kDa}$ Fraktion des BL auf die Expression pro-/antioxidativer Gene: Die WT Zellen zeigten ein ähnliches Verhalten, wie es für die BKE/BL-Fractionen ermittelt wurde (Abschnitt 4.2.6 / Abb. 4.27). Es wurde durch diese niedermolekulare BL-Fraktion eine wenn auch geringere signifikante mRNA-Expressionssteigerung im Vergleich zur Kontrolle bei folgenden Genen erzielt: *Mn-Sod*, *Mt2*, *gp91^{phox}*, *Xdh* und *Vnn3*. Unreguliert blieben hingegen das *Cp*, die *Ec-Sod* sowie das *Vnn1*. Die RAGE KO Zellen sprachen auf die Behandlung mit dieser niedermolekularen BL-Fraktion zu dem analysierten Zeitpunkt mit keiner vermehrten Expression pro-/antioxidativer Gene an, vielmehr blieben die Gene *Mn-Sod*, *Cp*, *Ec-Sod*, *gp91^{phox}*, *Xdh*, *Vnn1*, *Vnn3* unreguliert. Der Einsatz einer letztlich geringeren Konzentration der wirksamen Komponenten des Brotkrustenextraktes scheint eine mögliche Involvierung des RAGE Rezeptors (WT Zellen) an der antioxidativen Wirkung deutlich zu machen.



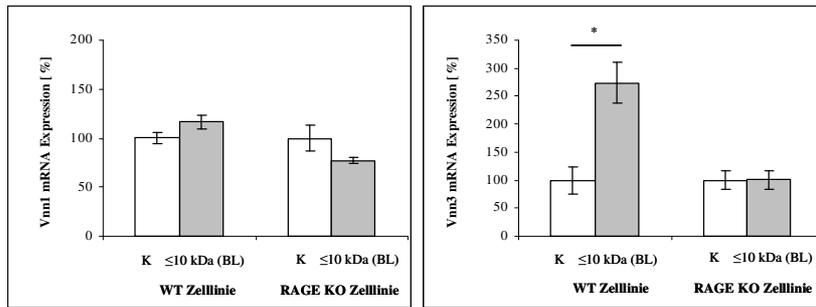
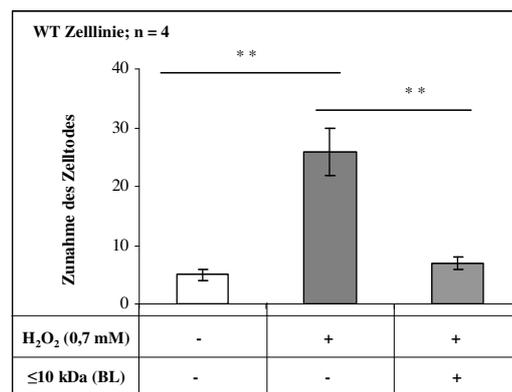
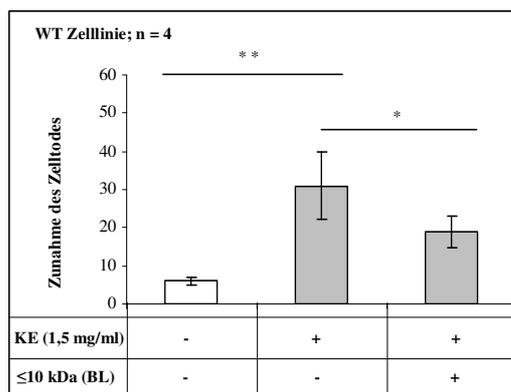


Abb. 4.40: Analyse des Einflusses der ≤10kDa Fraktion des BL-Extraktes auf die Expression unterschiedlicher pro-/antioxidativer Gene. Konfluente unter Serumreduktion kultivierte WT- und RAGE KO Zellen wurden mit der ≤10 kDa Fraktion des BL-Extraktes für 16 Std. behandelt. Anschließend wurde RNA isoliert, die Gene per RT-PCR Reaktionen quantifiziert und das jeweilige Expressionsniveau durch einen 18 S rRNA Abgleich normalisiert und auf die Kontrollen (100 %) normiert. (MW ± SEM; n = 3; * P ≤ 0,05 vs. Kontrollzellen; ** P ≤ 0,01 vs. Kontrollzellen).

Analyse des Präkonditionierungseffektes unter Verwendung der ≤10 kDa Fraktion des BL-Extraktes: Ausgehend von der Hypothese, dass die vermehrte Expression antioxidativer Gene zu einem gesteigerten Schutz vor zelltodinduzierenden Agenzien mit hohen oxidativen Potential (H₂O₂/KE) beiträgt, wurden Präkonditionierungsexperimente an WT- und RAGE KO Zellen mit der ≤10 kDa Fraktion des BL-Extraktes durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass die niedermolekulare BL-Fraktion bei den WT Zellen in der Lage war, den durch KE und H₂O₂ induzierten Zelltod zu reduzieren, wohingegen diese Effekte bei den RAGE KO Zellen nicht gefunden wurde. Bei den RAGE KO Zellen wurde der Anteil des durch H₂O₂ induzierten Zelltodes reduziert, erreichte jedoch kein Signifikanzniveau. Diese Daten korrelieren wiederum gut mit den zuvor ermittelten RT-PCR Daten, wo letztlich nur bei den WT Zellen durch die ≤10 kDa Fraktion eine vermehrte Expression an pro-/antioxidativen Genen gefunden wurde. Somit scheinen die RAGE exprimierenden WT Zellen im Gegensatz zu den RAGE KO Zellen auf das niedermolekulare BL-Extrakte anzusprechen, wodurch eine Beteiligung des RAGE Rezeptors bei der Induktion einer antioxidativen Kapazität wahrscheinlich ist.



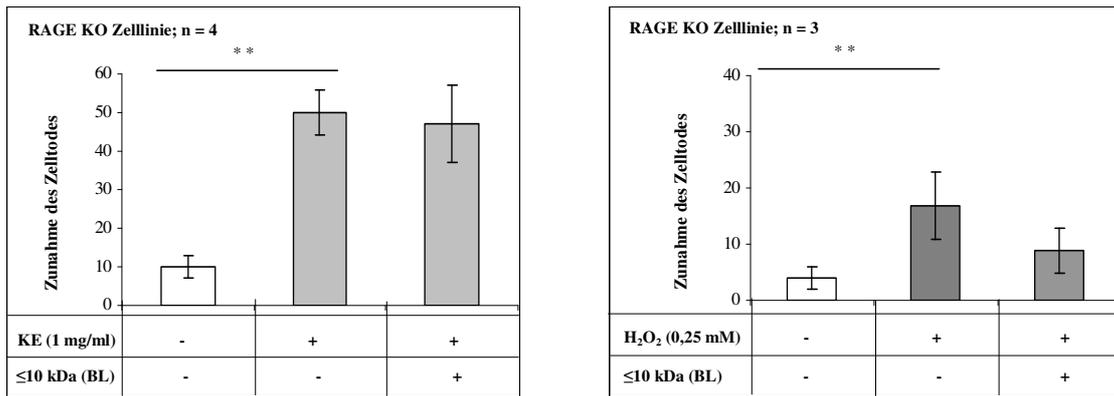


Abb.4.41: Präkonditionierungsexperimente mit der ≤ 10 kDa Fraktion des BL-Extraktes unter Verwendung der zellschädigenden Agenzien H₂O₂ und KE Konfluente unter Serumreduktion kultivierte WT- und RAGE KO Zellen wurden für 24 Std. mit ≤10 kDa Fraktion des BL behandelt, anschließend zweimal gewaschen und für weitere 24 Std. mit H₂O₂ bzw. KE in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Der Anteil des Zelltodes wurde durchflusszytometrisch mittels PI-Färbung analysiert, wobei die Zelltodsteigerung im Vergleich zur Kontrolle ersichtlich wird. (MW_{aller Experimente} ± SEM; * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; ANOVA-Analyse).

4.2.7.2 Analyse von Pronyl-L-Lysin modifizierten BSAs (PL-BSA)

Da singuläres Pronyl-L-Lysin in der Literatur mit antioxidativen Effekten assoziiert wird (64), wurde Pronyl-L-Lysin modifiziertes BSA auf seine zellulären Effekte an den WT Zellen untersucht. Singuläres Pronyl-L-Lysin [(2,4-Dihydroxy-2,5-dimethyl-1-(5-acetamino-5-methoxycarbonyl-pentyl)-3oxo-2H-pyrrol)] stand aufgrund der kostenintensiven Herstellung nicht zur Verfügung. Analysen von Lindenmeier *et al.* (64) des Brotkrustenextraktes zeigten, dass 62,2 mg Pronyl-L-Lysin in 1 kg BKE enthalten sind. Rechnerisch ergibt sich, dass bei der meist verwendeten BKE-Konzentration von 10 mg/ml 2,3 μM Pronyl-L-Lysin enthalten sind (0,272 μg/ml, MW = 272 g/l). Bezieht man dies auf das Molekulargewicht von BSA (MW = 66000 g/l) ergibt sich, dass maximal eine Konzentration von 2,3 μM PL-BSA (151,8 μg/ml) jener 10 mg/ml BKE-Konzentration entspricht. Allerdings ist der Modifikationsgrad der Proteine/Peptide sowie der Anteil an freiem Pronyl-L-Lysin im BKE nicht bekannt, sodass diese Konzentration kaum mit der Konzentration des modifizierten BSA vergleichbar ist und sicher geringer als jene errechneten 2,3 μM.

Proliferations- und Zellvitalitätsprüfungen: Das Proliferationsvermögen der WT Zellen unter PL-BSA bzw. BSA Behandlung wurde mit Hilfe des Alamar Blue Tests bestimmt. Die subkonfluenten WT Zellen, welche für 24 Std. mit PL-BSA inkubiert wurden, wiesen in einem Konzentrationsbereich von 0,4 nM bis 0,6 μM keine veränderte Resorutin-Bildung im Vergleich zu den mit BSA behandelten bzw. Kontrollzellen auf. Ab einer Konzentration von 1,2 μM PL-BSA wurde jedoch eine signifikant verminderte Resorutin-Bildung festgestellt. Fortführende Vitalitätsuntersuchungen mittels PI-Färbung an WT Zellen ließen erkennen, dass das modifizierte BSA ab einer Konzentration von 0,05 μM zu einem signifikant vermehrten Zelltod führte, wobei der Effekt bei BSA behandelten Zellen nicht auftrat. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden weitergehende Analysen mit einer PL-BSA Konzentration von unter 0,05 μM durchgeführt.

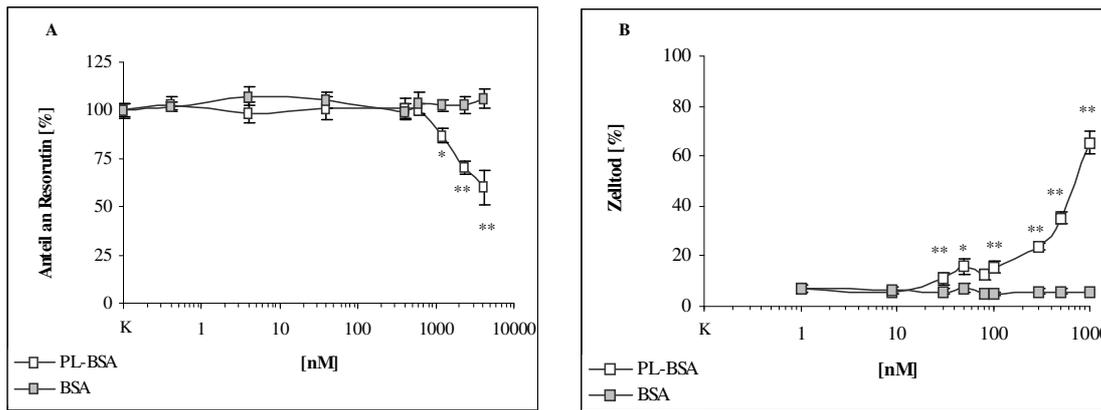


Abb. 4.42: Analyse des Einflusses des PL-BSA auf das Proliferationsniveau und Zelltodentwicklung der WT Zellen **A:** Die WT Zellen wurden subkonfluent mit den angegebenen Konzentration für 24 Std. behandelt und die proliferative-/reduzierende Kapazität durch Zugabe von Alamar Blue mittels Absorptionsmessung bestimmt. **B:** Konfluente unter serumreduzierten Bedingungen gewachsene Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen für 24 Std. behandelt und der Zelltod durchfluss-zytometrisch mittels PI-Färbung analysiert. (n = 3; MW_{aller Experimente} ± SEM; * P ≤ 0,05 vs. unbehandelte Kontrolle; ** P ≤ 0,01 vs. unbehandelte Kontrolle).

Einfluss des PL-BSAs auf die Expression pro-/antioxidativer Gene: Der Einfluss von PL-BSA wurde mittels einer konzentrationsabhängigen Stimulation (24 Std.) der WT Zelllinie in Bezug auf die Expression pro-/antioxidativer Gene analysiert. Hierbei zeigte sich (Tabelle 4.10), dass nichttoxische PL-BSA Konzentrationen bei pro- wie antioxidativen Genen keine Expressionsveränderungen induzierten. Erst bei einer Konzentration von 400 nM wurden *Ec-Sod*, *Cp* sowie *Xdh* signifikant vermindert exprimiert, wobei dieser Effekt mit der toxischen Wirkung der PL-BSA Konzentration korrelieren kann.

Gene, assoziiert mit antioxidativen Eigenschaften

| WT (PL-BSA: nM) | <i>Cu-Zn-Sod</i> | <i>Mn-Sod</i> | <i>Ec-Sod</i> | <i>Cat</i> | <i>Mt1</i> | <i>Mt2</i> | <i>Cp</i> |
|-----------------|------------------|---------------|---------------|------------|------------|------------|-----------|
| 0 | 100 ± 0 | 100 ± 0 | 100 ± 0 | 100 ± 0 | 100 ± 0 | 100 ± 0 | 100 ± 0 |
| 0,04 | 109 ± 24 | 108 ± 18 | 107 ± 10 | 207 ± 39 | 104 ± 5 | 106 ± 3 | 108 ± 13 |
| 0,4 | 83 ± 3 * | 119 ± 11 | 88 ± 14 | 139 ± 31 | 98 ± 21 | 85 ± 12 | 93 ± 10 |
| 4 | 109 ± 11 | 151 ± 18 | 105 ± 4 | 217 ± 73 | 80 ± 17 | 92 ± 3 | 112 ± 16 |
| 40 | 148 ± 52 | 132 ± 16 | 125 ± 31 | 294 ± 130 | 92 ± 12 | 86 ± 17 | 89 ± 7 |
| 400 | 79 ± 17 | 150 ± 16 | 82 ± 2* | 87 ± 30 | 83 ± 22 | 73 ± 12 | 62 ± 5 * |

Gene, assoziiert mit oxidativen Stressantworten

Gene, assoziiert mit oxidativen Eigenschaften

| WT (PL-BSA nM) | <i>Vnn1</i> | <i>Vnn3</i> | <i>Sip</i> | WT (PL-BSA: nM) | <i>gp91^{phox}</i> | <i>Nox4</i> | <i>Xdh</i> |
|----------------|-------------|-------------|------------|-----------------|----------------------------|-------------|------------|
| 0 | 100 ± 0 | 100 ± 0 | 100 ± 0 | 0 | 100 ± 0 | 100 ± 0 | 100 ± 0 |
| 0,04 | 77 ± 1 * | 128 ± 39 | 113 ± 14 | 0,04 | 126 ± 12 | 105 ± 11 | 106 ± 27 |
| 0,4 | 118 ± 26 | 125 ± 44 | 73 ± 24 | 0,4 | 102 ± 16 | 118 ± 12 | 90 ± 14 |
| 4 | 116 ± 15 | 121 ± 18 | 107 ± 3 | 4 | 117 ± 5 | 105 ± 17 | 109 ± 8 |
| 40 | 124 ± 13 | 175 ± 49 | 148 ± 49 | 40 | 96 ± 27 | 175 ± 43 | 76 ± 7 |
| 400 | 115 ± 6 | 117 ± 23 | 88 ± 16 | 400 | 79 ± 7 | 61 ± 16 | 57 ± 1 ** |

Tabelle 4.12: Darstellung der Expressionsanalysen der pro-/antioxidativen Gene nach konzentrationsabhängiger PL-BSA Behandlung der WT Zelllinie. Konfluente unter Serumreduktion kultivierte WT Zellen wurden für 24 Std. mit den angegebenen PL-BSA Konzentrationen behandelt und anschließend RNA isoliert. Die aufgelisteten Gene wurden durch RT-PCR Analyse quantifiziert und auf 18 S rRNA normiert, wobei die unbehandelten Kontrollzellen auf 100 % gesetzt wurden. (n = 3; MW_{aller Experimente} ± SEM; * P ≤ 0,05 vs. unbehandelte Kontrolle; ** P ≤ 0,01 vs. unbehandelte Kontrolle).

Analyse des Präkonditionierungseffektes unter Verwendung von PL-BSA: Wie in Abb. 4.43 dargestellt, wurde der durch H_2O_2 /KE verursachte Zelltod durch das Präkonditionieren mit dem PL-BSA bei den WT Zellen nicht vermindert. Somit kann dieses modifizierte Pronyl-L-Lysin BSA nicht für die vermehrte zelluläre antioxidative Kapazität verantwortlich gemacht werden.

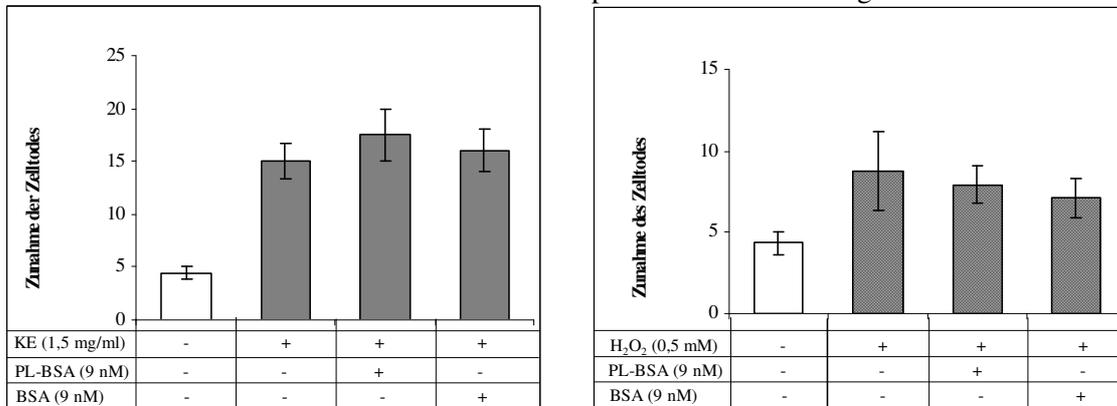


Abb. 4.43: Präkonditionierung der WT Zellen mit PL-BSA/BSA Konfluente unter Serumreduktion kultivierte WT Zellen wurden für 24 Std. mit \pm PL-BSA/BSA (9 nM) behandelt, anschließend gewaschen und für weitere 24 Std. mit H_2O_2 (0,5 mM) bzw. KE (1,5 mg/ml) inkubiert. Der Anteil des Zelltodes wurde durchflusszytometrisch mittels PI-Färbung oder durch LDH-Freisetzung analysiert. [MW _{aller Experimente} \pm SEM; n = 4 (KE); n = 3 (H_2O_2)].

4.2.8 Analyse des Einflusses der BKE-Fütterung bei Mäusen

Um die Relevanz der bisherigen an Zelllinien ermittelten Daten zu verifizieren, wurden *in vivo* Fütterungsversuchen durchgeführt. Dafür wurden jeweils 14 nu/nu Mäuse mit einer Kontrolldiät bzw. einer mit 15 % BKE angereicherten Diät für 14 Tage gefüttert.

Einfluss der AGE-reichen Fütterung auf den AGE-Gehalt des Plasmas: Bei der Analyse des Serums der Mäuse wurde mittels AGE-Fluoreszenzmessung eine vermehrte AGE-Akkumulation im Blut (Abb. 4.44A) sowie eine tendenziell erhöhte CML-Akkumulation (Abb. 4.44B) an Plasmaproteinen der mit Brotkrustenextrakt gefütterten Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren gefunden.

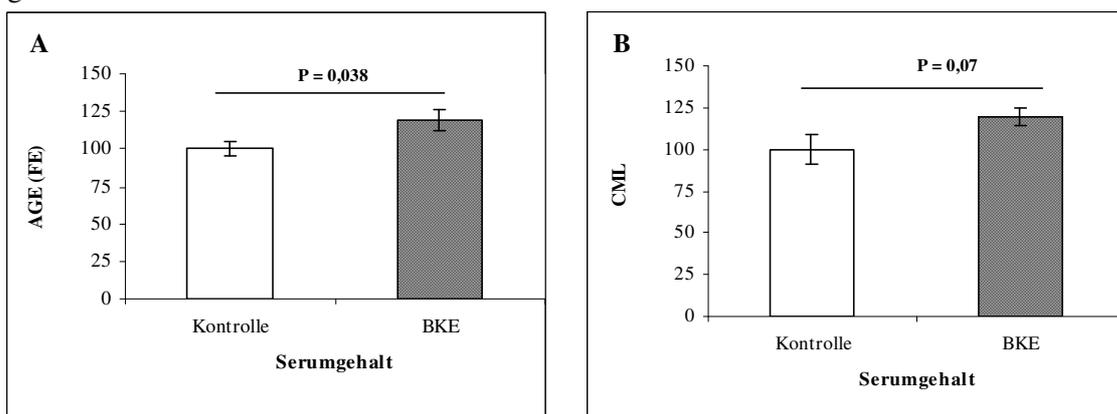
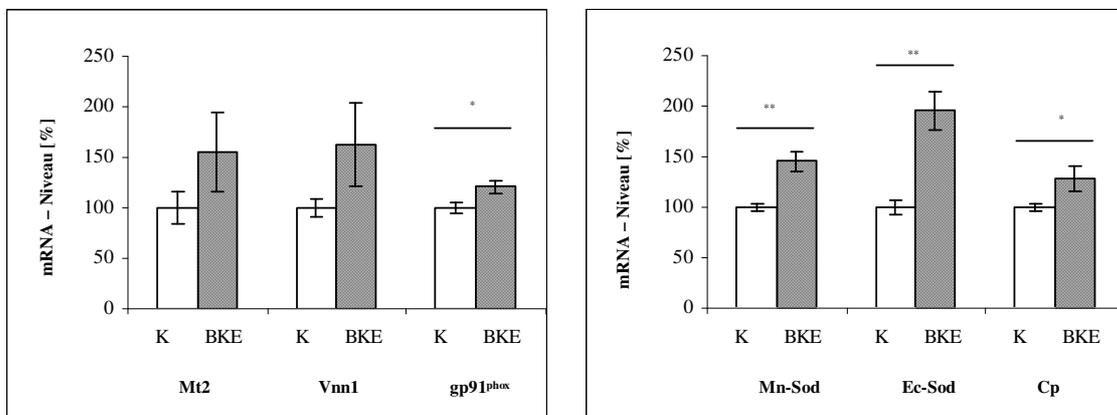


Abb. 4.44: Bestimmung der AGE-Fluoreszenzwerte und CML-Werte des Blutserums Kontroll- (n=13) und BKE gefütterte Mäuse (n=13) wurden durch zervikale Dislokation getötet, das Blut entnommen und durch Zentrifugation das Serum erhalten. **A:** Die AGE-Fluoreszenzeinheiten (FE) wurden durch Fluoreszenzmessung ($A_{\text{Extinktion}} = 370 \text{ nm}$, $A_{\text{Emission}} = 440 \text{ nm}$), **B:** die CML-Werte durch Dot-Blot Analysen ermittelt (MW \pm SEM).

Analyse des Einflusses der BKE-reichen Fütterung auf die Expression von pro-/antioxidativen Genen und AGE-Ablagerung im Myokard: Die Zellkulturexperimente zeigten, dass die Behandlung mit den AGE-reichen Brotkrustenfraktionen zu einer Erhöhung der antioxidativen Zellkapazität führte, die vor oxidativen Stressschäden schützen konnte (Abschnitt 4.2.6). Der Einfluss der BKE-Fütterung auf die Expression pro-/antioxidativer Gene des Myokards wurde durch RT-PCR Analysen verifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass durch diese Fütterung die mRNA-Expressionen pro- sowie antioxidativer Gene signifikant vermehrt wurden. Hierzu zählt als ein prooxidatives Gen die funktionelle Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase *gp91^{phox}*. Als antioxidative Gene wurden die Superoxiddismutasen *Mn-Sod*, *Ec-Sod* und *Cp* signifikant vermehrt exprimiert. Eine tendenzielle aber nicht signifikant vermehrte Expression zeigte sich für das *Mt2* sowie *Vnn1*. Kein verändertes mRNA-Niveau durch die BKE-Fütterung zeigten die Gene der *Cu-Zn-Sod*, *Cat*, *Mt1*, *Sip*, *Nox4*, *Xdh*. *Vnn3* konnte nicht in allen Proben, unabhängig von Kontroll- oder BKE-Gruppe, nachgewiesen werden und lies somit keine aussagekräftige Auswertung zu.



| | <i>Cu-Zn-Sod</i> | <i>Mn-Sod</i> | <i>Ec-Sod</i> | <i>Cat</i> | <i>Mt1</i> | <i>Mt2</i> | <i>Cp</i> |
|----------------|------------------|---------------|---------------|------------|------------|------------|------------|
| Kontrollgruppe | 100 ± 5 | 100 ± 4 | 100 ± 8 | 100 ± 9 | 100 ± 8 | 100 ± 16 | 100 ± 4 |
| BKE-Gruppe | 107 ± 14 | 146 ± 9 ** | 196 ± 19 ** | 127 ± 9 | 120 ± 13 | 155 ± 39 | 129 ± 12 * |

| | <i>Vnn1</i> | <i>Vnn3</i> | <i>Sip</i> | | <i>gp91phox</i> | <i>Nox4</i> | <i>Xdh</i> |
|----------------|-------------|-------------|------------|----------------|-----------------|-------------|------------|
| Kontrollgruppe | 100 ± 9 | – | 100 ± 8 | Kontrollgruppe | 100 ± 5 | 100 ± 13 | 100 ± 9 |
| BKE-Gruppe | 163 ± 41 | – | 122 ± 19 | BKE-Gruppe | 121 ± 6 * | 120 ± 18 | 118 ± 8 |

Tabelle 4.13/ Abb. 4.45: Analyse der BKE-Fütterung auf pro-/antioxidative Gene im Vergleich zu Kontrolltieren. Mäuse wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen mit einer 15 % angereicherten BKE-Diät bzw. Kontrolldiät gefüttert. Aus den entnommenen Herzen wurden RNA isoliert (Kontrolle n=9, BKE n=8), und die angegebenen Gene mittels RT-PCR Analyse verifiziert, wobei die Gene auf 18 S rRNA normalisiert und die Kontrollgruppe auf 100 % normiert wurde. (MW ± SEM; * P ≤ 0,05 vs. Kontrollgruppe, ** P ≤ 0,01 vs. Kontrollgruppe).

Durch Western-Blot Analysen der Mn-SOD und Ec-SOD wurde ebenfalls eine erhöhte Proteinexpression beider SOD-Formen in der BKE-Fütterungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen (Abb. 4.46).

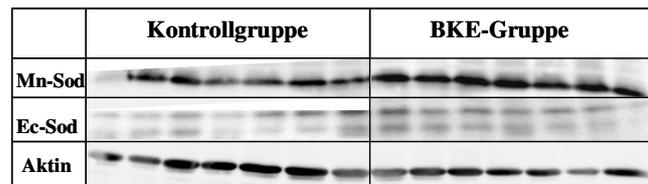
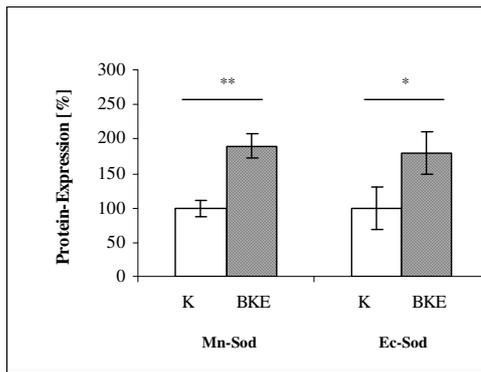


Abb. 4.46: Einfluss der BKE-Fütterung auf die Mn-, Ec-SOD Proteinexpression. Mäuse wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen mit einer 15% angereicherten BKE- bzw. Kontrolldiät gefüttert. Die Herzen wurden entnommen (n=14 je Gruppe), SDS-Proteinlysate hergestellt und die Mn-,Ec-SOD per Western-Blot analysiert, wobei auf Aktin abgeglichen und die Kontrollgruppe auf 100 % normiert wurde (MW ± SEM; *P ≤ 0,05 vs. Kontrollgruppe; **P ≤ 0,01 vs. Kontrollgruppe).

Zusätzlich konnte durch AGE-Fluoreszenz Messung sowie Dot-Blot Analysen (S006593) der Proteinproben analysiert werden, dass die Fütterung der Mäuse über einen Zeitraum von 14 Tagen zu keiner vermehrten AGE-Ablagerung im Myokard führte.

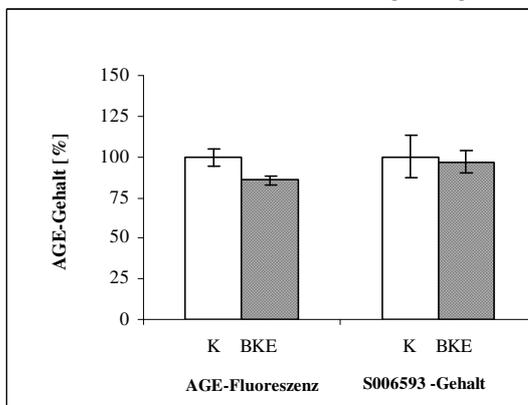


Abb. 4.47: Darstellung des AGE-Gehalts der Proteinproben nach BKE - bzw. Kontrollfütterung Die über einen Zeitraum von 14 Tagen mit BKE (n = 14) bzw. Kontrolldiät (n= 14) gefütterten Mäuse wurden getötet, die Herzen entnommen und SDS-Proteinlysate hergestellt. Der AGE-Gesamtgehalt dieser Lysate wurde mittels Fluoreszenzmessung und Normierung auf den Gesamtproteingehalt ermittelt ($A_{Extinktion} = 370 \text{ nm}$; $A_{Emission} = 440 \text{ nm}$). Der S006593-Gehalt wurde mittels des S006593 Antikörpers über Dot-Blot Analyse und gleichzeitige Normierung auf GAPDH ermittelt (MW ± SEM).

Analyse fibrotischer Genmarker nach BKE-Fütterungsversuch: Um zu analysieren, ob die Fütterung der Mäuse mit einer BKE- reichen bzw. Kontrolldiät einen Einfluss auf die Entwicklung einer kardialen Fibrose ausübt, wurden die isolierten RNA des Myokards RT-PCR Analysen in Bezug auf die mit Fibrose assoziierten Gene unterzogen. Wie in Tabelle 4.14 dargestellt, führte diese Fütterung zu keiner veränderten mRNA-Expression des *Tgf-β1*, der *Mmp9* und *-13* sowie der *Timp1* und *-3*. Alleinig die *Mmp2* mRNA-Expression wurde gering aber signifikant vermehrt exprimiert. Eine Veränderung von EZM-Proteinen und Myofibroblastenmarkern zeigte sich ebenfalls nicht.

transforming growth factor β1, Matrixmetalloproteinasen und deren Inhibitoren (Timps)

| | <i>Tgf-β1</i> | <i>Mmp2</i> | <i>Mmp9</i> | <i>Mmp13</i> | <i>Timp1</i> | <i>Timp3</i> |
|----------------|---------------|-------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| Kontrollgruppe | 100 ± 16 | 100 ± 5 | 100 ± 14 | 100 ± 8 | 100 ± 19 | 100 ± 9 |
| BKE-Gruppe | 116 ± 21 | 126 ± 11 * | 121 ± 13 | 119 ± 14 | 70 ± 10 | 103 ± 13 |

EZM-Proteine und Myofibroblastenmarker

| | <i>Coll1a1</i> | <i>Col3a1</i> | <i>Lamb2</i> | <i>Fbln5</i> | <i>Acta2</i> | <i>Tpm1</i> |
|----------------|----------------|---------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| Kontrollgruppe | 100 ± 13 | 100 ± 10 | 100 ± 2 | 100 ± 6 | 100 ± 16 | 100 ± 5 |
| BKE-Gruppe | 112 ± 15 | 105 ± 11 | 94 ± 7 | 84 ± 6 | 107 ± 18 | 109 ± 5 |

Tabelle 4.14: Analyse der BKE-Fütterung auf die mit Fibrose assoziierten Gene im Vergleich zu Kontrolltieren. Mäuse wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen mit einer 15 % angereicherten BKE- bzw. Kontrolldiät gefüttert wurden. Aus den entnommenen Herzen wurde RNA isoliert (Kontrolle n =9, BKE n =8) und die aufgeführten Gene mittels RT-PCR Analyse verifiziert, wobei diese auf 18 S rRNA normiert und die Kontrollgruppe auf 100 % standardisiert wurde. (MW ± SEM).

5 Diskussion

Die im Organismus durch nichtenzymatische Glykierung aus reduzierenden Zuckern und reaktiven Aminogruppen von Proteinen/Lipiden entstehenden AGEs können eine Vielzahl von zellulären Dysfunktionen durch rezeptorunabhängige sowie rezeptorabhängige Mechanismen induzieren (43, 91, 92). Die nichtenzymatischen Proteinmodifikationen von mitochondrialen Proteinen bzw. des basalen Fibroblastenwachstumsfaktors (bFGF) führten zu einer Inhibierung ihrer funktionellen Aktivität (93, 94). Die Glykierungsendprodukte können ebenso durch eine Rezeptorinteraktion wirken, wobei zwischen AGE-abbauenden und Signaltransduktionsmechanismen induzierenden Rezeptoren unterschieden wird (42, 92). Der hauptsächlich mit der Induktion von Signaltransduktionsmechanismen assoziierte RAGE-Rezeptor weist neben einer extrazellulären ligandenbindenden Domäne und einer Transmembrandomäne, eine kurze für die Vermittlung der Signaltransduktion essentielle zytosolische Domäne auf (95). Über die Aktivierung zahlreicher unterschiedlicher Kinasen und Transkriptionsfaktoren (88, 96) kann die AGE-RAGE Interaktion zu einer veränderten Expression von EZM-Proteinen, Zytokinen, Wachstumsfaktoren und proinflammatorischen Markergenen beitragen (97-99). Dadurch wird dieser Rezeptor mit der Induktion von z.B. kardiovaskulären und renalen Erkrankungen in Verbindung gebracht (91).

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung der weit weniger gut analysierten exogenen in Nahrungsmitteln gebildeten AGE-Verbindungen (Brotkrusten- und Kaffeeextrakt) auf die Zellfunktionen kardialer Fibroblasten zu analysieren. Als zweites sollte die potentielle Rolle des AGE-Rezeptors RAGE bei den durch AGE-reiche Nahrungsmittlextrakte induzierten zellulären Reaktionen untersucht werden. Zur Analyse dieser Fragestellung wurden als *in vitro* Zellkulturmodelle zwei murine kardiale Fibroblastenzelllinien - die WT- sowie die RAGE KO Zelllinie- etabliert.

5.1 Charakterisierung der RAGE exprimierenden WT- sowie RAGE KO Fibroblastenzelllinien

Die zur Herstellung der Zelllinien verwendeten männlichen C57Bl/6 WT- sowie RAGE KO Mäuse wurden vorab auf ihre RAGE-Expression untersucht, welcher in zahlreichen Organen und Zelltypen exprimiert wird (95). Eine starke Expression dieses Rezeptors wurde in dem Organ der Lunge und Haut sowie in Herz > Leber > Niere, Uterus > Gehirn nachgewiesen (100). Auf zellulärer Ebene weisen u.a. Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Monozyten/Makrophagen, kardiale Myozyten, Neuronen, Hepatozyten sowie Fibroblasten eine wenn auch unterschiedlich starke RAGE-Expression auf (88, 100-104). Korrelierend mit diesen Literaturdaten konnte in den Lungen- und Herzproben der C57Bl/6 WT Mäuse eine eindeutige RAGE-Expression nachgewiesen werden, wobei diese in den Lungenproben stärker ausgeprägt war (Abb. 4.1). Basierend auf der Aminosäuresequenz von RAGE wurde ein Protein mit dem Molekulargewicht von 42 kDa im Western-Blot nachgewiesen (103, 105). Das Auftreten von mehreren Banden mit unterschiedlichen Größen ist bei dem RAGE-Nachweis in Abhängigkeit von den verwendeten Organproben und der jeweiligen Spezies (Maus, Ratte, Mensch) eine typische Erscheinung (100, 106). Ursachen können unterschiedliche posttranslationale Prozessierungs- (z.B. Glykosylierungen der extrazellulären RAGE-Domäne) und proteolytische Abbauprozesse sein (103, 106). Die verwendeten RAGE KO Mäuse zeigten hingegen weder in der Lunge noch im Herzen eine RAGE-Expression. Allerdings

fürte die Herstellungstechnik der RAGE KO Mäuse zu einer ubiquitären EGFP-Expression (85), die in beiden Organen nachgewiesen wurde (Abb. 4.1).

Die aus den Herzen der C57Bl/6 WT- sowie RAGE KO Mäuse etablierten murinen Zelllinien bildeten sich durch spontane Transformation innerhalb der Alterungskrise (Abb. 4.2). Diese Methode wurde von Tadaro & Green, 1963 eingeführt und erweist sich bis heute als eine gängige Methode, Zelllinien aus primären Nagerzellen zu erzeugen (107). Der Nachweis der Etablierung von Fibroblastenzelllinien erfolgte durch den Nachweis der Prolyl-4-Hydroxylase (P4H). Die P4H stellt ein intrazelluläres Enzym dar, das aus einer enzymatisch aktiven α - sowie stabilisierenden β - (Disulfidisomerase) Untereinheit (P4H α 1, P4H β) besteht und für die Co- und posttranslationelle Hydroxylierung von Prolinresten insbesondere in Kollagenen erforderlich ist. Da die Fibroblasten hauptverantwortlich für die Kollagensynthese sind, wird dieses Enzym (P4H) vornehmlich von diesem Zelltyp exprimiert (108). Im Vergleich zur etablierten NIH3T3-Fibroblastenzelllinie zeigten die beiden neuen Fibroblastenzelllinien ein vergleichbares mRNA Niveau der *P4h* Untereinheiten (Abb. 4.4). Zur eingehenden Charakterisierung der beiden Fibroblastenzelllinien sowie zur Erklärung der Wirkung AGE-reicher Nahrungsmittelextrakte wurde die mRNA-Expression von weiteren AGE-bindenden Rezeptoren analysiert (Abb.4.5/Tabelle 4.1). Die WT Zelllinie exprimiert den RAGE-Rezeptor, wohingegen dies bei den RAGE KO Zellen aufgrund ihrer Herstellung auszuschließen war. Bei beiden Zelllinien waren weitere hauptsächlich mit dem AGE-Abbau assoziierte Rezeptoren - *Age-r1*, *-r2*, *-r3* sowie den *scavenger receptor B I (Srb1)* - nachweisbar, deren Expression bis auf SRB1 bereits für humane- sowie Fibroblasten der Ratte beschrieben wurde (104, 109). Jedoch gab es Unterschiede hinsichtlich der Expressionsniveaus der AGE-, „*Clearence*“ Rezeptoren (Tabelle 4.1). Die WT Zellen wiesen eine deutlich höhere *Srb-1* mRNA-Expression im Vergleich zu den RAGE KO Zellen auf, wohingegen diese Zelllinie (RAGE KO) eine vermehrte *Age-r1* sowie *Age-r3* mRNA-Expression zeigte. Diese veränderte AGE-Rezeptorexpression der RAGE KO Zellen im Vergleich zu den WT Zellen kann als Kompensationsmechanismus des fehlenden RAGE Rezeptors gewertet werden (110). Ein ähnlicher Mechanismus wurde bei AGE-R3 knock out Mäusen von Pugliese *et al.* gefunden. Der knock out dieses „AGE-Clearence“ Rezeptors äußerte sich im Vergleich zu den WT Mäusen in einer verminderten Expression des AGE-R1 und Makrophagen Scavenger Rezeptor A sowie einer vermehrten Expression von AGE-R2 und RAGE (111). Aus dem unterschiedlichen AGE-Rezeptorbesatz der Fibroblastenzelllinien könnte sich eine unterschiedliche Wirkweise der Nahrungsmittel-AGE Modifikationen ergeben, da folglich an beiden Zelllinien differente AGE-Modifikationen und AGE-Konzentrationen wirken können.

Neben den Unterschieden in der Rezeptorexpression beider Zelllinien zeigten diese auch Differenzen hinsichtlich ihrer zellulären Morphologie und ihres Wachstumsverhaltens. Die RAGE KO Zellen zeichneten sich durch ein signifikant langsames Wachstum in der logarithmischen Wachstumsphase sowie durch ein größeres zelluläres Volumen im Vergleich zu den WT Zellen aus. Sie erreichten im konfluenten Zustand eine geringere Endzellzahldichte als die WT Zelllinie (Abb. 4.6/Tabelle 4.2). Fortführende cDNA-Microarray Analysen zwischen der WT- und RAGE KO Zelllinie und die funktionelle Zuordnung der differentiell regulierten Gene zeigte, dass

besonders bei den WT Zellen Gene vermehrt exprimiert wurden, die mit Zellproliferation und Überleben korrelierten (Tabelle 4.3). Im folgendem Abschnitt sollen Gene der Tabelle 4.3 näher erklärt werden, die für das beschriebene langsamere Wachstum und für die veränderte Morphologie des RAGE KO Zelltyps im Vergleich zu WT Zellen verantwortlich sein könnten. Hierbei wird ausschließlich auf das veränderte mRNA-Expressionsniveau der beschriebenen Gene eingegangen. Auf eine Analyse der Gene auf Proteinebene wurde aufgrund der Vielzahl differentiell exprimierten Gene verzichtet, wohl wissend das beide Prozesse nicht immer miteinander korrelieren müssen.

Als charakteristisch stellte sich das Gen Glypican 3 (*Gpc3*) heraus, dass nur von den RAGE KO Zellen exprimiert wurde. GPC3 stellt ein integrales Proteoglycan der EZM dar, welches hauptsächlich in Gewebe mesodermalen Ursprungs (z.B. Fibroblasten des Herzens) exprimiert wird und als Rezeptor fungieren kann (112). Zusätzlich wurde erkannt, dass der GPC3 Rezeptor als Gegenspieler zum IGF1-Rezeptor fungiert und durch Bindung des Wachstumsfaktors IGF2 (*insulin growth factor 2*) dessen wachstumsfördernden Effekt unterbinden kann (113). Ergänzend zeigte sich bei der Auswertung der cDNA-Microarray Analysen, dass *Igf2* nur in verschwindend geringen Mengen von den RAGE KO Zellen jedoch in hohem Ausmaß von den WT Zellen exprimiert wurde. Die geringe *Igf2* Expression in Kombination mit einer kompetitiven Bindung dieses Faktors an *Gpc3* wäre eine teilweise Erklärung für das geringere Wachstum der KO Zellen.

Das *growth arrest specific 1* Gen (*Gas1*) vermittelt bei hoher Expression über einen p53 abhängigen Signalweg einen Wachstumsarrest der Zellen, indem ein Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus verhindert wird (114-116). Eine transiente Überexpression dieses Genes in NIH3T3 Fibroblasten führte neben einem induzierten Proliferationsstopp zu einer Veränderung der zellulären Morphologie. Die spindelförmigen NIH3T3 Fibroblasten entwickelten durch diese *Gas1* Überexpression eine abgeflachte Zellmorphologie sowie ein stark vergrößertes, strukturiertes Zytoplasma und einen vergleichsweise kleinen Zellkern (86). Eine Erklärung des langsameren Wachstums und der differentiellen Morphologie der RAGE KO Zellen im Vergleich zu den WT Zellen könnte somit teilweise durch die ~ dreifach stärkere *Gas1* mRNA-Expression erklärt werden. Dabei ist die *Gas1*-Expression der RAGE KO Zellen noch nicht so groß, dass diese Zellen vollkommen im Wachstum arretiert werden, sondern sich durch ein langsames Wachstum, ein größeres zelluläres Volumen und größeren Zelldurchmesser auszeichnen (Abb. 4.6/ Tabelle 4.2).

Ein weiteres interessantes Gen stellt das Adrenomedullin (*Adm*) dar, ein multifunktionelles Peptid, welches ubiquitär exprimiert wird und in Abhängigkeit von den analysierten Zelltypen über die Aktivierung der MAPK das Zellwachstum stimulieren oder über intrazelluläre cAMP Erhöhung inhibieren kann (117). Durch Tsuruda *et al.* wurde beschrieben, dass eine hohe ADM-Expression bei kardialen Fibroblasten zu einer Wachstumsarretierung/Verminderung führt (118). Die RAGE KO Zellen wiesen eine fünffach höhere *Adm* mRNA-Expression sowie zusätzlich eine ~zweieinhalbfach erhöhte Expression des einen Adm-Rezeptorbestandteils *Ramp2* (*receptor activity modifying protein 2*) auf. Dies kann zu einem verlangsamten Wachstum der RAGE KO Zellen im Vergleich zu den WT Zellen beitragen, da die ADM induzierte Signaltransduktion durch eine erhöhte *Ramp2* Expression gefördert wird (119).

Weiterhin wiesen die RAGE KO Zellen eine verminderte mRNA-Expression der Wachstumsfaktoren *Figf* (*c-fos induced growth factor*) (120), *Pdgfc* (*platelet-derived growth factor, C polypeptide*) (121) und *Spin* (*spindlin*) (122) sowie des antiapoptisch wirkenden Faktors Birc2 auf (123). Neben diesen Faktoren verfügten die RAGE KO- im Vergleich zu den WT Zellen jedoch z.B. über eine erhöhte Expression von proliferationsfördernden Faktoren wie dem Preproendothelin 1 (*Edn1*) (124), dem cysteinreichen Protein 61 (*Cyr61*) (125, 126) und der Cyclin abhängigen Kinase *Cdc2a* (127).

Hieraus lässt sich ableiten, dass die RAGE KO Zellen zur Proliferation und Überleben befähigt sind, jedoch der *knock out* des RAGE Rezeptor zu einem veränderten Wachstum und zellulärer Morphologie beiträgt. Untersuchungen an neuronalen Zellen mit dem RAGE-Liganden Amphoterin zeigten zudem, dass durch diese Liganden-Rezeptor Interaktion z.B. das Neuritenwachstum induziert und gefördert wurde (128). Folglich können durch eine RAGE-Liganden Interaktion, in Abhängigkeit des wirkenden Liganden, eine Vielzahl von unterschiedlichen zellulären Reaktionen (Zytokin-Freisetzung, ROS-Produktion, Zelldifferenzierung, Zellproliferation) induziert werden (129). Das bessere Wachstum der RAGE exprimierenden WT Zellen im Vergleich zu den RAGE KO Zellen könnte auf einen wachstumsfördernden Effekt des RAGE-Rezeptors in kardialen Fibroblasten hinweisen.

5.2 Das Brotkrusten- und Kaffeeextrakt stellen AGE-reiche Nahrungsmittelextrakte dar

Wie die im Organismus durch die nichtenzymatische Glykierungsreaktion gebildeten AGEs entstehen in beträchtlichem Ausmaß auch durch das Erhitzen in Nahrungsmitteln (130, 131).

Die zur Analyse ihrer Wirkung auf kardiale Fibroblastenzelllinien zur Verfügung gestellten Nahrungsmittelextrakte (BKE & KE) wiesen zahlreiche AGE-Modifikationen auf (Abb. 4.9). Hinsichtlich des Gehaltes der einzelnen Modifikationen (Arg-Pyr, Pentosidin, 3 DG-Imidazol, GA-Pyr, CML) zeigten die beiden Nahrungsmittelextrakte jedoch Unterschiede. Eine mögliche Erklärung für diesen unterschiedlichen Gehalt an AGE-Modifikationen könnte in dem differentiellen Nährstoffgehalt der für die Extrakterstellung verwendeten Ausgangsstoffe liegen. Der Brotteig enthält neben Proteinen (8,1 %), Ballaststoffen (2,8 %) und Wasser (23,4 %) hauptsächlich Kohlenhydrate (Stärke 65,2 %) und nur einen geringen Fettanteil (0,5 %) (56). Folglich reagieren bei der Brotherstellung hauptsächlich reduzierende Zucker (Mono-, Di-, Oligosaccharide) bzw. von Zuckern abstammende α -Dicarbonyle wie z.B. Methylglyoxal mit den reaktiven Aminogruppen von Peptiden/Proteinen. Die BKE/BL-Fractionen enthielten höhere Konzentrationen der Arg-Pyrimidin Modifikation als das KE, die aus der Reaktion zwischen zwei Molekülen Methylglyoxal und Arginin gebildet wird (132). Methylglyoxal selbst entsteht als ein Zuckerabbauprodukt bei der Maillard-Reaktion von Nahrungsmitteln (133). Durch die im Brotteig enthaltenen Stärkekonzentrationen könnten hohe Methylglyoxal-Konzentrationen gebildet werden, die die Wahrscheinlichkeit der Arg-Pyrimidin Entstehung im Vergleich zum KE steigern. Im Gegensatz dazu enthalten die zur Röstung verwendeten Kaffeebohnen einen hohen Lipidanteil (15 %) (134). Dadurch können bei der KE-Herstellung im Vergleich zur Brotkrustenextrakterstellung höhere Konzentrationen an Autoxidationsprodukten von ungesättigten Fettsäuren und Lipidperoxidationsprodukten wie z.B. MDA entstehen (Abb. 4.9B). Die Verbindungen reagieren

durch ihren Carbonylcharakter ebenfalls mit reaktiven Aminogruppen von Peptiden/Proteinen zu so genannten ALEs (*advanced lipoxidation endproducts*). Erwähnenswert ist dabei, dass z.B. CML sowohl als ein AGE- wie auch als ein ALE-Produkt anzusehen ist, da es neben einer Vielzahl von Bildungswegen (Wolffs-, Namiki Pathway, oxidativer Abbau von Amadori-Produkten) aus Carbonylen entstehen kann, die sowohl bei der Autoxidation von Kohlenhydraten als auch bei ungesättigten Fettsäuren auftreten (135-137). Goldberg *et al.* analysierten den CML-Gehalt in Bezug zur existenten Konzentration an Zuckern und Lipiden in Nahrungsmitteln. Bei diesen Untersuchungen stellte sich heraus, dass der CML-Gehalt der Nahrungsmittel vorwiegend mit dem Fettgehalt und nicht mit dem Zuckergehalt korrelierte (138). Folglich unterstützen diese Daten die Dot-Blot Befunde (Abb. 4.9A), die zeigen, dass im KE während des Röstprozesses mehr CML als beim BKE/BL-Extrakt gebildet wird.

Eine weitere AGE-Modifikation, die in beiden Extrakten in ähnlicher Konzentration vorkommt, stellte das GA-Pyridin dar. Diese Modifikation entsteht bei der Reaktion von Glycolaldehyd und Lysin und wurde bis jetzt *in vivo* in Schaumzellen nachgewiesen (139). Die allgemeine Existenz dieser AGE-Modifikation in erhitzten Nahrungsmitteln, wie sie in beiden untersuchten Nahrungsmittlextrakten nachgewiesen werden konnte, ist sehr wahrscheinlich. *In vitro* Modelluntersuchungen von Hofmann *et al.* zeigten, dass durch das Erhitzen von Kohlenhydrat-/Aminosäurelösungen (N-Acetyl-L-Lysin bzw. L-Alanin mit Glucose) sehr schnell hohe Glyoxal- sowie Glycolaldehydkonzentrationen gebildet wurden. Das hauptsächlich durch Oxidation der Schiff'schen Base- und Amadori-Produkte gebildete Glyoxal wird durch Reductone zu Glycolaldehyd reduziert, welches mit Lysin zur GA-Pyridin Modifikation reagieren kann (140).

Die BKE/BL-Fractionen enthielten im Vergleich zum KE höhere Konzentrationen von noch uncharakterisierten AGE-Modifikationen, die mittels des „anti-AGE (S006593)“ Antikörpers, generiert gegen Glucose induzierte BSA-Modifikationen, nachgewiesen wurden. Eine Erklärung dieses unterschiedlichen Gehaltes beider Extrakte könnte im Herstellungsprozess begründet liegen. Der Backprozess verlangt länger (3 Std.) Temperaturen von ca. 220 °C als der Röstprozess der Kaffeebohnen (15 - 25 min, 220 °C). Daten einer Kooperation der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Urszula Kanska (Wroclaw, Polen) unterstützen diese Befunde, da dieser Antikörper besonders gut stark thermisch glykierte AGE-Modifikationen erkennt.

Die AGE-Modifikationen Pentosidin und 3-DG-Imidazolone wurden mittels der Dot-Blot Analyse nur bei den BKE/BL-Fractionen nachgewiesen. Pentosidin, entstehend bei der Reaktion zwischen Pentosen und Lysin & Arginin, repräsentiert eine typische AGE-Verbindung, die bis jetzt in Nahrungsmitteln wie z.B. Milchprodukten nur in geringen Konzentrationen nachgewiesen wurde (2, 141). Als eine Hauptargininderivatisierung in Nahrungsmitteln wird die MG-Imidazolone Modifikation angesehen, die vor allem in Backprodukten nachgewiesen wurde (2, 142). 3-DG entsteht in der fortgeschrittenen Reaktionsphase der Maillard-Reaktion aus Amadori- und Heins-Produkten und kann folglich als α -Dicarbonyl mit der reaktiven Aminogruppe von Arginin zur 3-DG-Imidazolone Modifikation reagieren. Folglich stellt diese AGE-Verbindung ein weiteres Argininderivatisierungsprodukt in erhitzten Nahrungsmitteln dar, welches in den BKE/BL-Fractionen nachgewiesen wurde.

Unterschiede hinsichtlich der Zusammensetzung der im KE und BKE enthaltenen AGE/MRP-Produkte der späten Reaktionsphase wurden auch durch Adams *et al.* mittels thermischer Degradation bestätigt. Bei dieser Methode wurden keine intakten Melanoidinstrukturen identifiziert, jedoch bestimmte diagnostische Produkte, die über die potentielle AGE/MRP-Struktur eine Aussage zulassen. Aus dem BKE wurden im Gegensatz zum KE deutlich höhere Konzentrationen an Pyrazinen sowie Furanen freigesetzt, wohingegen nur das KE Pyridine- und Thiophene-Degradationsprodukte aufwies (143). Die Dot-Blot Analysen dieser Arbeit sowie die Befunde von Adams *et al.* belegen zum einen den „AGE-Reichtum“ der beiden getesteten Nahrungsmittlextrakte. Zum anderen wurde verdeutlicht, dass beide Extrakte AGE-Modifikationen in unterschiedlicher Zusammensetzung bzw. Konzentration enthielten. Zudem ist die Existenz weiterer AGE-Modifikationen anzunehmen, die aufgrund der putativen Vielzahl nicht weiter analysiert werden konnten. Letztlich können diese unterschiedlichen AGE-Modifikationen ein differentes zelluläres Wirkpotential der Extrakte ergeben.

5.3 Einfluss der AGE-reichen Nahrungsmittlextrakte auf zelluläre Funktionen

Das Interesse an systemischen Wirkungen der in Nahrungsmitteln enthaltenen Inhaltsstoffe nahm in den letzten Jahren deutlich zu. Hierdurch lässt sich auch die Vielzahl von *in vitro* und *in vivo* Studien hinsichtlich der Wirkung von Nahrungsmittel-AGEs/MRPs erklären (144). Problematisch ist dabei, dass die per komplexer Maillard-Reaktion gebildeten Modifikationen eine heterogene Stoffklasse repräsentieren. Es ist folglich schwierig, die unterschiedlichen und zum Teil widersprüchlichen biologischen Effekte spezifischen singulären AGE/MRP-Verbindungen zuzuordnen (145). Zu den bis jetzt beschriebenen Wirkungen dieser Substanzen zählen einerseits negative wie mutage, karzinogene, zytotoxische und quervernetzende Effekte (146-148) aber andererseits positive antioxidative-, antiallergene-, antimikrobielle-, „antiradikalische“ Wirkungen (64, 149-152).

Kontroversen hinsichtlich des Einflusses von Nahrungsmittel-AGEs/MRPs im Organismus ergaben sich auch bei der Analyse von Fütterungs-/Ernährungsstudien. Allgemein anerkannt ist, dass Nahrungsmittel-AGEs mit ca. 10-20 % in den Körper aufgenommen werden und zu einer Induktion unterschiedlichster Signaltransduktionsmechanismen beitragen können (131). Die Fütterungs-/Ernährungsstudien widersprachen sich allerdings in den ermittelten Endresultaten. Besonders bei erkrankten Tieren (Diabetes, Atherosklerose, nierengeschädigten Tieren) führte eine AGE-reiche Ernährung zu einer verstärkten Induktion von proinflammatorischen Zuständen, die in einer Verschlechterung des jeweiligen Erkrankungszustandes (Insulinresistenz, Gefäßwandverengungen, gesteigerte Nierenschädigungen) resultierte, wodurch die resorbierten Nahrungsmittel AGE-Modifikationen auch oft als Glykotoxine bezeichnet werden (40, 131, 153). Im Gegensatz dazu stehen Befunde von Somoza- sowie Chuyen *et al.*, die durch eine AGE-reiche Fütterung gesunder Tiere eine protektive Steigerung der antioxidativen Kapazität der Leber bzw. des Serums fanden (154, 155).

Um den Einfluss von exogenen AGEs/MRPs auf myokardiale Zellen zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit der Einfluss der beiden AGE-reichen Modellnahrungsmittlextrakte auf die Funktionalität und Rezeptorabhängigkeit mittels der beiden etablierten murinen kardialen Fibro-

lastenzelllinien analysiert. Bezug nehmend auf die durch Chuyen *et al.* sowie Somoza *et al.* erzielten Ergebnisse wurde ein besonderes Augenmerk auf Veränderungen der pro- und antioxidativen Genprodukte gelegt (154, 155).

5.3.1 Analyse der Wirkung des BKE auf die Funktion der kardialen Fibroblasten

Das BKE induzierte keine zytotoxischen Effekte, jedoch eine Modulation von Signaltransduktionsmechanismen (ROS, MAP-Kinasen, Transkriptionsfaktoren)

Analysen hinsichtlich der zytotoxischen Wirkung der unterschiedlichen Brotkrustenextrakt-Fractionen (BKE-, BL-, ≤ 10 kDa BL-Fraktion) zeigten, dass rezeptorunabhängig die Vitalität (Abb. 4.11 & 4.38) und die Proliferation beider Zelllinien (Abb. 4.12) nicht beeinträchtigt wurde. Ähnliche Untersuchungen hinsichtlich der toxischen Wirkung AGE-reicher Bäckereiprodukte unter Verwendung von der löslichen niedermolekularen Melanoidinfraktion eines Biscuits- sowie Gluten-Glucose Modellsystems wurden von Borrelli *et al.* an Caco-2 Zellen durchgeführt. Dabei zeigte sich übereinstimmend, dass beide AGE/MRP-reichen Fraktionen die Vitalität nicht verminderten (149).

Obwohl die Brotkrustenextrakt-Behandlung die zelluläre Vitalität und Proliferation nicht verschlechterte, kann sie die zelluläre Funktionalität durch Modulation von Signaltransduktionswegen beeinflussen (49). Ein Kennzeichen hierfür ist z.B. die vermehrte Umsetzung des Alamar Blue Farbstoffes (Abb. 4.10 & 4.38) - ein Effekt, der für eine zelluläre metabolische Aktivierung spricht (156). Zudem wurde durch die kurzfristige Behandlung mit den BKE-Fractionen eine moderat vermehrte ROS-Produktion festgestellt (Abb. 4.16 & 4.39), die durch unterschiedliche rezeptorabhängige sowie rezeptorunabhängige Mechanismen erklärt werden kann. Zum einen sind die Glykierungsendprodukte selbständig zur Radikalproduktion befähigt, wobei diese ROS-Produktion durch eine Interaktion mit den AGE-„*Clearance*“ Rezeptoren in unmittelbarer Nähe der Zellmembran geschehen kann (87, 140, 157-159). Die gebildeten Radikale können anschließend zum H₂O₂ dismutieren, so dass dieses über die Zellmembran aufgenommen und intrazellulär als *second messenger* Moleküle wirken, wodurch redoxsensitive Kinasen (MAPK) und Transkriptionsfaktoren (NF- κ B, AP-1) aktiviert werden können (160-163). Zum anderen wird beschrieben, dass durch die AGE-RAGE Interaktion vornehmlich über die zytosolische RAGE-Domäne eine Signaltransduktionskaskade induziert wird, die zu einer vermehrten Radikalproduktion beiträgt (128). Die durchgeführten DCFH-DA Untersuchungen ließen allerdings keine Aussage zu, ob die gesteigerte Radikalproduktion RAGE-abhängig verlief, da diese Methode bei den EGFP exprimierenden RAGE KO Zellen nicht anwendbar war (siehe Abschnitt 4.1.1). Es ist jedoch anzunehmen, dass diese beschriebenen Mechanismen parallel auftreten.

Untersuchungen von Zill *et al.* wiesen eine vermehrte Phosphorylierung der redoxsensitiven ERK1/2^{MAPK} sowie p38^{MAPK} in RAGE exprimierenden Caco-2 und HEK-293 Zellen nach BKE-Behandlung nach (164, 165). Der RAGE-Einfluss wurde durch den Einsatz eines antagonisierenden anti-RAGE Antikörpers sowie dem Vergleich der Stimulation zwischen *full length* RAGE- sowie *delta cyto* RAGE (Fehlen der cytosolischen Domäne) überexprimierenden Zellen analysiert. Dabei zeigte sich, dass neben einer RAGE Aktivierung weitere Mechanismen an der MAPK- und NF- κ B Aktivierung beteiligt sein müssen, da die BKE induzierten Effekte mit dem

antagonisierenden anti-RAGE Antikörpers bzw. mit den *delta cyto* RAGE überexprimierenden Zellen nicht komplett inhibiert werden konnten (165, 166). Diese Befunde stimmen mit den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen überein. Die Aktivierung der beiden MAPK (ERK1/2^{MAPK}, p38^{MAPK}, Abb.4.21a/b) und des Transkriptionsfaktors NF-κB (Abb. 4.23) durch die BKE/BL-Behandlung wurde bei beiden Zelllinien gefunden. Allerdings zeigte die Verschiebung der EC50 um den Faktor fünf, dass die RAGE exprimierenden WT Zellen mit einer stärkeren Aktivierung der ERK1/2^{MAPK} sowie p38^{MAPK} besonders bei Konzentrationen <10 mg/ml als die RAGE KO Zellen reagierten (Abb. 4.22). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen wurde auch der Transkriptionsfaktor NF-κB stärker und AP-1 ausschließlich bei dieser Zelllinie aktiviert (Abb. 4.23). Diese Daten sprechen dafür, dass der RAGE-Rezeptor der WT Zellen für die im Vergleich zu den RAGE KO Zellen stärkere Aktivierung der Signaltransduktionsmechanismen verantwortlich ist. Analysen der AGE-Rezeptorexpression beider Zelllinien zeigten, dass die RAGE KO Zellen neben dem Fehlen des RAGE-Rezeptors über eine zusätzlich geringere *Srb-1*-, aber vermehrte *Age-r1* und *Age-r3* mRNA Expression verfügten (Abb. 4.5). Dies kann als ein kompensatorischer Mechanismus auf den RAGE knock out gewertet werden, ein Effekt der auch bei dem AGE-R3 knock out von Pugliese *et al.* gefunden wurde (111). Die Unterschiede, die sich hinsichtlich der Aktivierung von Signaltransduktionsmolekülen ergeben, sollten jedoch auf die Unterschiede hinsichtlich der RAGE-Expression zurückzuführen sein. Die Induktion von Signaltransduktionsmechanismen wurde nahezu ausschließlich für die AGE-RAGE Interaktion beschrieben. Die anderen AGE-Rezeptoren sind hauptsächlich für den AGE-Abbau/Detoxifikation und nicht für die Vermittlung von Signaltransduktionskaskaden verantwortlich (88, 97, 167-170).

Die BKE-Behandlung induzierte keine Induktion von profibrotischen Genmarkern

Untersuchungen von Fukami *et al.* wiesen an mesangialen Zellen nach AGE-BSA Behandlung eine RAGE vermittelte vermehrte ROS-Produktion nach. Diese resultierte in einer gesteigerten Aktivierung des *angiotensinogen converting enzymes* und einer vermehrten Angiotensin II Bildung, wodurch über eine vermehrte TGF-β Produktion eine erhöhte Fibronectin-, Proteinsynthese und Zellhypertrophie stimuliert wurde. Letztlich wurde dadurch eine Zunahme der mesangialen Matrix und Verbreiterung der glomerulären Basalmembran (Glomerulosklerose) verursacht (171). Eine im Myokard vermehrte Freisetzung des profibrotischen Zytokins TGF-β, wie durch TGF-β Überexpressionsexperimente im Herzen und Stimulationsuntersuchungen an kardialen Fibroblasten gezeigt, steigert ebenfalls die Synthese von EZM-Proteinen wie z.B. von Kollagen I, - III und Fibronectin (172-174).

Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurde der Einfluss des AGE-reichen Brotkrustenextraktes auf fibroserelevante Markergene untersucht. Die BKE/BL-Behandlung der kardialen Fibroblasten bewirkte trotz vermehrter ROS-Produktion (Abb. 4.16) keine gesteigerte mRNA-Expression der *Tgf-β* Isoformen (Tabelle 4.4. & 4.6a). Allerdings ist die alleinige Wirkung von TGF-β zur Induktion einer kardialen Fibrose nicht ausreichend. Es bedarf vielmehr des Zusammenwirkens mit weiteren Wachstumsfaktoren/Zytokinen wie dem *connective tissue growth factor* (CTGF) und Endothelin-1 (END1), deren Expressionen durch TGF-β stimulierbar sind (175). Korrelierend mit der nicht vermehrten *Tgf-β* Expression blieben diese profibrotischen Zytokine wie auch die EZM-

Proteine (Prokollagene, Fibronectin, Fibuline und Laminine) in ihrer Expression bei dieser Behandlung unbeeinflusst (Tabelle 4.4 & 4.6c). Die AGE-reiche BKE-Behandlung erzielte vielmehr längerfristig (64 Std.) eine verminderte Expression besonders der Prokollagene *Colla1* und *Col3a1* sowie des *Fbln5*, ein Effekt der besonders bei den WT Zellen ausgeprägt war (Tabelle 4.6d). Übereinstimmende Ergebnisse wurden von Daoud *et al.* anhand von primären Rattenkardiofibroblasten erzielt. Die zeitabhängige AGE-BSA Stimulation führte ebenso zu keiner vermehrten mRNA-Expression des profibrotischen Zytokins *Tgf- β* und der EZM Proteine (176).

Eine AGE-BSA Behandlung an mesothelialen und epithelialen Zellen führte zudem über eine RAGE-Aktivierung zu einer Transdifferenzierung der Zellen zu Myofibroblasten (177, 178). Dieser Zelltyp ist durch die vermehrte Expression des prokontraktilen *α -smooth muscle actin* (ACTA-2) sowie Tropomyosin 1 (TPM1) gekennzeichnet. Er kann über die stark vermehrte Bildung von EZM-Molekülen im gesunden Gewebe die elektrischen Eigenschaften von Kardiomyozyten stören und zu Arrhythmien beitragen (18, 175, 179-181). Die Brotkrustenextrakt-Behandlung verursachte bei den kardialen Fibroblasten keine veränderte mRNA-Expression der Myofibroblastenmarkergene *Acta-2* und *Tpm-1*, wodurch eine Transformation zu Myofibroblasten ausgeschlossen wurde. Vielmehr bewirkte das Gesamtbrotkrustenextrakt längerfristig und rezeptorunabhängig eine verminderte Expression dieser Gene (Tabelle 4.6e).

Aussagen bezüglich von EZM-Veränderungen können jedoch nicht durch die isolierte Betrachtung von EZM-Proteinen getroffen werden. Hierzu gehört auch die Analyse der MMPs (EZM-Proteine abbauende Enzyme) und TIMPs (Inhibitoren der MMPs), da die EZM des Myokards einem kontinuierlichen Umbau unterliegt (182, 183). Die erhöhte Ablagerung der EZM-Proteine wird zumeist durch eine verminderte MMP-Expression/Aktivität sowie eine vermehrte TIMP-Expression/Aktivität begünstigt. Dieser Mechanismus trägt innerhalb der EZM zu einer Versteifung und Dysfunktion des jeweiligen Organs bei (20, 184, 185). Analysen der mRNA-Expression der *Mmps* sowie deren Inhibitoren der *Timps* ergaben, dass nur *Timp1* eindeutig, aber rezeptorunabhängig durch die BKE/BL-Behandlung vermehrt exprimiert wurde (Tabelle 4.6c). Dies führte jedoch zu keiner Aktivitätsänderung der hauptsächlich im Myokard exprimierten MMP2 (Abb. 4.27). Ob die vermehrte *Timp1* mRNA-Expression langfristig zu einer Ablagerung von EZM-Proteinen beiträgt oder ob dies durch die verminderte mRNA-Expression einiger EZM-Proteine kompensiert wird, kann nur *in vivo* verifiziert werden. Wichtig ist, dass die TIMPs neben der Inhibierung der MMP-Aktivität noch weitere biologische Funktionen induzieren können. In der Literatur ist beschrieben, dass die TIMP-1 zusätzlich über wachstumsfördernde und antiapoptotische Eigenschaften verfügt, die über andere Domänen als die Inhibierung der MMP-Aktivität vermittelt werden (186, 187). Dies könnte z.T. die verbesserte Zellvitalität nach BKE-Behandlung erklären (Abb. 4.11). Zudem untermauert die durchgeführte BKE-Fütterungsstudie die *in vitro* gefundenen Ergebnisse. Die 14tägige Fütterung mit 15% angereicherten BKE führte zu keiner mRNA-Expressionsveränderung von *Tgf- β 1*, *Colla1* und *-3a1*, *Lamb2*, *Fbln5*, *Mmp 9* und *-13*, *Timp 1* und *-3* sowie von *Acta-2* und *Tpm1*. Einzig die *Mmp2* mRNA-Expression wurde moderat aber signifikant vermehrt exprimiert und spricht einer vermehrten Ablagerung von EZM-Proteinen entgegen (Tabelle 4.13). Eine Bestimmung des löslichen vs. unlöslichen Kollagengehalts

der EZM wie von Badenhorst *et al.* beschrieben, wäre eine interessante Möglichkeiten, diese Ergebnisse zu untermauern (21). Ein unveränderter Quotient (lösliche vs. unlösliche Kollagenkonzentration) würde die Analysen unterstützen, dass das AGE-reiche Brotkrustenextrakt keine Fibroseinduktion bewirkt.

Die BKE-Behandlung induziert eine gesteigerte antioxidative zelluläre Kapazität, die vor starken oxidativen Stressschäden schützt

An der durch die Brotkrustenextrakt-Behandlung festgestellten vermehrten ROS-Produktion (Abb. 4.16) kann eine vermehrte Expression prooxidativer Gene beteiligt sein. cDNA-Microarray Analysen führten zu dem Schluss, dass weder die Lipoxygenasen, die Cytochrom-P450 Monooxygenasen, die NO-Synthasen noch die Komponenten der mitochondrialen Atmungskette (162, 188-190) für die moderat vermehrten ROS-Produktion verantwortlich waren, da diese Gene bei BL-Behandlung unverändert exprimiert blieben (Tabelle 4.5). Vielmehr spricht die bei beiden Zelllinien durch die BKE/BL-Behandlung gefundene vermehrte mRNA-Expression der funktionellen Untereinheit der nichtphagozytotischen NAD(P)H-Oxidase *gp91^{phox}* sowie der Xanthindehydrogenase (*Xdh*) für eine Beteiligung dieser Enzymsysteme an der erhöhten Radikalproduktion (Tabelle 4.8c).

Die nichtphagozytische NAD(P)H-Oxidase, die u.a. von Fibroblasten exprimiert wird (185, 191), ist ein aus mehreren Untereinheiten bestehendes Enzym. Durch dieses Enzym werden die Elektronen des NAD(P)H innerhalb der *gp91^{phox}* Untereinheit auf FAD und anschließend auf den Elektronenakzeptor O₂ übertragen, wodurch O₂⁻ gebildet werden (192, 193). Eine Involvierung der NAD(P)H-Oxidase, speziell der *gp91^{phox}* Untereinheit, an der vermehrten ROS-Produktion von Endothelzellen nach CML-Ovalbumin Behandlung wurde auch von Wautier *et al.* durch Einsatz des Flavoenzym-Inhibitors Diphenyleniodonium nachgewiesen (168).

Die Xanthin-Oxidoreduktase, bestehend aus zwei Isoformen, katalysiert die oxidative Umwandlung von Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure. Die Xanthin-Dehydrogenase Form (XDH) verwendet bevorzugt als Oxidationsmittel NAD⁺, wohingegen die Xanthin-Oxidase Form (XO) O₂ nutzt. *In vivo* wird vorzugsweise die XDH Form gebildet, die somit für die intrazelluläre O₂⁻ Bildung verantwortlich ist. Begünstigt wird die O₂⁻ Produktion der XDH durch ihre hohe NADH-Affinität im Vergleich zu den Substraten Hypo-/Xanthin, wodurch mittels zweifacher Einelektronenübertragung von NADH über das FAD auf O₂ Superoxidanionen gebildet werden (194, 195). Die moderat erhöht induzierte ROS-Produktion spricht für eine Wirkung der Radikale als *second messenger* Moleküle und nicht wie bei der KE-Behandlung für eine Erhöhung des intrazellulären oxidativen Potentials. Dies wurde durch eine längerfristige BKE-Behandlung (24 Std.) gezeigt, die rezeptorunabhängig keine Oxidation von Proteinseitenketten verursachte (Abb. 4.17 & 4.39). Zusätzlich veränderte sich das mRNA-Expressionniveaus des *stress induced protein* (*Sip*) - einem Markergen des oxidativen Stresses - nicht (Tabelle 4.5 & 4.8b). Die *Sip* mRNA-Expression wird durch zahlreiche oxidative Stressoren wie z.B. UV-Strahlung, hohe H₂O₂ Konzentrationen, Hitzeschock und Ethanol induziert. Dabei bindet es an die HIPK2 Kinase, welche p53 phosphoryliert und aktiviert. Dadurch werden die Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert, um eine Reparatur von DNA Schäden zu initiieren bzw. bei irreparablen Schäden die

Apoptose zu induzieren (196, 197). Somit tritt entweder ein Wachstumsarrest oder ein vermehrtes Zellsterben auf - Effekte die bei BKE/BL-Behandlung der Fibroblasten nicht gefunden wurden. Korrelierend mit diesen Daten zeigte sich ein tendenziell vermindertes mRNA-Expressionsniveau des Thioredoxin bindenden Proteins (*Txnip*) (Tabelle 4.5). Das TXNIP stellt einen endogenen Inhibitor des Thioredoxin-Oxidoreduktasesystems dar. Reduziertes Thioredoxin wirkt selbst als Antioxidants, dass die Entgiftung von Peroxiden (z.B. H_2O_2) zu H_2O mittels der Thioredoxin Peroxidase bewirkt. Das TXNIP wiederum bindet an die katalytische Seite des Thioredoxins. Dadurch wird zum einen dessen antioxidative Kapazität inhibiert, zum anderen kann das reduzierte Thioredoxin nicht mehr an die *apoptosis signal regulating kinase* binden und deren proapoptotische Effekte inhibieren (198). Folglich kann eine verminderte Expression des *Txnip* Inhibitors mit einem Schutz vor Apoptose assoziiert werden.

Allerdings zeigte sich, dass die Vanin Gene (*Vnn1-,3*) durch die BKE/BL-Behandlung stark vermehrt exprimiert wurden (Tabelle 4.8b). Diese Gene können als ein Marker einer vermehrten intrazellulären ROS-Produktion gewertet werden, die jedoch gleichzeitig antioxidativ schützend wirken können (199). Die Vanine kodieren Pantothenasen, die Pantethin in Pantothenensäure (Vitamin B5) und Cysteamin hydrolysieren (200). Cysteamin wirkt durch seine freien Thiolgruppen als ein starkes Antioxidant und ist eine wichtige Vorstufe für die Bildung von weiteren Antioxidantien wie Hypotaurin und Taurin (201). Entgegen dieser Theorie zeigten Untersuchungen von Martin- sowie Berruyer *et al.*, dass ein ubiquitärer Vanin-1 knockout Mäuse vor oxidativen Stressschäden innerhalb des intestinalen Traktes schützte. Eine Ursache für diese Befunde soll in der verhinderten Bildung des oxidativen Produktes von Cysteamin - dem Cystamin - liegen. Diese niedermolekulare Substanz soll als Glutaminanalog die γ -Glutamylcystein-Synthase (GCS), die für die Bildung des zytosolischen Antioxidants Glutathion (GSH) unverzichtbar ist, hemmen (199, 202). GSH selbst detoxifiziert hauptsächlich Phospholipidperoxide und H_2O_2 durch eine Glutathion-Peroxidase (Gpx) gekoppelte Reaktion zu den korrespondierenden Alkoholen bzw. H_2O (90). Der Effekt des Vanin-1 knock outs wurde jedoch nicht für das Herz untersucht. Zudem zeigte sich, dass die Vanin-1 knock out Mäuse erhöhte Mengen an Vanin-3 produzierten (199), sodass keine Aussage über das Cysteamin/Cystamin-Verhältnis im Herzen vorhersagbar ist. Zudem wurde durch die BL-Behandlung keine transkriptionelle Veränderung der *Gcs* festgestellt (Tabelle 4.5). Letztlich resultierte die BKE/BL-Behandlung rezeptorunabhängig in einer Erhöhung des intrazellulären GSH-Gehaltes (Abb.4.29) und kann mit der Steigerung des intrazellulären reduzierenden Potentials assoziiert werden. Untersuchungen von Cai *et al.* widersprechen diesen Ergebnissen. Die Behandlung von humanen Endothelzellen mit unterschiedlichen AGE-reichen Nahrungsmittel-extrakten führte zu einem vermindertem zellulären GSH-Gehalt (203). Die differenten Ergebnisse können durch die in den jeweiligen Nahrungsmittel-extrakten unterschiedlichen AGE/ALE-Modifikationen erklärt werden. Bei der Studie von Cai *et al.* wurden vorwiegend tierische AGE-Extrakte analysiert, die durch den höheren Fettgehalt der Ausgangsstoffe einen deutlich höheren ALE- und Lipidperoxidationsgehalt als das Brotkrustenextrakt aufweisen sollten (204). Somit könnten besonders ALE-Verbindungen

tierischer Nahrungsmittel zu einer Minderung des GSH-Gehaltes führen, wohingegen AGE-Strukturen des Brotkrustenextraktes die GSH-Konzentration steigern.

Als ein kompensatorischer/gegenregulierender Mechanismus auf die durch BKE induzierte gesteigerte ROS-Produktion kann die vermehrte mRNA-Expression antioxidativer Gene gewertet werden (Tabelle 4.5 & Abb.4.27). Die gebildeten Radikale führen häufig zu einer Aktivierung von redoxsensitiven MAP-Kinasen und Transkriptionsfaktoren wie z.B. NF- κ B (162, 205-207). Interessanterweise enthalten viele antioxidativ wirksame Enzyme wie z.B. die Mn-Sod NF- κ B Bindungsstellen in ihrer Promotorregion, wodurch sie kompensatorisch als zellulärer Schutzmechanismus nach oxidativer Belastung vermehrt exprimiert werden (208). Zu den durch die Brotkrustenextrakt-Behandlung vermehrt exprimierten antioxidativen Genen zählen u.a. die Metallothioneine (*Mt1*, -2), das Ceruloplasmin (*Cp*), die Mangan (*Mn-Sod*) und zum Teil die extrazelluläre Superoxid-Dismutase (*Ec-Sod*) (Tabelle 4.5 & Tabelle 4.8). Die Theorie, dass reaktive Sauerstoffspezies sowie die ERK1/2^{MAPK}- und p38^{MAPK} Kinasen an der durch BKE-Behandlung induzierten vermehrten Expression antioxidativer Gene beteiligt sind, konnte durch die Verwendung des Antioxidants NAC und Inhibitorstudien nachgewiesen werden (Abb. 4.33 bis 4.35). Die Steigerung des intrazellulären antioxidativen Potentials durch NAC-Vorinkubation resultierte bei anschließender BL-Behandlung in einer Verminderung der mRNA-Expression von *gp91^{phox}*, *Vnn-1*, *Vnn-3* und *Mt-2* (Abb. 4.35), so dass die durch Brotkrustenextrakt induzierte ROS-Produktion für die vermehrte Expression dieser Gene notwendig ist. Des Weiteren war besonders die BL-vermittelte Stimulation des ERK1/2^{MAPK} Signalweges im Vergleich zum p38^{MAPK} Signalweg (Abb.4.34) an der Induktion antioxidativer Gene beteiligt, da durch Inhibierung der ERK1/2^{MAPK} Aktivierung eine deutlich verminderte Expression der antioxidativen Gene *Mn-Sod*, *Mt2* und *Vnn3* gefunden wurde (Abb. 4.33). Trotz allem ist davon auszugehen, dass noch weitere Signalmoleküle an der veränderten Genexpression unter Brotkrustenextrakt-Behandlung beteiligt sind, da sich z.B. die *Xdh*-Expression durch keinen der verwendeten Inhibitoren beeinflussen ließ.

Im folgenden Abschnitt soll auf die Funktion/Wirkweise der durch die BKE/BL-Behandlung vermehrt exprimierten antioxidativen Gene genauer eingegangen werden. Die Metallothioneine 1 (MT1) und -2 (MT2) werden ubiquitär bei Säugerzellen und besonders *Mt2* durch die BKE/BL-Behandlung rezeptorunabhängig vermehrt exprimiert (Tabelle 4.8a). Dabei bewirken sie als Übergangsmetallbindende Proteine neben der Zn²⁺-Bindung und der Aufrechterhaltung der Zn²⁺-Homöostase, die Komplexierung weiterer toxischer Übergangsmetallionen (z.B. Cu²⁺-, Cd²⁺-Ionen), wodurch Radikalbildungsreaktionen unterbunden werden. Hinzu kommt ihr starkes antioxidatives Wirkpotential durch den hohen Anteil an Cysteinen, die radikalische Zwischenprodukte „binden“ und entgiften können (209, 210). Eine MT-Überexpression in Fibroblasten bzw. des Herzens konnte sowohl vor Doxorubicin-, tert-Butylhydroperoxide und Ischämie/Reperfusion induzierten oxidativen Stressschäden schützen (211-213). Eine Erklärung für diese Befunde lieferten u.a. Kimura *et al.*, wonach eine gesteigerte *Mt*-Expression zu einer vermehrten Aktivität des für den Pentosphosphatweg notwendigen Transketolase-Enzyms führte und die Konzentration des intrazellulär reduzierend wirkenden NADPHs steigerte (214). Des Weiteren können die MTs die Bindung des Transkriptionsfaktors NF- κ B an antiapoptotische Zielgene durch Abgabe von Zn²⁺

Ionen verstärken und das zelluläre Überleben verbessern (215). Folglich ist bei der durch BKE/BL-Behandlung induzierten vermehrten *Mt2* mRNA-Expression eine Steigerung der antioxidativen zellulären Kapazität zu erwarten.

Ceruloplasmin (*Cp*), eine Multikupferferroxidase, ist neben dem Kupfertransport für die Oxidation des Fe^{2+} zum Fe^{3+} verantwortlich. Durch die Fe^{2+} -Bindung werden zytotoxische Reaktionen wie die Fenton-abhängige und die daraus resultierende Haber Weiss Reaktion verhindert (216). Ein Fehlen dieses Gens bewirkte bei Mäusen und Patienten („Aceruloplasmie“) neurodegenerative Erkrankungen, bedingt durch vermehrte Eisenablagerungen und eine gesteigerte Fenton-abhängige Reaktion in spezifischen Regionen des zentralen Nervensystem (217 - 219). *In vitro* Experimente wiesen zusätzlich eine antioxidative schützende Funktion des CPs nach, da dies durch seinen hohen Anteil an Cysteinresten O_2^- detoxifizieren kann (220). Hieraus wird ersichtlich, dass eine moderat vermehrte CP-Produktion, wie durch die BKE/BL-Behandlung induziert, besonders durch die Verhinderung der Fenton-abhängigen Reaktion, zellschützend wirken kann (221).

Die mRNA- sowie Protein-Expression der Superoxiddismutase Familie, die für die Detoxifizierung der O_2^- verantwortlich sind und sich hauptsächlich durch ihre subzelluläre Lokalisation unterscheiden (222), wurden durch BKE/BL-Behandlung unterschiedlich beeinflusst. Die mitochondriale Mangan-Sod (*Mn-Sod*, *Sod2*) wurde bei beiden Zelllinien stark vermehrt transkribiert, wohingegen die extrazelluläre Sod (*Ec-Sod*, *Sod3*) nur bei den WT Zellen und die zytosolische Kupfer-Zink Sod (*Cu-Zn-Sod*, *Sod1*) kein verändertes mRNA-Expressionsniveau aufwies (Tabelle 4.5 & 4.8a). Diese Befunde wurden auf Proteinebene bestätigt (Abb.4. 28). Die stark vermehrte *Mn-Sod* Expression erwies sich als besonders interessant. Ein kompletter Mn-SOD knockout führte zur Letalität der Nachkommen, wohingegen eine herzspezifische Mn-SOD Überexpression eine deutlich vermehrte Kardioprotektion nach erfolgter Ischämie/Reperfusion bewirkte. Die knock outs der Ec- sowie Cu-Zn SOD hingegen bewirkten vordergründig keine Beeinträchtigung der Nachkommen, wobei die Mäuse bei oxidativen Stresszuständen anfälliger als die Wildtypen waren (222-224). Die myokardiale Ec-SOD Überexpression führte nach Ischämie/Reperfusion im Vergleich zu den Kontrolltieren ebenfalls zu verbesserten Herzleistungsparametern (225), wodurch die gesteigerte Ec-SOD Expression der WT Zellen als antioxidativ wirksam angesehen werden kann. Eine Cu-Zn SOD Überexpression zeigte hingegen kontroverse Ergebnissen in Abhängigkeit des untersuchten Organs. Eine vermehrte Expression im Herzen konnte auch vor Ischämie/Reperfusionsschäden schützen (226), wohingegen aber bei diesen Mäusen deutliche Entwicklungsstörungen des Thymus und des Knochenmarks – ähnlich wie bei Patienten mit Down-Syndrom (227)- gefunden wurden. Ursache hierfür könnte bei einer erhöhten Cu-Zn SOD Aktivität die Bildung von Hydroxylradikalen sein, da unter diesen Bedingungen H_2O_2 als Substrat verwendet werden kann. Diese resultierende gesteigerte Konzentration an Hydroxylradikalen kann die typischen pathophysiologischen Veränderungen des Thymus, des Knochenmarkes und der verminderten Immunabwehr verursachen.

Die BKE/BL-Behandlung führte bei beiden Zelllinien zu einer Erhöhung der intrazellulären antioxidativen Kapazität, die diese Zellen vor starken mit H_2O_2 , KE sowie UV-Strahlung induzierten oxidativen Stressschäden schützte (Tabelle 4.11 & Abb.4.30). Dieser Mechanismus wird auch als Präkonditionierung bezeichnet. Dabei wirkt ein initialer Stress in niedriger Konzentration durch die Aktivierung bzw. vermehrte Expression bestehender zellulärer/antioxidativer Schutzmechanismen gegenüber einer folgenden wesentlich stärkeren toxischen Stresssituation schützend. Stresssituationen können hierbei Hypoxie/Ischämie, endogene Metabolite wie Lipidperoxidationsprodukte, Hitzeschock, UV-Strahlung, physische und psychische Belastung und toxische Verbindungen sein. Oft werden neben der Bezeichnung Präkonditionierung (Murry, 1986) zahlreiche Synonyme wie Autoprotektion (Ugazio, 1972), adaptive Antwort (Samson & Cairns, 1977) und Hormesis (Southam & Erlich, 1943) verwendet, die jene biphasische Dosis-Wirkungskurve beschreiben (228). Ein ähnlicher Präkonditionierungseffekt, der zahlreiche analoge Signaltransduktionsmechanismen zu der BKE/BL-Behandlung der kardialen Fibroblasten ausweist, konnte für den Organismus bei sportlicher Betätigung nachgewiesen werden (229). Durch eine vermehrte körperliche Belastung (Laufband) zeigten Ratten im Skelettmuskel ähnlich wie die BKE/BL-behandelten Fibroblasten eine erhöhte zytosolische ROS-Produktion, die zur NF- κ B Zellkernlokalisierung und somit zu dessen Aktivierung führte. Zusätzlich konnte der Transkriptionsfaktor AP-1 durch die per reaktiven Sauerstoffspezies induzierten MAP-Kinasen (ERK1/2^{MAPK}, p38^{MAPK} und JNK) aktiviert werden (230). Die antioxidativ wirksame Mn-SOD enthält in ihrer Promotorregion für beide Transkriptionsfaktoren Bindungsstellen, wodurch die Expression und Aktivität dieses Gens/Enzyms gesteigert und die Mitochondrien vor potentiellen oxidativen Stressschäden (Hydroxylradikationen) geschützt wurden (229, 231). Die Spezifität dieser redoxsensitiven Mechanismen zeigte sich zudem bei der Analyse der Cu-Zn SOD Expression. Die Promotorregion der Cu-Zn SOD weist keine NF- κ B- und AP-1 Bindungsstelle auf, wodurch sie weder bei der AGE-reichen Brotkrustenextrakt Behandlung der kardialen Fibroblasten (Abb. 4.27 & 4.28) noch bei sportlicher Belastung im Skelettmuskel der Ratten durch redoxsensitive Signaltransduktionskaskaden induziert werden konnte (230). Die Involvierung von ROS und des ERK1/2^{MAPK} Signalweges an der Induktion des durch Brotkrustenextrakt-Behandlung induzierten Präkonditionierungseffektes konnte in dieser Arbeit auch durch den Einsatz des Antioxidants NAC und des Inhibitors U0126 untermauert werden. Die vor der Präkonditionierung mittels NAC induzierte Steigerung der zellulären antioxidativen Kapazität minderte den schützenden Präkonditionierungseffekt bei folgender H_2O_2 induzierten Zellschädigung (Abb.4.37), wie auch die Inhibierung der ERK1/2^{MAPK} bei dem durch KE induzierten Zelltod (Abb.4.36). Zudem wurde durch Baines *et al.* beschrieben, dass die moderat vermehrte Radikalproduktion entscheidend für den zellschützenden Effekt der Präkonditionierung ist, da dieser Effekt durch den Einsatz von Radikal *Scavengern* vermindert wurde (232, 233). Letztlich ließ sich der schützende BKE/BL-vermittelte Präkonditionierungseffekt auf den funktionell aktiven Zelltyp des Herzens - die

Kardiomyozyten übertragen. Die durch Ischämie/Reperfusion induzierten Stressschäden waren in der BKE/BL präkonditionierten Gruppe signifikant geringer als in der Kontrollgruppe (Abb. 4.31). In Übereinstimmung mit diesen an kardialen Fibroblasten ermittelten protektiven Effekten des Brotkrustenextraktes wurden auch von Lindenmeier *et al.* an BKE behandelten Caco-2 Zellen eine Stimulation von zellulären detoxifizierenden Enzymsystemen gefunden (64). Die Glutathion-S-Transferase (GST), die für die Entgiftungsreaktion elektrophiler Verbindungen essentiell ist, wurde in ihrer Aktivität induziert. Zusätzlich wurde die Aktivität des prooxidativen xenobiotischen Phase I Enzyms - die NADPH Cytochrome C-Reduktase (CCR) - sowohl durch BKE-Behandlung (64) als auch durch niedermolekulare AGE/MRP-Verbindungen des Gluten-Glucose Modellsystems („Bäckereiprodukt-Modell“) (149) vermindert. Untersuchungen von Buetler *et al.* belegen zudem, dass geringe Konzentrationen dicarbonyler Verbindungen die Expression von detoxifizierenden xenobiotischen Phase II Enzyme stimulieren können (234).

Analysen hinsichtlich der Rezeptorabhängigkeit des Präkonditionierungseffektes zeigten, dass beide Zelllinien rezeptorunabhängig durch die BKE/BL-Behandlung (10 mg/ml) vor starken oxidativen Stressschäden geschützt werden konnten (Tabelle 4.11). Auffällig war allerdings, dass bei den Untersuchungen der Signaltransduktionsmechanismen die RAGE exprimierenden WT Zellen mit einer im Vergleich zu den RAGE KO Zellen stärkeren Aktivierung der MAP-Kinasen (ERK1/2^{MAPK}, p38^{MAPK} - Abb. 4.21a/b & 4.22), einer höheren Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB (Abb. 4.23) und einer vermehrten Expression des antioxidativen Enzyms der Mn-Sod (Abb. 4. 28) ansprachen. Zusätzlich wurde ausschließlich bei diesem Zelltyp kurzfristig die Aktivität des Transkriptionsfaktor AP-1 (Abb. 4.23) sowie moderat die Ec-Sod Expression (Tabelle 4.8a) induziert. Eine Möglichkeit, dass keine rezeptorabhängigen Unterschiede bei der BKE/BL-Präkonditionierung gefunden wurden, könnte an der verwendeten Konzentration von 10 mg/ml liegen. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde die ≤10 kDa Fraktion des BL-Extraktes verwendet. Die in dieser Fraktion enthaltenen AGE-Modifikationen repräsentieren zudem jene Verbindungen, die im Organismus die Magen-Darm Passage überwinden und als niedermolekulare AGE-Verbindungen über das intestinale Epithel absorbiert werden können (59). *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass die antioxidative Kapazität des Malzextraktes vorwiegend von niedermolekularen AGE/MRP-Verbindungen vermittelt wurde. Dieser Effekt beruht auf der Tatsache, dass in der fortgeschrittenen Phase der Maillard-Reaktion Redukton-Verbindungen (Endiol-Strukturen) gebildet werden, die über ein deutlich höheres antioxidatives Potential verfügen als die in der späten Phase der Maillard-Reaktion gebildeten hochpolymeren Melanoidine (150). Expressionsanalysen pro-/antioxidativer Gene ließen erkennen, dass nur die RAGE exprimierenden WT Zellen mit einer vermehrten Expression prooxidativer Gene (*gp91^{phox}*, *Xdh*) und antioxidativer Gene (*Mn-Sod*, *Mt2*, *Vnn3*) auf die ≤ 10 kDa Fraktionsstimulation reagierten (Abb. 4.40). Korrelierend mit diesen RT-PCR Ergebnissen führten auch die mit dieser Fraktion durchgeführten Präkonditionierungsanalysen nur bei den WT Zellen zu einem Schutz vor dem mit KE bzw. H₂O₂

induzierten Zelltod (Abb. 4.41). Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass die RAGE exprimierenden WT Zellen durch jene niedermolekularen AGE-Modifikationen im Gegensatz zu den RAGE KO Zellen aktiviert wurden und diese AGE-RAGE Interaktion zu einer gesteigerten antioxidativen Kapazität beiträgt. Der Einsatz von höheren Konzentrationen des Brotkrustenextrakts zeigte allerdings, dass dieser schützende Präkonditionierungseffekt auch Rezeptorunabhängig funktioniert und nicht primär von einer RAGE Expression abhängig ist.

Als eine im BKE enthaltene antioxidativ wirksame Substanz wurde das Pronyl-L-Lysin beschrieben. Pronyl-L-Lysin stellte eine AGE-Modifikation dar, die bei der Reaktion aus Acetylformoin (Glucoseabbauprodukt der Maillard-Reaktion) und L-Lysin gebildet wird. Sie enthält als antioxidatives Charakteristikum eine Reduktonstruktur, die für die Steigerung des intrazellulären antioxidativen Potentials verantwortlich sein soll (64). Analysen der Wirkung des Pronyl-L-Lysin modifizierten BSAs an Caco-2 Zellen führten zu einer verminderten CCR-Aktivität (prooxidatives xenobiotisches Phase I Enzym), wohingegen die GST-Aktivität (antioxidatives xenobiotisches Phase II Enzym) gesteigert wurde (64). Vierzehntägige PL-BSA Fütterungsanalysen an Ratten induzierten neben einer vermehrten UDP-GT Aktivität (UDP-Glucuronyltransferase) der Leber, einen verminderten TBARS-Gehalt (*thiobarbiturate reactive substances*, Marker von Lipidperoxidationen und des oxidativen Stresszustandes) und folglich eine erhöhte antioxidative Kapazität des Plasmas (155). Die an den WT Zellen mit PL-BSA durchgeführten Untersuchungen führten allerdings zu dem Schluss, dass dieses modifizierte Glykierungsendprodukt keine vermehrte antioxidative Kapazität und zellschützende Wirkung bei Fibroblasten vermittelte. Zelltodanalysen zeigten, dass PL-BSA ab 50 nM zytotoxisch wirkte (Abb. 4.42) und weder die mRNA-Expression von pro- noch antioxidativen Genen induzierte. Vielmehr führten Konzentrationen von 400 nM zu einer verminderten mRNA-Expression der *Xdh*, des *Cp* und der *Ec-Sod* (Tabelle 4.12), ein Effekt, der mit der Zytotoxizität des modifizierten PL-BSA assoziiert werden kann (Abb.4.42). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen wurde auch bei den mit PL-BSA durchgeführten Präkonditionierungsexperimenten kein Schutz vor H₂O₂ sowie KE induzierten zellulären Stressschäden bewirkt (Abb. 4.43).

Das BKE bewirkt in vivo ebenfalls eine vermehrte Expression antioxidativer Gene

Durch 14 tägige BKE-Fütterungsstudien und die anschließende AGE-Fluoreszenzmessung des Serums der Mäuse wurde in Übereinstimmung mit den von Koschinsky *et al.* durchgeführten Ernährungsstudien (59) nachgewiesen, dass durch diese Fütterung hauptsächlich fluoreszierende AGE-Verbindungen im Organismus aufgenommen wurden (Abb. 4.44). Aus der Gruppe der nichtfluoreszierenden AGE-Modifikationen wurde zudem ein durch die Fütterung tendenziell erhöhter CML-Gehalt des Serums festgestellt (Abb. 4.44B). Diese Daten unterstützen die Auffassung, dass AGE-Verbindungen über das Darmepithel die Blutzirkulation und somit verschiedene Organsysteme erreichen, wodurch deren Funktionalität beeinflusst werden kann (57, 98, 167, 235). Durch Chuyen *et al.* konnte nach Fütterung AGE-reicher Nahrung z.B. das Amadori-Produkt Fructoselysin nach 2 Std. in der hepatischen Pfortader und Oberschenkelvene nachge-

wiesen werden (154). Die durch die BKE-Fütterung aufgenommenen AGE-Modifikationen führten im Myokard neben einer vermehrten mRNA-Expression der NADPH-Oxidase Untereinheit *gp91^{phox}* (prooxidatives Gen) zu einer erhöhten Expression zahlreicher antioxidativer Gene wie der *Mn-*, *Ec-Sod* und *Cp*, wobei auch *Mt2* sowie *Vnn-1* tendenziell vermehrt exprimiert wurden (Abb.4.45). Zudem ließ sich eine gesteigerte Mn- und Ec-SOD Proteinexpression nachweisen (Abb. 4.46). Folglich konnte ein Teil der in Zellkulturexperimenten gefundenen RT-PCR Ergebnisse auf die *in vivo* Situation im tierischen Organismus übertragen werden. Die erstmalige Analyse des Einflusses des AGE-reichen BKE auf die Expression von antioxidativen Genen im Herz macht eine Erhöhung des antioxidativen Potentials im Myokard nach dieser AGE-reichen Fütterung wahrscheinlich. Dies könnte letztlich einen potentiellen Schutz vor anderen oxidativen Stresssituationen bieten, zumal die Fütterung in keiner vermehrten AGE-Ablagerung im Myokard resultierte (Abb.4.47). Ähnliche Endergebnisse zeigten die von Somoza *et al.* an Ratten durchgeführte Untersuchungen, wobei der Einfluss einer 14 tägigen 5% BKE-Fütterung an den Organsystemen der Leber, Niere und des Plasmas analysiert wurde. Hierbei kam es zu einer vermehrten hepatischen UDP-GT und renalen GST-Aktivität, wodurch elektrophile Verbindungen entgiftet werden können und ein Angriff auf zelluläre Verbindungen verhindert wird. Zusätzlich ließ sich durch diese Fütterung eine gesteigerte antioxidative Kapazität sowie eine Verminderung des TBARS-Gehalts des Plasmas nachweisen (155). Die Fütterung von glykierten Casein bzw. glykierten Sojaprotein führte bei gesunden Wistar Ratten ebenfalls zu einer Abnahme des TBARS-Gehalts der Leber (154, 236). Aus diesen Ergebnissen konnte abgeleitet werden, dass über die AGE-reiche Nahrung antioxidativ wirksame Komponenten im Organismus resorbiert wurden (154). Die damit gefundene *in vivo* Wirkung des BKE fügt sich in das Bild der kontroversen Wirkweise (antioxidativ versus prooxidativ) von Nahrungsmittel-AGEs/MRPs ein. Die unterschiedlichen Ergebnisse von Fütterungsstudien (siehe Abschnitt 5.3) können zum einen auf den unterschiedlichen Bedingungen (unterschiedliche AGE/ALE-Modifikationen- und Konzentrationen) beruhen. Zum anderen erscheint es wichtig, ob die Analyse der Wirkung AGE-reicher Ernährung an gesunden oder erkrankten (diabetische, nephropathische) „Probanden“ durchgeführt wurde. AGE-Ernährungsstudien zeigten, dass bei gesunden Probanden Serum-AGE sowie Urin-AGE Werte nur kurzfristig über den Ausgangswert anstiegen. Die Modifikationen wirkten somit nur temporär, da sie durch renale Exkretion schnell wieder ausgeschieden wurden. Problematischer erwies sich die Aufnahme der AGE-reichen Nahrung bei Diabetikern mit eingeschränkter Nierenfunktion. In Abhängigkeit mit der Stärke der Erkrankung hielten die hohen Serum-AGE und Urin-AGE Werte deutlich länger an, da diese Personen nur unzureichend in der Lage waren, die verschiedenen absorbierten AGE-Verbindungen renal auszuscheiden (59). Folglich wirkten bei gesunden „Probanden“ die AGE-Verbindungen in geringeren Konzentrationen und über einen kürzeren Wirkzeitraum als bei Erkrankten. Die Anreicherung dieser AGE-Modifikationen (Glykotoxine) bei Diabetikern oder nierenkranken Personen kann z.B. über eine RAGE-Rezeptoraktivierung über eine vermehrte ROS-Produktion z.B. proinflammatorischer Genen und pathophysiologische Reaktionen induzieren (98, 237). Des Weiteren funktionieren

kompensatorische Mechanismen (renale Exkretion, Detoxifizierungsmechanismen), die vor Glykotoxinen schützen könnten nicht mehr effizient genug (57). Somit könnten die enthaltenen AGE/MRP-Modifikationen je nach Gesundheitsstatus anti-oxidativ durch präkonditionierende Mechanismen zu Gunsten der gesunden Probanden bzw. prooxidativ zum Nachteil der erkrankten „Probanden“ wirken. Abb. 5.3.1 stellt eine Zusammenfassung der möglichen durch das Brotkrustenextrakt induzierten zellulären Reaktionen dar.

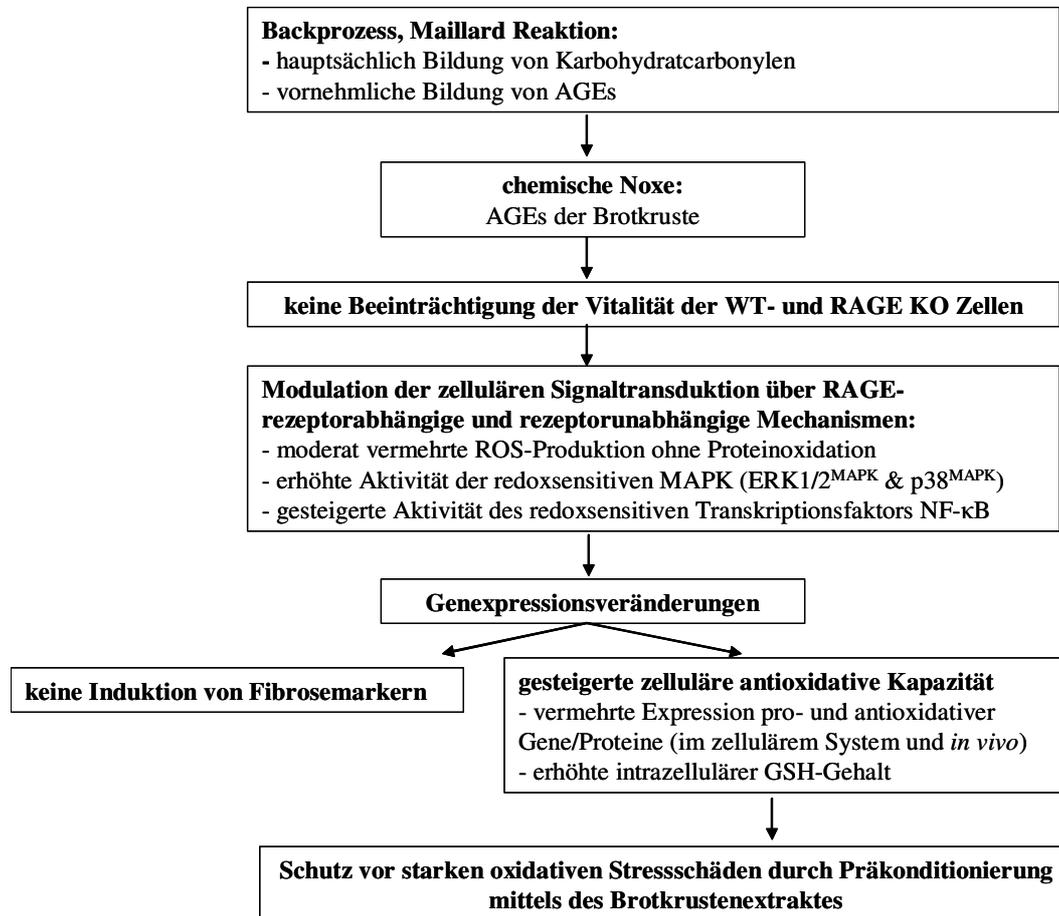


Abb.5.3.1: Darstellung der zellulären Wirkung des AGE-reichen BKE

5.3.2 Analyse der Wirkung des KE auf die Funktion der kardialen Fibroblastenzelllinien

Die bis jetzt durchgeführten Untersuchungen hinsichtlich der Wirkung des KE beruhen zum überwiegenden Teil auf der Verwendung von koffeinhaltigen Kaffee, wobei Koffein singularär zahlreiche zelluläre Effekte über die Aktivierung des zentralen Nervensystems und einer Erhöhung des intrazellulären cAMP Spiegels induzieren kann (238). Daneben sind im KE noch weitere Substanzen wie z.B. phenolische Verbindungen - hauptsächlich die Chlorogensäuren - enthalten, denen ein antioxidatives Wirkpotential zugeschrieben wird (239). Während des Röstprozesses der Kaffeebohnen werden jedoch zahlreiche nichtenzymatische Glykierungs-/Maillard-Reaktionsprodukte gebildet, wohingegen der Gehalt an phenolischen Verbindungen durch thermische Degradationsprozesse sinkt (145). Es wird angenommen, dass diese phenolischen Verbindungen an der Maillard-Reaktion teilnehmen und die Bildung von Kaffee-Melanoidinen fördern (240). Untersuchungen von Belitz *et al.* hinsichtlich des AGE/MRP-Gehaltes des Kaffee-

pulvers ergaben einen Anteil von ~ 25% (241, 242). Die beschriebene antioxidative Wirkung des KE erfolgte allerdings vorwiegend in zellfreien *in vitro* Experimenten (240, 243, 244). Dabei wurde zumeist die antiradikalische Kapazität des KE mittels DMPD^+ (N,N-Dimethyl-P-Phenylendiamin) bzw. $\text{ABTS}^+(2,2'$ Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)) durch Absorptionsmessung bestimmt und eine antioxidative Kapazität des KE abgeleitet, die mit dem Gehalt an MRPs assoziiert wird (145).

Das KE induziert AGE-rezeptorunabhängig eine starke zelluläre Radikalproduktion

Zelluläre Untersuchungen mittels eines entkoffeinierten AGE-reichen KE sind bis jetzt selten durchgeführt wurden. So sollte in dieser Arbeit versucht werden, eventuelle AGE-abhängige zelluläre Wirkungen von Kaffee zu identifizieren. Eine Behandlung der RAGE exprimierenden WT Zellen mit dem entkoffeinierten AGE-reichen KE führte zu einer schnellen, hohen und anhaltenden Radikalproduktion (Abb. 4.16), die bei beiden Zelllinien unabhängig von der RAGE Rezeptorexpression längerfristig (24 Std.) zu einer Oxidation von zellulären Proteinen führte (Abb. 4.17). Untersuchungen von Goya *et al.* widersprechen diesen Befunden. Das dort verwendete geröstete KE führte bei der Behandlung von HepG2 Zellen zu keiner vermehrten ROS-Produktion, sondern wirkte sogar antioxidativ (245). Allerdings wurde bei diesen Untersuchungen ein anderes KE aus den Kaffeesorten *Coffea arabica* (80 %) und *Coffea robusta* (20%) eingesetzt, von dem nur die hochmolekulare Fraktion nach zusätzlichen Verdau mit gastrointestinalen Enzymen verwendet wurde. Das in dieser Dissertation eingesetzte KE bestand hingegen unbehandelt zu 100 % aus der Sorte *Coffea arabica*, was den direkten Vergleich der Ergebnisse letztlich unmöglich macht.

AGE-Modifikationen können über eine Rezeptorinteraktion eine vermehrte ROS-Produktion induzieren - ein Effekt der hauptsächlich für den RAGE-Rezeptor beschrieben wurde (49, 171, 246, 247). Da allerdings der durch KE-Behandlung induzierte Gehalt an Proteinoxidation zwischen beiden Zelllinien quantitativ keinen Unterschied zeigte, verlief die vermehrte Radikalproduktion bei den kardialen Fibroblasten RAGE unabhängig. Eine mögliche Erklärung hierfür geben zahlreiche Untersuchungen, die belegen, dass AGE-Modifikationen ohne zelluläre Systeme selbstständig befähigt sind, Radikale zu bilden (87, 140, 157-159). *In vitro* ESR Experimente bewiesen, dass die Schiff'sche Base Produkte der Methylglyoxal-BSA Reaktion ein Elektron an ein freies Methylglyoxal-Molekül abgeben können, wodurch ein Schiff'sche Base Radikalkation und ein Methylglyoxal-Radikal entstehen. Das Methylglyoxal-Radikal regeneriert sich durch die Reaktion mit O_2 . Hierdurch entsteht ein Superoxidanion ($\text{O}_2^{\cdot-}$), welches weiter zu H_2O_2 dismutieren kann. Das relativ stabile Schiff'sche Base Radikalkation kann z. B. die Oxidation von Ascorbat in Anwesenheit von O_2 induzieren, wodurch wiederum ein $\text{O}_2^{\cdot-}$ und ein Semihydroascorbyl-Radikal entstehen (87). Durch Hofmann *et al.* wurde weiterhin nachgewiesen, dass bei der Bildung von braunen Maillard-Produkten aus dem Zuckerabbauprodukt Glycolaldehyd und den reaktiven Aminogruppen von Aminosäuren radikalische Zwischenprodukte entstehen (140). Analysen von Muscat *et al.* wiesen außerdem darauf hin, dass nur geröstetes KE (~90 μM) sowie das Modell AGE Ribose-Lysin (290 μM) im zellfreien System H_2O_2 produziert. Diese Befunde konnten nicht bei der Verwendung von ungerösteten KE bzw. einer nicht erhitzten Ribose-Lysin Lösung gefunden werden. Aus diesen Ergebnissen wird die Beteiligung der Maillard-Reaktion und deren

AGE/MR-Produkten an der ROS-Produktion ersichtlich (31, 242). Zusätzlich wurde anhand von Ernährungsstudien gezeigt, dass frisch gebrühter Kaffee die H₂O₂-Bildung induzierte (248). Probanden, die Kaffee getrunken hatten, wiesen im Urin 3 bis 10 fach erhöhte H₂O₂-Konzentrationen als vor dem Kaffeekonsum auf (249, 250). Aus diesen Daten kann geschlussfolgert werden, dass aktive Kaffeekomponenten *in vivo* die H₂O₂-Bildung induzieren und folglich den Organismus mit einer erhöhten Konzentration dieser oxidativen Verbindung „belasten/beeinflussen“ (242). Diese in dieser Arbeit durchgeführten Experimente untermauern die Hypothese, dass das KE AGE-rezeptorunabhängig zur ROS-Produktion befähigt ist.

Die durch das KE verursachte ROS-Produktion führt zu keiner adaptiven Zellanwort, sondern zu einer Erhöhung des zellulären oxidativen Potentials

Die durch die Maillard-Reaktion bzw. die gebildeten AGEs entstehenden Superoxidanionen dismutieren leicht zu H₂O₂, eine nichtradikalische Verbindung, die problemlos die Zellmembran passieren kann (160). In den letzten Jahren wurde eindeutig bewiesen, dass eine moderat vermehrte intrazelluläre ROS-Konzentration als *second messenger* fungiert und verschiedene redoxsensitive Signaltransduktionskaskaden wie z.B. die stress assoziierten MAP-Kinasen p38^{MAPK} und JNK induziert (161). Bei der Untersuchung der durch KE induzierten Signaltransduktionskaskaden wurde unabhängig der RAGE-Rezeptorexpression eine besonders schnelle und stark vermehrte Phosphorylierung der p38^{MAPK} (5 min) gefunden (Abb. 4.20). Diese kann als eine Reaktion der Zellen auf die vermehrte intrazelluläre Radikalkonzentration gewertet werden (251). Eine vermehrte p38^{MAPK} Phosphorylierung nach KE-Behandlung wurde auch bei RAGE exprimierenden HEK-293 Zellen von Zill *et al.* nachgewiesen. Allerdings wurde hierbei eine tendenzielle RAGE-Abhängigkeit dieses Effekts diskutiert (164, 165). Eine moderat vermehrte Aktivierung der ERK1/2^{MAPK} konnte nach fünfminütiger KE-Stimulation rezeptorunabhängig nachgewiesen werden (Abb. 4.20). Dies stimmt mit Untersuchungen von Zill *et al.* an HEK-293 Zellen überein, wobei durch Einsatz eines blockierenden anti-RAGE Antikörper ebenfalls keine Involvierung dieses Rezeptors an der vermehrten ERK1/2^{MAPK} Aktivität nachgewiesen wurde (165). Trotz Unterschieden hinsichtlich der konzentrationsabhängigen Aktivierung/Inhibierung der ERK1/2^{MAPK} und der AKT Kinase (Abb. 4.20) zwischen beiden Zelllinien führte letztlich die KE-Behandlung zu keiner unterschiedlichen Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-κB und AP-1. Rezeptorunabhängig wurde NF-κB moderat vermehrt aktiviert, wohingegen sich keine Veränderung der AP-1 Aktivität zeigte (Abb. 4.23). Ein übereinstimmendes Ergebnis konnte bei der KE-Behandlung von HEK-293 Zellen durch Muscat *et al.* gefunden werden. Das geröstete KE induzierte dabei RAGE-unabhängig über eine ROS-abhängige Signaltransduktion den Transkriptionsfaktor NF-κB in HEK Zellen (242). Ein entsprechender Signalweg ist daher bei der KE-abhängigen Stimulation der kardialen Fibroblasten wahrscheinlich.

Allerdings führte der durch das KE induzierte starke oxidative Stress zu keiner veränderten Expression pro-/antioxidativer Gene, wie dies bei dem AGE-reichen Brotkrustenextrakt gefunden wurde (Tabelle 4.9). Vielmehr resultierte die starke Radikalproduktion in einer RAGE unabhängigen Verminderung des intrazellulären GSH-Gehaltes (Abb. 4.29). Ursächlich dafür könnte der deutlich höhere Lipidanteil (~15 %) sein, der in den ungerösteten Kaffeebohnen der

Sorte *Coffea arabica* im Vergleich zum hauptsächlich Stärke enthaltenden Roggen- und Weizenmehl (BKE) enthalten ist (134). Die während des Röstprozesses (hohe Temperaturen, Autoxidationsprozesse bewirkend) und der dabei ablaufenden Maillard-Reaktion entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies können die Bildung von Lipidperoxidationsprodukten und reaktiven „Lipidcarbonylen“ wie Malondialdehyd (MDA), Glyoxal und 4-Hydroxy-2-nonenal (HNE) aus ungesättigten Fettsäuren induzieren (252). Diese können anstelle von reduzierenden Zuckern als elektrophiler Reaktionspartner mit den reaktiven Aminogruppen von Proteinen reagieren und ALEs bilden (253, 254). CML repräsentiert z.B. eine AGE/ALE-Verbindung, die sowohl aus reaktiven Carbonylen von Carbohydraten als auch Lipiden entstehen kann (137) und in hohen Konzentrationen in diesem KE vorliegt (Abb. 4.9). Es ist somit anzunehmen, dass durch den Röstprozess der Kaffeebohnen und die dabei stattfindende Maillard-Reaktion sowohl Radikale, Lipidperoxidationsprodukte und zahlreiche AGE/ALE-Verbindungen (Abb.4.9) entstanden und in der hergestellten KE-Lösung parallel existent waren. Diese Verbindungen könnten letztlich rezeptorunabhängig den starken intrazellulären Radikalanstieg nach KE-Behandlung der Zellen induzieren, wobei die radikalischen Verbindungen zum H_2O_2 dismutieren und wie die hydrophoben Lipidperoxidationsprodukte über die Zellmembran aufgenommen werden (255). Intrazellulär können dadurch zum einem weitere Radikale gebildet werden. Zum anderen ist bekannt, dass H_2O_2 , MDA und HNE mit der zytosolischen antioxidativen Verbindung Glutathion (GSH) reagieren und somit die intrazelluläre reduzierende Kapazität vermindern kann (255). Im Anschluss an diese Dissertation durchgeführte 14 tägige Fütterungsversuche mit 15 % angereichten KE vs. Kontrollfutter an WT- sowie RAGE KO Mäusen zeigten ebenfalls RAGE-unabhängig keinerlei mRNA-/Proteinexpressionsveränderungen hinsichtlich der analog zu den Zellkulturexperimenten analysierten pro-/antioxidativen Genen/Proteinen. Einzig führte die Fütterung des KE zu einer tendenziell vermehrten Oxidation von Proteinen im Myokard (Diplom Trophologin Beatrice Leuner). Diese Ergebnisse stimmen mit den durch Zellkulturexperimente ermittelten Resultaten überein. Hierbei wird weiterhin deutlich, dass aktive Komponenten des Kaffeeextraktes zur Induktion von oxidativen Stress/Stressschäden führen können, ohne die Expression pro-/antioxidativer Gene zu beeinflussen. Eine Minderung des reduzierenden zellulären Potentials (Minderung der GSH-Konzentration Abb. 4.29) kann neben Proteinmodifikationen (vermehrte Proteinoxidation - Oxyblot Analyse Abb. 4.17) durch die Steigerung des intrazellulären oxidativen Potentials zur Oxidation von Aminosäuren im aktiven Zentrum (Cystein, Serin, Threonin u.v.a.) von Enzymen führen, wodurch deren enzymatische Aktivität vermindert wird. Deutlich wurde Letzteres z.B. bei der Untersuchung des KE-Einflusses auf die Induktion von mit Fibrose assoziierten Genen. Die AGE-Behandlung verschiedener Zelllinien (NRK-49F Zellen, glomeruläre Endothelzellen, dermale Fibroblasten, mesangiale Zellen) führte zu einer erhöhten mRNA-Expression des Wachstumsfaktors *Tgf- β* , der eine vermehrte Expression zahlreicher EZM-Proteine (Kollagene, Fibronectin) induzierte (171, 256-259). Eine durch das KE induzierte vermehrte mRNA-Expression von *Tgf- β* , von EZM-Proteinen sowie Myofibroblastenmarkern konnte hier nicht gefunden werden (Tabelle 4.7a/c). Einzig wurde durch das AGE-reiche KE die mRNA-Expression der *Mmp9* bereits durch 10 μ g/ml KE (Tabelle 4.7b) sowie die MMP2-Aktivität ab

100 µg/ml vermindert (Abb. 4.26). MMPs werden als inaktive Zymogene synthetisiert, wobei die katalytische Zn²⁺-Domäne durch eine Prodomäne über Cysteinreste im inaktiven Zustand gehalten wird. Eine leichte Erhöhung des intrazellulären oxidativen Stresses kann zu einer Oxidation der Cysteinreste der Prodomäne führen und die aktive Domäne dieser zinkabhängigen Endopeptidasen für das entsprechende Substrat zugänglich machen (260, 261). Starker intrazellulärer oxidativer Stress jedoch, der z.B. mit hypochloriger Säure stimuliert werden kann bzw. bei der KE-Behandlung der Zellen auftritt, vermindert die enzymatische Aktivität der MMPs. Dabei können bestimmte im aktiven Zentrum befindliche Aminosäuren wie z.B. Methionin und Tryptophan oxidiert bzw. kovalent modifiziert werden, wobei durch die auftretenden Konformationsänderungen im katalytischen Zentrum der MMPs deren Aktivität vermindert wird (262-264). Ob diese durch KE induzierte Minderung der MMP-Expression und Aktivität zu einer fibrotischen Veränderung führt, muss durch weiterführende Untersuchungen genauer analysiert werden. Eine Bestimmung des löslichen vs. unlöslichen Kollagengehaltes des Myokards nach KE-haltigen Fütterungsstudien, sollte in Zukunft Aussagen zulassen, ob das AGE-reiche KE zu einer Zunahme der Quervernetzungen des kardialen Kollagens (unlösliche Anteil) und somit zu einer Versteifung beiträgt (21).

Die KE-Behandlung induziert längerfristig den Prozess der zellulären Nekrose

Die Minderung des zellulären reduzierenden Potentials durch die KE-Behandlung der Zellen mit nicht-toxischen Konzentrationen führte zudem zu einer Wachstumsminderung der WT Zellen bzw. Wachstumsarretierung der RAGE KO Zellen (Abb. 4.12). Dieser Effekt korrelierte mit einer Abnahme der Zellen in der proliferativen S-Phase des Zellzyklus (Abb. 4.13). Fortführende Analysen ergaben, dass RAGE-unabhängig durch nicht-toxische KE-Konzentrationen neben einer vermehrten Strukturierung des Zytoplasmas eine Zellvolumenvergrößerung/Zellschwellung auftrat (Abb. 4.14/15). Dieses Erscheinungsbild ist für den Beginn eines onkotischen/nekrotischen Mechanismus typisch (265, 266). Durch das Auftreten dieses Prozesses ist anzunehmen, dass die Zellen über einen längeren Zeitraum (>24 Std.) über den Verlust der Integrität der Zellmembran nekrotisch versterben werden. Die längerfristige KE-Behandlung der Zellen (24 Std.) resultierte bei Konzentrationen ab 1 mg/ml in einer Beeinträchtigung der Zellvitalität (Abb. 4.11C). Dies kann durch die enorme intrazelluläre ROS-Produktion, die bei 1 mg/ml KE-Behandlung gefunden wurde (Abb. 4.16), verursacht werden. Diese starke Radikalproduktion kann das intrazelluläre reduzierende Potential unter die von der Zelle mögliche tolerierbare Schwelle absenken, wodurch sie verstärkt versterben. Auffällig bei diesen Untersuchungen war jedoch, dass die RAGE KO Zellen empfindlicher d.h. mit einer höheren Zelltodinduktion bei 1 mg/ml KE als die WT Zellen reagierten (Abb. 4.11C). Eine Ursache hierfür kann die bei der Herstellung der RAGE KO Mäuse /Zellen resultierende veränderte AGE-Rezeptorexpression darstellen (Abb. 4.5). Neben dem Fehlen des RAGE Rezeptors verfügen die RAGE KO Zellen über eine erhöhte *Age-r1* und *Agr-r3* Rezeptorexpression (Abb.4.5). Somit kann vermutet werden, dass der RAGE-Rezeptor toxische AGE/ALE-Modifikationen bindet und dadurch die toxischen Effekte des KE, die auf die WT Zellen im Vergleich zu den RAGE KO Zellen einwirken, mindert - allerdings nicht komplett beseitigt. Untersuchungen von Valencia *et al.* zeigten zudem, dass verschiedenste AGE-

Modifikationen trotz starker RAGE-Bindung nicht zwangsläufig zu einer Induktion zellulärer Signaltransduktionskaskaden führen müssen, wodurch die Theorie untermauert wird, dass dieser Rezeptor auch toxische AGEs ohne Induktion proinflammatorischer Prozesse binden kann (267). Eventuell reagieren die RAGE KO Zellen durch das Fehlen des RAGE Rezeptors empfindlicher. Zudem könnte die erhöhte Expression der *Clearence*-Rezeptoren AGE-R1 und -R3 eine höhere Konzentration von toxischen AGE/ALE-Modifikationen in die RAGE KO Zellen einschleusen und eine stärkere Belastung dieses Zelltyps mit ROS produzierenden AGE-Modifikationen induzieren. Abb. 5.3.2 stellt eine Zusammenfassung der möglichen durch KE induzierten zellulären Reaktionen dar.

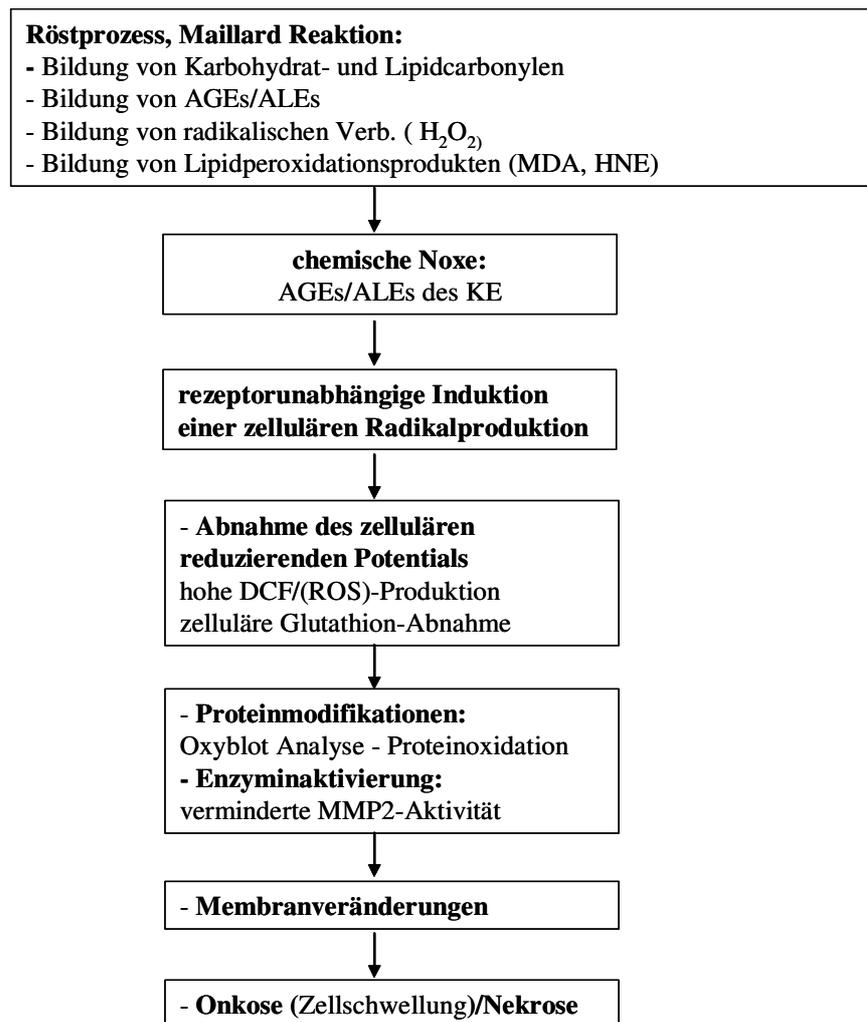


Abb. 5.3.2: Darstellung der zellulären Wirkung des AGE/ALE-reichen KE

5.3.3 Vergleich der zellulären Wirkung des KE versus des BKE

Vergleichend konnte festgestellt werden, dass beide analysierten AGE-reichen Nahrungsmittlextrakte, bedingt durch den differenten Gehalt an AGE/ALE-Modifikationen, zu unterschiedlichen zellulären Reaktionen führten. Eine Übersicht hinsichtlich der unterschiedlichen Wirkung beider AGE-reicher Extrakte wurde in Tabelle 5.3.3 dargestellt.

| | zelluläre Wirkung des BKE | zelluläre Wirkung des KE |
|---------------------------------|---|--|
| Zellvitalität | - keine Beeinträchtigung der Proliferation - keine zytotoxische Wirkung - keine nekrotische Wirkweise | - Proliferationsinhibierung - starke zytotoxische Wirkung - Induktion einer zellulären Nekrose |
| Signal- transduktion | - moderat vermehrte ROS-Produktion --> Wirkung als <i>second messenger</i> Moleküle: a) Aktivierung von redoxsensitiven Signalmolekülen (ERK1/2 ^{MAPK} , p38 ^{MAPK} , NF-κB, z.T. AP-1) b) keine Oxidation zellulärer Proteine | - starke ROS-Produktion --> zellschädigende Radikalwirkung a) hauptsächlich Aktivierung der stressassoziierten p38 ^{MAPK} b) Oxidation zellulärer Proteine |
| zelluläre Reaktionen | - Steigerung der zellulären antioxidativen Kapazität als adaptive Zellantwort auf die erhöhte ROS-Produktion durch: 1. vermehrte Expression zahlreicher antioxidativer Gene 2. Erhöhung des intrazellulären GSH-Gehalts → protektive Extraktwirkung: Schutz vor oxidativen Stressschäden (BKE-vermittelte Präkonditionierung) | - keine Induktion einer adaptiven Zellantwort auf die gesteigerte Radikalproduktion: 1. unveränderte Expression antioxidativer Gene 2. Verminderung des GSH-Gehalts → Wirkung als zytotoxisches Extrakt |
| in vivo Wirkung | - gesteigerte myokardiale Expression antioxidativer Gene - keine myokardialen AGE-Ablagerung | - unveränderte Expression antioxidativer Gene im Myokard - tendenziell vermehrte myokardiale Proteinoxidation (Daten: Diplom Throphologin Beatrice Leuner) |
| Fibrose | - keine Induktion profibrotischer Markergene | |
| RAGE- Involvierung | - Vermittlung der protektiven BKE-Wirkung durch RAGE-abhängige wie RAGE-unabhängige Mechanismen | - keine vordergründige Involvierung des Rezeptors an den KE induzierten Effekten |

Tabelle 5.3.3 Darstellung der unterschiedlichen zellulären Wirkungen des BKE sowie KE.

Folglich induzierte die KE-Behandlung vornehmlich zytotoxische Effekte, wohingegen das Brotkrustenextrakt eine protektive Wirkung durch die Steigerung der antioxidativen Kapazität induzierte. Die Isolation der antioxidativen Wirkkomponente/n dieses Extraktes sowie die Untersuchung, ob auch durch eine BKE-reiche Fütterung *in vivo* vor oxidativen Stressschäden (z.B. Ischämie/Reperfusion) geschützt werden kann, sind interessante weiterführende Aufgaben, die sich an diese Arbeit anschließen könnten.

6 Zusammenfassung

Advanced glycation endproducts (AGEs) werden einerseits im Organismus (endogene AGE-Bildung) sowie andererseits in Nahrungsmitteln (exogene AGE-Bildung) durch die nicht-enzymatische Reaktion zwischen reduzierenden Zuckern/ α -dicarbonylischen Verbindungen und reaktiven Aminogruppen von Proteinen/Lipiden gebildet. Eine *in vivo* vermehrte AGE-Bildung kann durch eine verminderte Proteindegradation, beeinträchtigte Protein-/Enzymfunktionalität und AGE-RAGE Interaktion veränderte Signaltransduktion z.B. zu kardiovaskulären Erkrankungen beitragen. Obwohl exogene Nahrungsmittel-AGEs täglich in hohen Mengen konsumiert werden, ist wenig über ihre patho-/physiologischen Mechanismen, insbesondere über ihre Wirkung auf das kardiale System, bekannt. Ziel dieser Arbeit war es zum einen den Einfluss von zwei AGE-reichen Nahrungsmittlextrakten, dem Brotkrusten (BKE)- und Kaffeeextrakt (KE), auf die Funktion kardialer Fibroblasten sowie zum anderen die Abhängigkeit der Effekte vom RAGE-Rezeptor zu untersuchen. Für die Analyse dieser Fragestellungen wurden zwei murine kardiale Fibroblastenzelllinien - die RAGE exprimierende WT- und die RAGE KO Zelllinie (Fehlen des Rezeptors) als Zellkulturmodell etabliert.

Beide Extrakte wiesen AGE-Modifikaktionen - z.T. mit verschiedenen Konzentrationen - auf, die letztlich unterschiedliche zelluläre Wirkungen induzierten. Das KE bewirkte eine schnelle, hohe und anhaltende AGE-rezeptorunabhängige intrazelluläre ROS-Produktion, die in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration zu starken zellulären Schädigungen führte. Kennzeichen hierfür waren die Verminderung des intrazellulären GSH-Gehalts und eine damit zusammenhängende stark vermehrte Oxidation von zellulären Proteinen. Moderate KE-Konzentrationen induzierten, trotz des hohen induzierten oxidativen Stresses, keine vermehrte Expression antioxidativer Gene, wodurch eine adaptive Zellantwort auszuschließen war. Vielmehr wurde eine Wachstums-minderung und Zellvolumenvergrößerung induziert, die für eine beginnende Nekrose spricht und bei hohen KE-Konzentrationen bereits nach 24 Std. sichtbar auftrat.

Im Gegensatz zum KE wirkten die BKE-Fractionen weder zytotoxisch noch proliferationsinhibierend. Die BKE-Behandlung resultierte in einer moderat vermehrten intrazellulären ROS-Produktion, die keine Oxidation von zellulären Proteinen bewirkte. Vielmehr kam es zur adaptiven Stimulation von redoxsensitiven Signalmolekülen (ERK1/2^{MAPK}, p38^{MAPK} und NF- κ B), der vermehrten Expression zahlreicher antioxidativer Gene und der Steigerung des intrazellulären GSH-Gehalts. Diese induzierte Erhöhung des antioxidativen Potentials schützte die Zellen bei vorheriger BKE/BL-vermittelter Präkonditionierung vor starken oxidativen Stressschäden. Durch NAC-/Inhibitorstudien wurde eine unterschiedlich starke Involvierung der ROS, der ERK1/2^{MAPK} und der p38^{MAPK} an der Ausbildung der vermehrten antioxidativen Kapazität und der Präkonditionierung bestätigt. Die in der Literatur durch AGE-Behandlung beschriebene Induktion profibrotischer Gene oder eine damit zusammenhängende Differenzierung zu Myofibroblasten wurde weder bei der KE- noch BKE-Behandlung der Zellen gefunden.

Im Gegensatz zum KE wurde jene durch BKE vermittelte antioxidative Wirkung durch RAGE-abhängige wie auch AGE-rezeptorunabhängige Mechanismen vermittelt. Die durch BKE-Behandlung induzierte vermehrte antioxidative Kapazität, die vor starken oxidativen Stressschäden

schütze, zeigten beide Zelllinien. Allerdings war die EC50 der MAP-Kinasen Induktion bei der RAGE exprimierende WT- im Vergleich zu den RAGE KO Zellen um das Fünffache erhöht und weitere redoxsensitive Transkriptionsfaktoren (NF- κ B, AP-1) und antioxidativ wirkende Enzyme (Mn-, Ec-Sod) wurden bei den WT Zellen wesentlich stärker induziert. Deutlich wurde die RAGE Involvierung bei der Verwendung der ≤ 10 kDa Fraktion des BL-Extraktes, da nur die WT Zellen mit einer vermehrten Expression pro-/antioxidativer Gene ansprachen und sich nur dieser Zelltyp präkonditionierten vor starken oxidativen Stressschäden schützen ließ. Hieraus wurde geschlussfolgert, dass bei diesen AGE-Modifikationen die Ausbildung der antioxidativen Kapazität durch die RAGE-AGE Interaktion gefördert wurde, jedoch bei der Verwendung hoher Konzentrationen auch rezeptorunabhängig funktionierte.

Als eine Wirksubstanz des BKE wurde in der Literatur Poryl-L-Lysin beschrieben. Analysen eines Poryl-L-Lysin modifizierten BSAs zeigten, dass dieses modifizierte Glykierungsendprodukt nicht für die antioxidative Wirkung des BKEs an kardialen Fibroblasten verantwortlich war. Eine anschließende Suche nach der/n antioxidativ wirkenden Komponente/n würde sich als erstrebenswert erweisen, da durch BKE-Fütterungsstudien an Mäusen nachgewiesen wurde, dass besonders fluoreszierende AGE-Modifikationen vom Organismus resorbiert und die Expression von antioxidativen Genen im Myokard stimulierten. Somit ist eine *in vivo* BKE vermittelte Steigerung der myokardialen antioxidativen Kapazität wahrscheinlich. Die Überprüfung, dass eine vorherige BKE-Fütterung vor oxidativen Stressschäden (z.B. Ischämie-/Reperfusionsschäden) *in vivo* schützt, stellt einen interessanten Ansatzpunkt für weiterführende Arbeiten dar.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass sich beide AGE-reichen Extrakte hinsichtlich ihrer Wirkung auf kardiale Fibroblasten deutlich unterschieden. Das KE wirkte vornehmlich zytotoxisch, wohingegen das Brotkrustenextrakt protektive Effekte durch die Steigerung der antioxidativen Kapazität sowohl auf zellulärer Ebene als auch *in vivo* vermittelte. Ursache hierfür könnten die in den jeweiligen Extrakten unterschiedlichen AGE/ALE-Konzentrationen und Modifikationen darstellen, die sich durch den abweichenden Nährstoffgehalten der für die Extrakterstellung verwendeten Ausgangsstoffe ergeben. So enthält das Brotkrustenextrakt vorzugsweise von reduzierenden Kohlenhydraten abstammende AGE-Modifikationen (z.B. Pentosidin), wohingegen das Kaffeeextrakt aufgrund des höheren Lipidgehaltes der Kaffeebohnen vermehrt ALE-Modifikationen sowie Lipidperoxidationsprodukte enthält (z.B. CML, MDA). Die Ergebnisse diese Arbeit zeigen, dass sich die Wirkung von exogenen AGE-Extrakten (positiv/negativ) nicht pauschal voraussagen lässt, sondern in Abhängigkeit der enthaltenen AGE-Modifikationen sehr unterschiedlich ausfallen kann.

7 Literatur

1. Brown RD, Ambler SK, Mitchell MD, Long CS. The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:657-87.
2. Henle T. Protein-bound advanced glycation endproducts (AGEs) as bioactive amino acid derivatives in foods. *Amino Acids* 2005;29(4):313-22.
3. Booz GW, Baker KM. Molecular signalling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 1995;30(4):537-43.
4. Zhu H, Itoh K, Yamamoto M, Zweier JL, Li Y. Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury. *FEBS Lett* 2005;579(14):3029-36.
5. Eghbali M, Tomek R, Woods C, Bhambi B. Cardiac fibroblasts are predisposed to convert into myocyte phenotype: specific effect of transforming growth factor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(3):795-9.
6. Cleutjens JP. The role of matrix metalloproteinases in heart disease. *Cardiovasc Res* 1996;32(5):816-21.
7. Jugdutt BI. Remodeling of the myocardium and potential targets in the collagen degradation and synthesis pathways. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2003;3(1):1-30.
8. Jugdutt BI. Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough? *Circulation* 2003;108(11):1395-403.
9. Pauschinger M, Chandrasekharan K, Li J, Schwimbeck PL, Noutsias M, Schultheiss HP. [Mechanisms of extracellular matrix remodeling in dilated cardiomyopathy]. *Herz* 2002;27(7):677-82.
10. Heeneman S, Cleutjens JP, Faber BC, Creemers EE, van Suylen RJ, Lutgens E, et al. The dynamic extracellular matrix: intervention strategies during heart failure and atherosclerosis. *J Pathol* 2003;200(4):516-25.
11. Eghbali M. Cardiac fibroblasts: function, regulation of gene expression, and phenotypic modulation. *Basic Res Cardiol* 1992;87 Suppl 2:183-9.
12. Takahara K, Kessler E, Biniaminov L, Brusel M, Eddy RL, Jani-Sait S, et al. Type I procollagen COOH-terminal proteinase enhancer protein: identification, primary structure, and chromosomal localization of the cognate human gene (PCOLCE). *J Biol Chem* 1994;269(42):26280-5.
13. Sanchez-Quintana D, Garcia-Martinez V, Macias D, Hurlle JM. Structural arrangement of the extracellular matrix network during myocardial development in the chick embryo heart. *Anat Embryol (Berl)* 1991;184(5):451-60.
14. Weber KT, Sun Y, Tyagi SC, Cleutjens JP. Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *J Mol Cell Cardiol* 1994;26(3):279-92.
15. Tomoda Y, Kikumoto K, Isumi Y, Katafuchi T, Tanaka A, Kangawa K, et al. Cardiac fibroblasts are major production and target cells of adrenomedullin in the heart in vitro. *Cardiovasc Res* 2001;49(4):721-30.
16. Harada M, Itoh H, Nakagawa O, Ogawa Y, Miyamoto Y, Kuwahara K, et al. Significance of ventricular myocytes and nonmyocytes interaction during cardiocyte hypertrophy: evidence for endothelin-1 as a paracrine hypertrophic factor from cardiac nonmyocytes. *Circulation* 1997;96(10):3737-44.
17. Norton GR, Candy G, Woodiwiss AJ. Aminoguanidine prevents the decreased myocardial compliance produced by streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. *Circulation* 1996;93(10):1905-12.
18. Maisch B, Rupp H. [Myocardial fibrosis: a cardiopathophysiologic Janus head]. *Herz* 2006;31(3):260-8.
19. Taniyama Y, Morishita R, Aoki M, Hiraoka K, Yamasaki K, Hashiya N, et al. Angiogenesis and antifibrotic action by hepatocyte growth factor in cardiomyopathy. *Hypertension* 2002;40(1):47-53.
20. Burlew BS, Weber KT. Cardiac fibrosis as a cause of diastolic dysfunction. *Herz* 2002;27(2):92-8.

21. Badenhorst D, Maseko M, Tsotetsi OJ, Naidoo A, Brooksbank R, Norton GR, et al. Cross-linking influences the impact of quantitative changes in myocardial collagen on cardiac stiffness and remodelling in hypertension in rats. *Cardiovasc Res* 2003;57(3):632-41.
22. Maillard L. Action des acides amines sur les sucres: formation des melanoidines par voie methodique. *C.R.Acad.Sci.Ser.2* 1912;154:66-68.
23. Khalifah RG, Todd P, Booth AA, Yang SX, Mott JD, Hudson BG. Kinetics of nonenzymatic glycation of ribonuclease A leading to advanced glycation end products. Paradoxical inhibition by ribose leads to facile isolation of protein intermediate for rapid post-Amadori studies. *Biochemistry* 1996;35(15):4645-54.
24. Ulrich P, Cerami A. Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog Horm Res* 2001;56:1-21.
25. Bunn HF, Higgins PJ. Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. *Science* 1981;213(4504):222-4.
26. Lo TW, Westwood ME, McLellan AC, Selwood T, Thornalley PJ. Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with N alpha-acetylarginine, N alpha-acetylcysteine, and N alpha-acetyllysine, and bovine serum albumin. *J Biol Chem* 1994;269(51):32299-305.
27. Koenig RJ, Blobstein SH, Cerami A. Structure of carbohydrate of hemoglobin A1c. *J Biol Chem* 1977;252(9):2992-7.
28. Koenig RJ, Peterson CM, Jones RL, Saudek C, Lehrman M, Cerami A. Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1976;295(8):417-20.
29. Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J* 1999;344 Pt 1:109-16.
30. Thorpe SR, Baynes JW. Maillard reaction products in tissue proteins: new products and new perspectives. *Amino Acids* 2003;25(3-4):275-81.
31. Ortwerth BJ, James H, Simpson G, Linetsky M. The generation of superoxide anions in glycation reactions with sugars, osones, and 3-deoxyosones. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;245(1):161-5.
32. Glomb MA, Monnier VM. Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction. *J Biol Chem* 1995;270(17):10017-26.
33. Ferreira AE, Ponces Freire AM, Voit EO. A quantitative model of the generation of N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in the Maillard reaction between collagen and glucose. *Biochem J* 2003;376(Pt 1):109-21.
34. Hayashi T NM. Amino-Carbonyl Reactions in Food and Biological Systems. *Developments in Food Science* 1986;13:29-38.
35. Nemet I, Varga-Defterdarovic L, Turk Z. Methylglyoxal in food and living organisms. *Mol Nutr Food Res* 2006;50(12):1105-17.
36. Wolff SP, Dean RT. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem J* 1987;245(1):243-50.
37. Wells-Knecht MC, Thorpe SR, Baynes JW. Pathways of formation of glycoxidation products during glycation of collagen. *Biochemistry* 1995;34(46):15134-41.
38. Wells-Knecht KJ, Zyzak DV, Litchfield JE, Thorpe SR, Baynes JW. Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry* 1995;34(11):3702-9.
39. Masaki H, Okano Y, Sakurai H. Generation of active oxygen species from advanced glycation end-products (AGE) under ultraviolet light A (UVA) irradiation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;235(2):306-10.
40. Miyata T, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K, Baynes JW. Alterations in nonenzymatic biochemistry in uremia: origin and significance of "carbonyl stress" in long-term uremic complications. *Kidney Int* 1999;55(2):389-99.
41. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991;40(4):405-12.

42. Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc Res* 1998;37(3):586-600.
43. Vlassara H, Palace MR. Diabetes and advanced glycation endproducts. *J Intern Med* 2002;251(2):87-101.
44. Aronson D. Cross-linking of glycated collagen in the pathogenesis of arterial and myocardial stiffening of aging and diabetes. *J Hypertens* 2003;21(1):3-12.
45. Schnider SL, Kohn RR. Effects of age and diabetes mellitus on the solubility and nonenzymatic glucosylation of human skin collagen. *J Clin Invest* 1981;67(6):1630-5.
46. Asif M, Egan J, Vasani S, Jyothirmayi GN, Masurekar MR, Lopez S, et al. An advanced glycation endproduct cross-link breaker can reverse age-related increases in myocardial stiffness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(6):2809-13.
47. Vaitkevicius PV, Lane M, Spurgeon H, Ingram DK, Roth GS, Egan JJ, et al. A cross-link breaker has sustained effects on arterial and ventricular properties in older rhesus monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(3):1171-5.
48. Vlassara H, Brownlee M, Cerami A. High-affinity-receptor-mediated uptake and degradation of glucose-modified proteins: a potential mechanism for the removal of senescent macromolecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82(17):5588-92.
49. Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, et al. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem* 1994;269(13):9889-97.
50. Chuyen NV. Toxicity of the AGEs generated from the Maillard reaction: on the relationship of food-AGEs and biological-AGEs. *Mol Nutr Food Res* 2006;50(12):1140-9.
51. Mottram DS, Wedzicha BL, Dodson AT. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* 2002;419(6906):448-9.
52. Skog KI, Johansson MA, Jagerstad MI. Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: a review on formation, occurrence and intake. *Food Chem Toxicol* 1998;36(9-10):879-96.
53. Cammerer B, Kroh LW. Investigation of the influence of reaction conditions on the elementary composition of melanoidins. *Food Chemistry* 1995;53:55-59.
54. Cammerer B, Jalyschko W, Kroh LW. Intact carbohydrate structures as part of the melanoidin skeleton. *J Agric Food Chem* 2002;50(7):2083-7.
55. Tressl R, Wondrak GT, Kruger RP, Rewicki D. New Melanoidin-like Maillard Polymers from 2-Deoxypentoses. *J Agric Food Chem* 1998;46(1):104-110.
56. Borrelli RC, Fogliano V. Bread crust melanoidins as potential prebiotic ingredients. *Mol Nutr Food Res* 2005;49(7):673-8.
57. Somoza V. Five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products: an update. *Mol Nutr Food Res* 2005;49(7):663-72.
58. Ames JM, Wynne A, Hofmann A, Plos S, Gibson GR. The effect of a model melanoidin mixture on faecal bacterial populations in vitro. *Br J Nutr* 1999;82(6):489-95.
59. Koschinsky T, He CJ, Mitsuhashi T, Bucala R, Liu C, Buening C, et al. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(12):6474-9.
60. Erbersdobler HF, Lohmann M, Buhl K. Utilization of early Maillard reaction products by humans. *Adv Exp Med Biol* 1991;289:363-70.
61. Foerster A, Henle T. Glycation in food and metabolic transit of dietary AGEs (advanced glycation end-products): studies on the urinary excretion of pyrroline. *Biochem Soc Trans* 2003;31(Pt 6):1383-5.
62. Bergmann R, Helling R, Heichert C, Scheunemann M, Mading P, Wittrisch H, et al. Radio fluorination and positron emission tomography (PET) as a new approach to study the in vivo distribution and elimination of the advanced glycation endproducts N epsilon-carboxymethyllysine (CML) and N epsilon-carboxyethyllysine (CEL). *Nahrung* 2001;45(3):182-8.
63. Somoza V, Lindenmeier M, Wenzel E, Frank O, Erbersdobler HF, Hofmann T. Activity-guided identification of a chemopreventive compound in coffee beverage using in vitro and in vivo techniques. *J Agric Food Chem* 2003;51(23):6861-9.

64. Lindenmeier M, Faist V, Hofmann T. Structural and functional characterization of pronyl-lysine, a novel protein modification in bread crust melanoidins showing in vitro antioxidative and phase I/II enzyme modulating activity. *J Agric Food Chem* 2002;50(24):6997-7006.
65. Uphoff CC, Drexler HG. Detection of mycoplasma contaminations in cell cultures by PCR analysis. *Hum Cell* 1999;12(4):229-36.
66. Schluter KD, Schreiber D. Adult ventricular cardiomyocytes: isolation and culture. *Methods Mol Biol* 2005;290:305-14.
67. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 2000;267(17):5421-6.
68. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 1992;5(2):227-31.
69. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162(1):156-9.
70. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;155:335-50.
71. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 2000;132:365-86.
72. Bouras T, Southey MC, Chang AC, Reddel RR, Willhite D, Glynne R, et al. Stanniocalcin 2 is an estrogen-responsive gene coexpressed with the estrogen receptor in human breast cancer. *Cancer Res* 2002;62(5):1289-95.
73. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150(1):76-85.
74. Kyhse-Andersen J. Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 1984;10(3-4):203-9.
75. Heussen C, Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem* 1980;102(1):196-202.
76. Kim JS, Jin Y, Lemasters JJ. Reactive oxygen species, but not Ca²⁺ overloading, trigger pH- and mitochondrial permeability transition-dependent death of adult rat myocytes after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290(5):H2024-34.
77. Dyer BW, Ferrer FA, Klinedinst DK, Rodriguez R. A noncommercial dual luciferase enzyme assay system for reporter gene analysis. *Anal Biochem* 2000;282(1):158-61.
78. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 1983;166(4):557-80.
79. Hanahan D, Jessee J, Bloom FR. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol* 1991;204:63-113.
80. Weiner LM. Quantitative determination of thiol groups in low and high molecular weight compounds by electron paramagnetic resonance. *Methods Enzymol* 1995;251:87-105.
81. Khramtsov VV, Yelinova VI, Weiner LM, Berezina TA, Martin VV, Volodarsky LB. Quantitative determination of SH groups in low- and high-molecular-weight compounds by an electron spin resonance method. *Anal Biochem* 1989;182(1):58-63.
82. Khramtsov VV, Gorunova TE, Weiner LM. Monitoring of enzymatic activity in situ by EPR. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;179(1):520-7.
83. Nohl H, Stolze K, Weiner LM. Noninvasive measurement of thiol levels in cells and isolated organs. *Methods Enzymol* 1995;251:191-203.
84. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(20):9363-7.
85. Constien R, Forde A, Liliensiek B, Grone HJ, Nawroth P, Hammerling G, et al. Characterization of a novel EGFP reporter mouse to monitor Cre recombination as demonstrated by a Tie2 Cre mouse line. *Genesis* 2001;30(1):36-44.

86. Evdokiou A, Cowled PA. Growth-regulatory activity of the growth arrest-specific gene, GAS1, in NIH3T3 fibroblasts. *Exp Cell Res* 1998;240(2):359-67.
87. Lee C, Yim MB, Chock PB, Yim HS, Kang SO. Oxidation-reduction properties of methylglyoxal-modified protein in relation to free radical generation. *J Biol Chem* 1998;273(39):25272-8.
88. Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, et al. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med* 2005;83(11):876-86.
89. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 2002;192(1):1-15.
90. Winyard PG, Moody CJ, Jacob C. Oxidative activation of antioxidant defence. *Trends Biochem Sci* 2005;30(8):453-61.
91. Kislinger T, Fu C, Huber B, Qu W, Taguchi A, Du Yan S, et al. N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *J Biol Chem* 1999;274(44):31740-9.
92. Isermann B, Bierhaus A, Humpert PM, Rudofsky G, Chavakis T, Ritzel R, et al. [AGE-RAGE: A Hypothesis or a Mechanism?]. *Herz* 2004;29(5):504-9.
93. Rosca MG, Mustata TG, Kinter MT, Ozdemir AM, Kern TS, Szveda LI, et al. Glycation of mitochondrial proteins from diabetic rat kidney is associated with excess superoxide formation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289(2):F420-30.
94. Giardino I, Edelstein D, Brownlee M. Nonenzymatic glycosylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity. A model for intracellular glycosylation in diabetes. *J Clin Invest* 1994;94(1):110-7.
95. Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest* 2001;108(7):949-55.
96. Nass N, Bartling B, Navarrete Santos A, Scheubel RJ, Bergermann J, Silber RE, et al. Advanced glycation end products, diabetes and ageing. *Z Gerontol Geriatr* 2007;40(5):349-56.
97. Vlassara H. The AGE-receptor in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Metab Res Rev* 2001;17(6):436-43.
98. Makita Z, Bucala R, Rayfield EJ, Friedman EA, Kaufman AM, Korbet SM, et al. Reactive glycosylation endproducts in diabetic uraemia and treatment of renal failure. *Lancet* 1994;343(8912):1519-22.
99. Gugliucci A, Bendayan M. Renal fate of circulating advanced glycated end products (AGE): evidence for reabsorption and catabolism of AGE-peptides by renal proximal tubular cells. *Diabetologia* 1996;39(2):149-60.
100. Brett J, Schmidt AM, Yan SD, Zou YS, Weidman E, Pinsky D, et al. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol* 1993;143(6):1699-712.
101. Alikhani Z, Alikhani M, Boyd CM, Nagao K, Trackman PC, Graves DT. Advanced glycation end products enhance expression of pro-apoptotic genes and stimulate fibroblast apoptosis through cytoplasmic and mitochondrial pathways. *J Biol Chem* 2005;280(13):12087-95.
102. Owen WF, Jr., Hou FF, Stuart RO, Kay J, Boyce J, Chertow GM, et al. Beta 2-microglobulin modified with advanced glycation end products modulates collagen synthesis by human fibroblasts. *Kidney Int* 1998;53(5):1365-73.
103. Lohwasser C, Neureiter D, Weigle B, Kirchner T, Schuppan D. The receptor for advanced glycation end products is highly expressed in the skin and upregulated by advanced glycation end products and tumor necrosis factor-alpha. *J Invest Dermatol* 2006;126(2):291-9.
104. Vlassara H. Protein glycation in the kidney: role in diabetes and aging. *Kidney Int* 1996;49(6):1795-804.
105. Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, et al. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* 1992;267(21):14998-5004.

106. Renard C, Chappey O, Wautier MP, Nagashima M, Morser J, Scherrmann JM, et al. The human and rat recombinant receptors for advanced glycation end products have a high degree of homology but different pharmacokinetic properties in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;290(3):1458-66.
107. Todaro GJ, Green H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* 1963;17:299-313.
108. John DC, Bulleid NJ. Intracellular dissociation and reassembly of prolyl 4-hydroxylase:the alpha-subunits associated with the immunoglobulin-heavy-chain binding protein (BiP) allowing reassembly with the beta-subunit. *Biochem J* 1996;317 (Pt 3):659-65.
109. Yang Z, Makita Z, Horii Y, Brunelle S, Cerami A, Sehajpal P, et al. Two novel rat liver membrane proteins that bind advanced glycosylation endproducts: relationship to macrophage receptor for glucose-modified proteins. *J Exp Med* 1991;174(3):515-24.
110. Liliensiek B, Weigand MA, Bierhaus A, Nicklas W, Kasper M, Hofer S, et al. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response. *J Clin Invest* 2004;113(11):1641-50.
111. Pugliese G, Pricci F, Iacobini C, Leto G, Amadio L, Barsotti P, et al. Accelerated diabetic glomerulopathy in galectin-3/AGE receptor 3 knockout mice. *Faseb J* 2001;15(13):2471-9.
112. Neri G, Gurrieri F, Zanni G, Lin A. Clinical and molecular aspects of the Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *Am J Med Genet* 1998;79(4):279-83.
113. Liu Q, Yan H, Dawes NJ, Mottino GA, Frank JS, Zhu H. Insulin-like growth factor II induces DNA synthesis in fetal ventricular myocytes in vitro. *Circ Res* 1996;79(4):716-26.
114. Seol MB, Bong JJ, Baik M. Expression profiles of apoptosis genes in mammary epithelial cells. *Mol Cells* 2005;20(1):97-104.
115. Del Sal G, Ruaro EM, Utrera R, Cole CN, Levine AJ, Schneider C. Gas1-induced growth suppression requires a transactivation-independent p53 function. *Mol Cell Biol* 1995;15(12):7152-60.
116. Evdokiou A, Cowled PA. Tumor-suppressive activity of the growth arrest-specific gene GAS1 in human tumor cell lines. *Int J Cancer* 1998;75(4):568-77.
117. Shichiri M, Hirata Y. Regulation of cell growth and apoptosis by adrenomedullin. *Hypertens Res* 2003;26 Suppl:S9-14.
118. Tsuruda T, Kato J, Kitamura K, Kawamoto M, Kuwasako K, Imamura T, et al. An autocrine or a paracrine role of adrenomedullin in modulating cardiac fibroblast growth. *Cardiovasc Res* 1999;43(4):958-67.
119. Autelitano DJ, Ridings R. Adrenomedullin signalling in cardiomyocytes is dependent upon CRLR and RAMP2 expression. *Peptides* 2001;22(11):1851-7.
120. Orlandini M, Marconcini L, Ferruzzi R, Oliviero S. Identification of a c-fos-induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(21):11675-80.
121. Reigstad LJ, Sande HM, Fluge O, Bruland O, Muga A, Varhaug JE, et al. Platelet-derived growth factor (PDGF)-C, a PDGF family member with a vascular endothelial growth factor-like structure. *J Biol Chem* 2003;278(19):17114-20.
122. Gao Y, Yue W, Zhang P, Li L, Xie X, Yuan H, et al. Spindlin1, a novel nuclear protein with a role in the transformation of NIH3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;335(2):343-50.
123. Reed JC, Doctor K, Rojas A, Zapata JM, Stehlik C, Fiorentino L, et al. Comparative analysis of apoptosis and inflammation genes of mice and humans. *Genome Res* 2003;13(6B):1376-88.
124. Cheng CM, Hong HJ, Liu JC, Shih NL, Juan SH, Loh SH, et al. Crucial role of extracellular signal-regulated kinase pathway in reactive oxygen species-mediated endothelin-1 gene expression induced by endothelin-1 in rat cardiac fibroblasts. *Mol Pharmacol* 2003;63(5):1002-11.
125. Chen CC, Chen N, Lau LF. The angiogenic factors Cyr61 and connective tissue growth factor induce adhesive signaling in primary human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 2001;276(13):10443-52.

126. Kireeva ML, Latinkic BV, Kolesnikova TV, Chen CC, Yang GP, Abler AS, et al. Cyr61 and Fisp12 are both ECM-associated signaling molecules: activities, metabolism, and localization during development. *Exp Cell Res* 1997;233(1):63-77.
127. Berthet C, Kaldis P. Cdk2 and Cdk4 cooperatively control the expression of Cdc2. *Cell Div* 2006;1:10.
128. Huttunen HJ, Fages C, Rauvala H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *J Biol Chem* 1999;274(28):19919-24.
129. Ishihara K, Tsutsumi K, Kawane S, Nakajima M, Kasaoka T. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) directly binds to ERK by a D-domain-like docking site. *FEBS Lett* 2003;550(1-3):107-13.
130. Pischetsrieder M. Are dietary AGEs/ALEs a risk to human health and, if so, what is the mechanism of action? *Mol Nutr Food Res* 2007;51(9):1069-70.
131. Michalsen A, Bierhaus A, Nawroth PP, Dobos GJ. [Glycotoxins and cellular dysfunction. A new mechanism for understanding the preventive effects of lifestyle modifications]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2006;49(8):773-9.
132. Glomb MA, Rosch D, Nagaraj RH. N(delta)-(5-hydroxy-4,6-dimethylpyrimidine-2-yl)-l-ornithine, a novel methylglyoxal-arginine modification in beer. *J Agric Food Chem* 2001;49(1):366-72.
133. Rodrigues JA, Barros AA, Rodrigues PG. Differential pulse polarographic determination of alpha-dicarbonyl compounds in foodstuffs after derivatization with o-phenylenediamine. *J Agric Food Chem* 1999;47(8):3219-22.
134. Speer K, Kölling-Speer I. The lipid fraction of the coffee bean. *Braz.J.Plant Physiol* 2006;18(1):201-206.
135. Hartkopf J, Erbersdobler HF. [Model experiments of the formation of N epsilon-carboxymethyllysine in food products]. *Z Lebensm Unters Forsch* 1994;198(1):15-9.
136. Drusch FV, Erbersdobler HF. Determination of N-e-carboxymethyllysine in milk products by a modified reversed-phase HPLC method. *Food Chem.* 1999;65:547-553.
137. Fu MX, Requena JR, Jenkins AJ, Lyons TJ, Baynes JW, Thorpe SR. The advanced glycation end product, Nepsilon-(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. *J Biol Chem* 1996;271(17):9982-6.
138. Goldberg T, Cai W, Peppas M, Dardaine V, Baliga BS, Uribarri J, et al. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *J Am Diet Assoc* 2004;104(8):1287-91.
139. Nagai R, Hayashi CM, Xia L, Takeya M, Horiuchi S. Identification in human atherosclerotic lesions of GA-pyridine, a novel structure derived from glycolaldehyde-modified proteins. *J Biol Chem* 2002;277(50):48905-12.
140. Hofmann T, Bors W, Stettmaier K. Studies on radical intermediates in the early stage of the nonenzymatic browning reaction of carbohydrates and amino acids. *J Agric Food Chem* 1999;47(2):379-90.
141. Mavric KY, Schuster K, Kappenstein O, Scheller D, Henle T. A new imidazolinone resulting from the reaction of peptide-bound arginine and oligosaccharides with 1,4-glycosidic linkages. *Eur Food Res Technol.* 2004;218:213-218.
142. Henle WA, Klostermeyer H. Isolation and identification of a protein-bound imidazolone resulting from the reaction of arginine residues and methylglyoxal. *Z Lebensm Unters Forsch* 1994;199(55-58).
143. Adams A, Borrelli RC, Fogliano V, De Kimpe N. Thermal degradation studies of food melanoidins. *J Agric Food Chem* 2005;53(10):4136-42.
144. Silván JM, Lagemaat J, Olano A, M DdC. Analysis and biological properties of amino acid derivatives formed by Maillard reaction in foods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2006;41:1543-1551.
145. Morales FJ, Babbal MB. Melanoidins exert a weak antiradical activity in watery fluids. *J Agric Food Chem* 2002;50(16):4657-61.

146. Sato T, Shimogaito N, Wu X, Kikuchi S, Yamagishi S, Takeuchi M. Toxic advanced glycation end products (TAGE) theory in Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 2006;21(3):197-208.
147. Brownlee M, Vlassara H, Cerami A. Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann Intern Med* 1984;101(4):527-37.
148. Hiramoto K, Ishihara A, Sakui N, Daishima S, Kikugawa K. Formation of hydroxyfuranone and hydroxypyranone derivatives with DNA-breaking activity in the Maillard reaction of glucose and albumin under physiological conditions. *Biol Pharm Bull* 1998;21(2):102-4.
149. Borrelli RC, Mennella C, Barba F, Russo M, Russo GL, Krome K, et al. Characterization of coloured compounds obtained by enzymatic extraction of bakery products. *Food Chem Toxicol* 2003;41(10):1367-74.
150. Woffenden HM, Ames JM, Chandra S. Relationships between antioxidant activity, color, and flavor compounds of crystal malt extracts. *J Agric Food Chem* 2001;49(11):5524-30.
151. Chevalier F, Chobert JM, Genot C, Haertle T. Scavenging of free radicals, antimicrobial, and cytotoxic activities of the Maillard reaction products of beta-lactoglobulin glycated with several sugars. *J Agric Food Chem* 2001;49(10):5031-8.
152. Lindenmeier M, Hofmann T. Influence of baking conditions and precursor supplementation on the amounts of the antioxidant pronyl-L-lysine in bakery products. *J Agric Food Chem* 2004;52(2):350-4.
153. Vlassara H, Cai W, Crandall J, Goldberg T, Oberstein R, Dardaine V, et al. Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(24):15596-601.
154. Chuyen NV, Arai H, Nakanishi T, Utsunomiya N. Are food advanced glycation end products toxic in biological systems? *Ann N Y Acad Sci* 2005;1043:467-73.
155. Somoza V, Wenzel E, Lindenmeier M, Grothe D, Erbersdobler HF, Hofmann T. Influence of feeding malt, bread crust, and a pronylated protein on the activity of chemopreventive enzymes and antioxidative defense parameters in vivo. *J Agric Food Chem* 2005;53(21):8176-82.
156. Magnani E, Bettini E. Resazurin detection of energy metabolism changes in serum-starved PC12 cells and of neuroprotective agent effect. *Brain Res Brain Res Protoc* 2000;5(3):266-72.
157. Sakurai T, Tsuchiya S. Superoxide production from nonenzymatically glycated protein. *FEBS Lett* 1988;236(2):406-10.
158. Mullarkey CJ, Edelstein D, Brownlee M. Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;173(3):932-9.
159. Yim MB, Yim HS, Lee C, Kang SO, Chock PB. Protein glycation: creation of catalytic sites for free radical generation. *Ann N Y Acad Sci* 2001;928:48-53.
160. Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 2000;18(6):655-73.
161. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002;82(1):47-95.
162. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279(6):L1005-28.
163. Finkel T. Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett* 2000;476(1-2):52-4.
164. Zill H, Gunther R, Erbersdobler HF, Folsch UR, Faist V. RAGE expression and AGE-induced MAP kinase activation in Caco-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288(5):1108-11.
165. Zill H, Bek S, Hofmann T, Huber J, Frank O, Lindenmeier M, et al. RAGE-mediated MAPK activation by food-derived AGE and non-AGE products. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300(2):311-5.
166. Somoza V, Lindenmeier M, Hofmann T, Frank O, Erbersdobler HF, Baynes JW, et al. Dietary bread crust advanced glycation end products bind to the receptor for AGEs in HEK-293 kidney cells but are rapidly excreted after oral administration to healthy and subtotaly nephrectomized rats. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1043:492-500.

167. Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JE. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care* 2006;29(6):1420-32.
168. Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280(5):E685-94.
169. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 2001;44(2):129-46.
170. Lander HM, Tauras JM, Ogiste JS, Hori O, Moss RA, Schmidt AM. Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. *J Biol Chem* 1997;272(28):17810-4.
171. Fukami K, Ueda S, Yamagishi S, Kato S, Inagaki Y, Takeuchi M, et al. AGEs activate mesangial TGF-beta-Smad signaling via an angiotensin II type I receptor interaction. *Kidney Int* 2004;66(6):2137-47.
172. Seeland U, Haeuselner C, Hinrichs R, Rosenkranz S, Pfitzner T, Scharffetter-Kochanek K, et al. Myocardial fibrosis in transforming growth factor-beta(1) (TGF-beta(1)) transgenic mice is associated with inhibition of interstitial collagenase. *Eur J Clin Invest* 2002;32(5):295-303.
173. Fine A, Poliks CF, Smith BD, Goldstein RH. The accumulation of type I collagen mRNAs in human embryonic lung fibroblasts stimulated by transforming growth factor-beta. *Connect Tissue Res* 1990;24(3-4):237-47.
174. Eghbali M, Tomek R, Sukhatme VP, Woods C, Bhambi B. Differential effects of transforming growth factor-beta 1 and phorbol myristate acetate on cardiac fibroblasts. Regulation of fibrillar collagen mRNAs and expression of early transcription factors. *Circ Res* 1991;69(2):483-90.
175. Leask A. TGFbeta, cardiac fibroblasts, and the fibrotic response. *Cardiovasc Res* 2007;74(2):207-12.
176. Daoud S, Schinzel R, Neumann A, Loske C, Fraccarollo D, Diez C, et al. Advanced glycation endproducts: activators of cardiac remodeling in primary fibroblasts from adult rat hearts. *Mol Med* 2001;7(8):543-51.
177. De Vriese AS, Tilton RG, Mortier S, Lameire NH. Myofibroblast transdifferentiation of mesothelial cells is mediated by RAGE and contributes to peritoneal fibrosis in uraemia. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21(9):2549-55.
178. Oldfield MD, Bach LA, Forbes JM, Nikolic-Paterson D, McRobert A, Thallas V, et al. Advanced glycation end products cause epithelial-myofibroblast transdifferentiation via the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J Clin Invest* 2001;108(12):1853-63.
179. Manabe I, Shindo T, Nagai R. Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2002;91(12):1103-13.
180. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 1999;277(1 Pt 1):C1-9.
181. Miragoli M, Gaudesius G, Rohr S. Electrotonic modulation of cardiac impulse conduction by myofibroblasts. *Circ Res* 2006;98(6):801-10.
182. Long CS, Brown RD. The cardiac fibroblast, another therapeutic target for mending the broken heart? *J Mol Cell Cardiol* 2002;34(10):1273-8.
183. Siwik DA, Chang DL, Colucci WS. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro. *Circ Res* 2000;86(12):1259-65.
184. Brilla CG. Aldosterone and myocardial fibrosis in heart failure. *Herz* 2000;25(3):299-306.
185. Rocic P, Lucchesi PA. NAD(P)H oxidases and TGF-beta-induced cardiac fibroblast differentiation: Nox-4 gets Smad. *Circ Res* 2005;97(9):850-2.
186. Guedez L, Courtemanch L, Stetler-Stevenson M. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 induces differentiation and an antiapoptotic phenotype in germinal center B cells. *Blood* 1998;92(4):1342-9.
187. Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E, Iwata K. Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett* 1992;298(1):29-32.

188. Zmijewski JW, Moellering DR, Le Goffe C, Landar A, Ramachandran A, Darley-Usmar VM. Oxidized LDL induces mitochondrially associated reactive oxygen/nitrogen species formation in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289(2):H852-61.
189. Simm ABH. Reactive oxygen species and aging. 2005;3:115-125.
190. Sorescu D, Griendling KK. Reactive oxygen species, mitochondria, and NAD(P)H oxidases in the development and progression of heart failure. *Congest Heart Fail* 2002;8(3):132-40.
191. Jones SA, Wood JD, Coffey MJ, Jones OT. The functional expression of p47-phox and p67-phox may contribute to the generation of superoxide by an NADPH oxidase-like system in human fibroblasts. *FEBS Lett* 1994;355(2):178-82.
192. Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2002;59(9):1428-59.
193. Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;285(2):R277-97.
194. Berry CE, Hare JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol* 2004;555(Pt 3):589-606.
195. Sanders SA, Eisenthal R, Harrison R. NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase--generation of superoxide anion. *Eur J Biochem* 1997;245(3):541-8.
196. Tomasini R, Samir AA, Vaccaro MI, Pebusque MJ, Dagorn JC, Iovanna JL, et al. Molecular and functional characterization of the stress-induced protein (SIP) gene and its two transcripts generated by alternative splicing. SIP induced by stress and promotes cell death. *J Biol Chem* 2001;276(47):44185-92.
197. Tomasini R, Samir AA, Carrier A, Isnardon D, Cecchinelli B, Soddu S, et al. TP53INP1s and homeodomain-interacting protein kinase-2 (HIPK2) are partners in regulating p53 activity. *J Biol Chem* 2003;278(39):37722-9.
198. Yamawaki H, Berk BC. Thioredoxin: a multifunctional antioxidant enzyme in kidney, heart and vessels. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005;14(2):149-53.
199. Berruyer C, Martin FM, Castellano R, Macone A, Malergue F, Garrido-Urbani S, et al. Vanin-1-/- mice exhibit a glutathione-mediated tissue resistance to oxidative stress. *Mol Cell Biol* 2004;24(16):7214-24.
200. Pitari G, Malergue F, Martin F, Philippe JM, Massucci MT, Chabret C, et al. Pantetheinase activity of membrane-bound Vanin-1: lack of free cysteamine in tissues of Vanin-1 deficient mice. *FEBS Lett* 2000;483(2-3):149-54.
201. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. *Biochem J* 1988;256(1):251-5.
202. Martin F, Penet MF, Malergue F, Lepidi H, Dessein A, Galland F, et al. Vanin-1(-/-) mice show decreased NSAID- and Schistosoma-induced intestinal inflammation associated with higher glutathione stores. *J Clin Invest* 2004;113(4):591-7.
203. Cai W, Gao QD, Zhu L, Peppia M, He C, Vlassara H. Oxidative stress-inducing carbonyl compounds from common foods: novel mediators of cellular dysfunction. *Mol Med* 2002;8(7):337-46.
204. Peppia M, Goldberg T, Cai W, Rayfield E, Vlassara H. Glycotoxins: a missing link in the "relationship of dietary fat and meat intake in relation to risk of type 2 diabetes in men". *Diabetes Care* 2002;25(10):1898-9.
205. Sumbayev VV, Yasinska IM. Regulation of MAP kinase-dependent apoptotic pathway: implication of reactive oxygen and nitrogen species. *Arch Biochem Biophys* 2005;436(2):406-12.
206. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *Embo J* 1991;10(8):2247-58.
207. Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ. Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* 1996;271(8):4138-42.
208. Chen YH, Yet SF, Perrella MA. Role of heme oxygenase-1 in the regulation of blood pressure and cardiac function. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003;228(5):447-53.

209. Feng W, Benz FW, Cai J, Pierce WM, Kang YJ. Metallothionein disulfides are present in metallothionein-overexpressing transgenic mouse heart and increase under conditions of oxidative stress. *J Biol Chem* 2006;281(2):681-7.
210. Butcher HL, Kennette WA, Collins O, Zalups RK, Koropatnick J. Metallothionein mediates the level and activity of nuclear factor kappa B in murine fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;310(2):589-98.
211. Fang CX, Doser TA, Yang X, Sreejayan N, Ren J. Metallothionein antagonizes aging-induced cardiac contractile dysfunction: role of PTP1B, insulin receptor tyrosine phosphorylation and Akt. *Aging Cell* 2006;5(2):177-85.
212. Kang YJ. The antioxidant function of metallothionein in the heart. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999;222(3):263-73.
213. Kang YJ, Chen Y, Yu A, Voss-McCowan M, Epstein PN. Overexpression of metallothionein in the heart of transgenic mice suppresses doxorubicin cardiotoxicity. *J Clin Invest* 1997;100(6):1501-6.
214. Kimura T, Oguro I, Kohroki J, Takehara M, Itoh N, Nakanishi T, et al. Metallothionein-null mice express altered genes during development. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;270(2):458-61.
215. Abdel-Mageed AB, Agrawal KC. Activation of nuclear factor kappaB: potential role in metallothionein-mediated mitogenic response. *Cancer Res* 1998;58(11):2335-8.
216. Hahn P, Qian Y, Dentchev T, Chen L, Beard J, Harris ZL, et al. Disruption of ceruloplasmin and hephaestin in mice causes retinal iron overload and retinal degeneration with features of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(38):13850-5.
217. Patel BN, Dunn RJ, Jeong SY, Zhu Q, Julien JP, David S. Ceruloplasmin regulates iron levels in the CNS and prevents free radical injury. *J Neurosci* 2002;22(15):6578-86.
218. Fox PL, Mazumder B, Ehrenwald E, Mukhopadhyay CK. Ceruloplasmin and cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med* 2000;28(12):1735-44.
219. Miyajima H, Takahashi Y, Serizawa M, Kaneko E, Gitlin JD. Increased plasma lipid peroxidation in patients with aceruloplasminemia. *Free Radic Biol Med* 1996;20(5):757-60.
220. Goldstein IM, Kaplan HB, Edelson HS, Weissmann G. Ceruloplasmin. A scavenger of superoxide anion radicals. *J Biol Chem* 1979;254(10):4040-5.
221. Kang JH, Kim KS, Choi SY, Kwon HY, Won MH. Oxidative modification of human ceruloplasmin by peroxy radicals. *Biochim Biophys Acta* 2001;1568(1):30-6.
222. Uriu-Adams JY, Keen CL. Copper, oxidative stress, and human health. *Mol Aspects Med* 2005;26(4-5):268-98.
223. Carlsson LM, Jonsson J, Edlund T, Marklund SL. Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(14):6264-8.
224. Ghoshal K, Majumder S, Li Z, Bray TM, Jacob ST. Transcriptional induction of metallothionein-I and -II genes in the livers of Cu,Zn-superoxide dismutase knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264(3):735-42.
225. Chen EP, Bittner HB, Davis RD, Folz RJ, Van Trigt P. Extracellular superoxide dismutase transgene overexpression preserves postischemic myocardial function in isolated murine hearts. *Circulation* 1996;94(9 Suppl):II412-7.
226. Tanaka M, Mokhtari GK, Terry RD, Balsam LB, Lee KH, Kofidis T, et al. Overexpression of human copper/zinc superoxide dismutase (SOD1) suppresses ischemia-reperfusion injury and subsequent development of graft coronary artery disease in murine cardiac grafts. *Circulation* 2004;110(11 Suppl 1):II200-6.
227. Peled-Kamar M, Lotem J, Okon E, Sachs L, Groner Y. Thymic abnormalities and enhanced apoptosis of thymocytes and bone marrow cells in transgenic mice overexpressing Cu/Zn-superoxide dismutase: implications for Down syndrome. *Embo J* 1995;14(20):4985-93.
228. Calabrese EJ, Bachmann KA, Bailer AJ, Bolger PM, Borak J, Cai L, et al. Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;222(1):122-8.
229. Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Vina J. Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1067:425-35.

230. Hollander J, Fiebig R, Gore M, Ookawara T, Ohno H, Ji LL. Superoxide dismutase gene expression is activated by a single bout of exercise in rat skeletal muscle. *Pflugers Arch* 2001;442(3):426-34.
231. Warner BB, Stuart L, Gebb S, Wispe JR. Redox regulation of manganese superoxide dismutase. *Am J Physiol* 1996;271(1 Pt 1):L150-8.
232. Baines CP, Goto M, Downey JM. Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29(1):207-16.
233. Yamashita N, Hoshida S, Taniguchi N, Kuzuya T, Hori M. Whole-body hyperthermia provides biphasic cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in the rat. *Circulation* 1998;98(14):1414-21.
234. Buetler TM, Latado H, Baumeyer A, Delatour T. Dicarbonyls Stimulate Cellular Protection Systems in Primary Rat Hepatocytes and Show Anti-inflammatory Properties. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1126:113-7.
235. Finot PA. Historical perspective of the Maillard reaction in food science. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1043:1-8.
236. Chuyen. Antioxidative Effects of Maillard reaction products in vivo. In *The Maillard reaction: Advances in Life Science*. P.A. Finot et al., Eds. / Birkhauser Verlag, Basel 1990:285-290.
237. Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res* 1999;84(5):489-97.
238. Horrigan LA, Kelly JP, Connor TJ. Immunomodulatory effects of caffeine: friend or foe? *Pharmacol Ther* 2006;111(3):877-92.
239. Charurin P, Ames JM, del Castillo MD. Antioxidant activity of coffee model systems. *J Agric Food Chem* 2002;50(13):3751-6.
240. Borrelli RC, Visconti A, Mennella C, Anese M, Fogliano V. Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. *J Agric Food Chem* 2002;50(22):6527-33.
241. Belitz H-D, W. G, P. S. *Food Chemistry*. Food Chemistry, Springer Verlag, Berlin Heidelberg 2004.
242. Muscat S, Pelka J, Hegele J, Weigle B, Munch G, Pischetsrieder M. Coffee and Maillard products activate NF-kappaB in macrophages via H2O2 production. *Mol Nutr Food Res* 2007;51(5):525-35.
243. Svilaas A, Sakhi AK, Andersen LF, Svilaas T, Strom EC, Jacobs DR, Jr., et al. Intakes of antioxidants in coffee, wine, and vegetables are correlated with plasma carotenoids in humans. *J Nutr* 2004;134(3):562-7.
244. Anese M, Nicoli MC. Antioxidant properties of ready-to-drink coffee brews. *J Agric Food Chem* 2003;51(4):942-6.
245. Goya L, Delgado-Andrade C, Rufian-Henares JA, Bravo L, Morales FJ. Effect of coffee melanoidin on human hepatoma HepG2 cells. Protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide. *Mol Nutr Food Res* 2007;51(5):536-45.
246. Schmidt AM, Hori O, Brett J, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *Arterioscler Thromb* 1994;14(10):1521-8.
247. Wautier JL, Wautier MP, Schmidt AM, Anderson GM, Hori O, Zoukourian C, et al. Advanced glycation end products (AGEs) on the surface of diabetic erythrocytes bind to the vessel wall via a specific receptor inducing oxidant stress in the vasculature: a link between surface-associated AGEs and diabetic complications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(16):7742-6.
248. Rinkus SJ, Taylor RT. Analysis of hydrogen peroxide in freshly prepared coffees. *Food Chem Toxicol* 1990;28(5):323-31.
249. Long LH, Halliwell B. Coffee drinking increases levels of urinary hydrogen peroxide detected in healthy human volunteers. *Free Radic Res* 2000;32(5):463-7.
250. Hiramoto K, Kida T, Kikugawa K. Increased urinary hydrogen peroxide levels caused by coffee drinking. *Biol Pharm Bull* 2002;25(11):1467-71.

251. Naderi J, Hung M, Pandey S. Oxidative stress-induced apoptosis in dividing fibroblasts involves activation of p38 MAP kinase and over-expression of Bax: resistance of quiescent cells to oxidative stress. *Apoptosis* 2003;8(1):91-100.
252. Kanner J. Dietary advanced lipid oxidation endproducts are risk factors to human health. *Mol Nutr Food Res* 2007;51(9):1094-101.
253. Miyata T, Fu MX, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C, Thorpe SR, Baynes JW. Autoxidation products of both carbohydrates and lipids are increased in uremic plasma: is there oxidative stress in uremia? *Kidney Int* 1998;54(4):1290-5.
254. Zamora R, Hidalgo FJ. Coordinate contribution of lipid oxidation and Maillard reaction to the nonenzymatic food browning. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2005;45(1):49-59.
255. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991;11(1):81-128.
256. Yan HD, Li XZ, Xie JM, Li M. Effects of advanced glycation end products on renal fibrosis and oxidative stress in cultured NRK-49F cells. *Chin Med J (Engl)* 2007;120(9):787-93.
257. Chen S, Cohen MP, Lautenslager GT, Shearman CW, Ziyadeh FN. Glycated albumin stimulates TGF-beta 1 production and protein kinase C activity in glomerular endothelial cells. *Kidney Int* 2001;59(2):673-81.
258. Twigg SM, Joly AH, Chen MM, Tsubaki J, Kim HS, Hwa V, et al. Connective tissue growth factor/IGF-binding protein-related protein-2 is a mediator in the induction of fibronectin by advanced glycosylation end-products in human dermal fibroblasts. *Endocrinology* 2002;143(4):1260-9.
259. Zhou G, Li C, Cai L. Advanced glycation end-products induce connective tissue growth factor-mediated renal fibrosis predominantly through transforming growth factor beta-independent pathway. *Am J Pathol* 2004;165(6):2033-43.
260. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006;69(3):562-73.
261. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;92(8):827-39.
262. Fu X, Kao JL, Bergt C, Kassim SY, Huq NP, d'Avignon A, et al. Oxidative cross-linking of tryptophan to glycine restrains matrix metalloproteinase activity: specific structural motifs control protein oxidation. *J Biol Chem* 2004;279(8):6209-12.
263. Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW. Hypochlorous acid generated by myeloperoxidase modifies adjacent tryptophan and glycine residues in the catalytic domain of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin): an oxidative mechanism for restraining proteolytic activity during inflammation. *J Biol Chem* 2003;278(31):28403-9.
264. Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest* 1996;98(11):2572-9.
265. Wang WZ, Fang XH, Stephenson LL, Khiabani KT, Zamboni WA. Ischemia/reperfusion-induced necrosis and apoptosis in the cells isolated from rat skeletal muscle. *J Orthop Res* 2008;26(3):351-6.
266. Van Cruchten S, Van Den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 2002;31(4):214-23.
267. Valencia JV, Mone M, Koehne C, Rediske J, Hughes TE. Binding of receptor for advanced glycation end products (RAGE) ligands is not sufficient to induce inflammatory signals: lack of activity of endotoxin-free albumin-derived advanced glycation end products. *Diabetologia* 2004;47(5):844-52.

Anhang

| | Gen | Primersequenz | Produkt - größe [bp] | TA [° C] | Zyklen | Spezie | Genbank - Nummer |
|--------------------------------|---|---|--|-------------|--------|--------|---------------------|
| Rezeptoren | Dost (Ager1) | se: TGTTC AAGGAGGAGGGTGTG as: AGCCTAGCCGGTTGTAATCC | 300 | 58 | 28 | M | NM 078382 |
| | Prksh (Ager2) | se: ACAGACGAGTACAACAGCGGCA as: GCGGTACTTGTCCCTGATGGC | 536 | 61 | 31 | M, H | NM 008925 |
| | Lgals3 (Ager3) | se: TGATGTTGCCTTCCACTTTAA as: CCAGGACTTGTATTTGAATG | 152 | 55 | 30 | M, H | NM 010705 |
| | Scarb-1 (Srb1) | se: GAATTCTGGGGTCTTCACTGTC as: GCAGAACTACTGGCTCGATCTT | 593 | 61 | 29 | M | NM 016741 |
| | Rage | se: CTGAACTCACAGCCAGTGTCCC as: CCCTGACTCGGAGTTGGATAG | 298 | 55 | 40 | M | NM 007425 |
| | Matrixmetallo- proteinasen (MMPs) | Mmp2 | se: CCCTCAAGAAGATGCAGAAGTT as: CCATCAAACGGGTATCCATC | 340 | 55 | 34 | M |
| Mmp9 | | se: AGACGACATAGACGGCATCC as: ATTGTCTGCCGACTCAAAG | 298 | 61 | 39 | M | NM 013599 |
| Mmp13 | | se: GGCCACCTTCTTCTTGTGA as: GGTGGGATCATCAAGTTTGC | 247 | 61 | 32 | M | NM 008607 |
| Mmp14 | | se: ATCTGTGACGGGAACCTTGGAC as: GCTCCTTAATGTGCTTGGGGTA | 262 | 61 | 25 | M, H | NM 008602 |
| Tissue inhibitors of MMPs | Timp1 | se: AGACCACCTTATACCAGCGTTAT as: GATAGATAAACAGGGAACACTG | 320 | 61 | 28 | M, H | NM 011593 |
| | Timp2 | se: CTGGACGTTGGAGGAAAGAA as: TCTCTTGATGCAGGCGAAG | 285 | 61 | 28 | M | NM 011594 |
| | Timp3 | se: CCACGTGCAGTACATTCACAC as: CCAGGTGGTAGCGTAATTG | 194 | 61 | 28 | M | NM 011595 |
| Myofibroblasten- markergene | Acta-2 | se: CACGAAACCACCTATAACAGCA as: ATCCACAACCGTTCAAGTTG | 354 | 58 | 30 | M | NM 009606 |
| | Tpm1 | se: TGGTGTCACTGAAAAGAACT as: TGGATCTCTGAATCTCCATCT | 313 | 58 | 35 | M | NM 024427 |
| EZM - Gene | Col1a1 | as: AAGAATGGAGATGATGGGGAAGCT se: AGGACCAGCAGGACCAGCATCTC | 175 | 61 | 39 | M, H | NM 007742 |
| | Col3a1 | se: TGGTATGAAAGGACACAGAGGC as: TCCAACCTCACCTTAGCACC | 283 | 61 | 30 | M, H | NM 009930 |
| | Col4a1 | se: GGGAGCATGAAGGGACAGAA as: AGGCACACCTTTTCTCCAG | 255 | 61 | 30 | M | NM 009931 |
| | Lamb2 | se: GACCCTATGGGTTCTCAAGATG as: AGCCTCCAGGTTAAATGGT | 471 | 58 | 30 | M | NM 008483 |
| | Fbln5 | se: AAACCACACGTGTACTCTACTG as: CTGCCTCTGAAGTTGATGACAG | 417 | 58 | 31 | M | NM 011812 |
| | Wachstums- faktoren | Tgfb1 | se: GAGGTCACCCGCTGCTAATG as: CTGGAGCTGAAGCAATAGTTGG | 550 | 61 | 28 | M, H |
| Tgfb2 | | se: TGGATCAGTTTATGCGCAAG as: GCGGACGATTCTGAAGTAGG | 308 | 55 | 32 | M | NM 009367 |
| Tgfb3 | | se: TTCGACATGATCCAGGGACT as: GCTTGGCTATGTGCTCATCC | 226 | 55 | 32 | M | NM 009368 |

| | Gen | Primersequenz | Produkt - größe [bp] | TA [° C] | Zyklen | Spezie | Genbank - Nummer |
|---------------------------------------|---|---|-------------------------|-------------|--------|-----------|---------------------|
| prooxidative Gene | gp91 ^{phox} | se: TCGAAGACAACCTGGACAGGAA as: GAAGAAGATCACAAGAGATG | 379 | 55 | 35 | M, H | NM 007807 |
| | Nox4 | se: AACCTCTTCTTGTCTTCTAC as: AGGCACAAAGGTCCAGAAAT | 296 | 58 | 30 | M, H | NM 015760 |
| | Xdh | se: CAAGGCCTTACACCAAGAT as: GGTCCCTGTAAAGCAGTCA | 394 | 55 | 27 | M | NM 011723 |
| Markergene des oxidativen Stresses | Vnn1 | se: AGGGTAAACTGGTTGCGAGATA as: AGTTTTCTTCTTGGGTCTTCC | 391 | 58 | 31 | M | NM 011704 |
| | Vnn3 | se: TCACCAAGCTTACAGGAAGTGC as: GCAAGTTGACTCCCACTTAGCA | 313 | 58 | 35 | M | NM 011979 |
| | Sip | se: CTGCATCTTTGGAATGCTT as: CGACGGAGACCAATTTCTGTT | 421 | 55 | 31 | M | NM 021897 |
| antioxidative Gene | Cu - Zn - Sod (Sod1) | se: TGAAGAGAGGCATGTTGGAGAC as: TTCTTCATTTCCACCTTTGCC | 172 | 61 | 30 | M, H | NM 011434 |
| | Mn - Sod (Sod2) | se: CCGAGGAGAAGTACCACGAG as: GAAGGTAGTAAGCGTGCCTC | 281 | 55 | 27 | M, H | NM 013671 |
| | Ec - Sod (Sod3) | se: AGCTGGCTTGGCTTCTCTTG as: GGTCAAGCCTGTCTGCTAGG | 326 | 61 | 37 | M | NM 011435 |
| | Cat | se: CAGGTTTCTTCTTGTTCAG as: GTAGGGACAGTTACAGGTAT | 404 | 61 | 30 | M, H | NM 009804 |
| | Cp | se: TTCAGCCAATGGGAGTAAGTTT as: TGCATGTGTGAACATCCTGATA | 374 | 55 | 33 | M | NM 007752 |
| | Mt1 | se: GGTCTCTAAGCGTCAACCAC as: AGGAGCAGCAGCTCTTCTTG | 191 | 55 | 27 | M | NM 013602 |
| Mt2 | se: CCGATCTCTGCTGATCTTC as: ACTTGTCCGAAGCCTCTTGG | 209 | 55 | 28 | M | NM 008630 | |
| Fibroblasten- marker | P4ha1 | se: GTGGATTACCTGCCAGAGAGAC as: GCTCATACTGTCCTCCAACCTCC | 445 | 60 | 23 | M | NM 011030 |
| | P4hb | se: CTGAAGACTGGGACAAACAGC as: GCTGGGAAGAACTTCAAGTGTG | 262 | 60 | 27 | M | NM 011032 |
| housekeeping gen | 18 S | se: GTTGGTGGAGCCGATTGTCTGG as: AGGGCAGGGACTTAATCAACGC | 346 | 60 | 12 | M, H | X00686 |
| Mykoplasmen | Myko | se: YGCCTGRGTAGTAYRYWCGC as: GCGGTGTGTACAARMCCCGA | 510 | 60 | 40 | M, H, R | |

Anhang Tabelle 1: Genspezifische Primersequenzen (siehe Abschnitt 3.9.4.3) mit spezifischer TA = annealing Temperatur und Zyklenzahl. Spezie: M = Maus, H = human, R = Ratte.

Anhang Tabelle 2:

Zeitabhängiger Einfluss der Extraktbehandlung auf die Aktivität verschiedener Kinasen

| BKE [min] | P-ERK ^{MAPK} | P-p38 ^{MAPK} | P-AKT | KE [min] | P-ERK ^{MAPK} | P-p38 ^{MAPK} | P-AKT |
|-----------|-----------------------|-----------------------|------------------|----------|-----------------------|-----------------------|-----------------|
| 0 | 100 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| 5 | 854 ± 88 ** | 413 ± 107 * | 88 ± 17 | 5 | 259 ± 51 * | 913 ± 191 * | 43 ± 9 * |
| 10 | 456 ± 89 ** | 256 ± 70 | 41 ± 5 ** | 10 | 102 ± 30 | 343 ± 31 ** | 62 ± 9 |
| 30 | 303 ± 33 ** | 526 ± 156 * | 53 ± 9 ** | 30 | 51 ± 14 * | 143 ± 37 | 108 ± 13 |
| 60 | 476 ± 50 ** | 817 ± 128 ** | 105 ± 35 | 60 | 54 ± 13 * | 195 ± 57 | 115 ± 5 |
| 120 | 335 ± 33 ** | 454 ± 23 * | 116 ± 8 | 120 | 37 ± 6 ** | 240 ± 52 * | 93 ± 9 |

Die dazugehörige graphische Darstellung ist in Abb. 4.19 zu finden.

Anhang Tabelle 3:

Konzentrationsabhängiger Einfluss der Extraktbehandlung auf die Aktivität verschiedener Kinasen

| [5 min] | WT | Zelllinie | | [5 min] | RAGE KO | Zelllinie | |
|------------|-----------------------|-----------------------|------------------|------------|-----------------------|-----------------------|------------|
| KE [mg/ml] | P-ERK ^{MAPK} | P-p38 ^{MAPK} | P-AKT | KE [mg/ml] | P-ERK ^{MAPK} | P-p38 ^{MAPK} | P-AKT |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| 0,03 | 117 ± 24 | 172 ± 9 ** | 72 ± 9 ** | 0,03 | 124 ± 9 * | 156 ± 43 | 139 ± 20 |
| 0,1 | 155 ± 33 | 321 ± 40 ** | 70 ± 11 ** | 0,1 | 181 ± 21 ** | 297 ± 79 * | 147 ± 41 |
| 0,3 | 167 ± 33 | 586 ± 80 ** | 50 ± 8 ** | 0,3 | 337 ± 55 ** | 690 ± 257 * | 139 ± 28 |
| 0,5 | 298 ± 23 * | 1027 ± 112 * | 23 ± 4 ** | 0,5 | 1105 ± 238 * | 1919 ± 595 * | 309 ± 63 |
| 1 | 283 ± 63 * | 1569 ± 217 * | 30 ± 9 ** | 1 | 1169 ± 454 * | 2748 ± 703 * | 281 ± 53 * |

| [60 min] | WT | Zelllinie | | [60 min] | RAGE KO | Zelllinie | |
|------------|-----------------------|-----------------------|----------|------------|-----------------------|-----------------------|-------------|
| KE [mg/ml] | P-ERK ^{MAPK} | P-p38 ^{MAPK} | P-AKT | KE [mg/ml] | P-ERK ^{MAPK} | P-p38 ^{MAPK} | P-AKT |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| 0,03 | 82 ± 6 ** | 100 ± 10 | 79 ± 15 | 0,03 | 131 ± 11 * | 131 ± 17 | 132 ± 17 |
| 0,1 | 72 ± 6 | 142 ± 32 | 120 ± 13 | 0,1 | 148 ± 24 | 111 ± 5 | 107 ± 25 |
| 0,3 | 50 ± 8 ** | 159 ± 20 ** | 94 ± 23 | 0,3 | 169 ± 29 * | 211 ± 42 * | 181 ± 43 |
| 0,5 | 47 ± 12 ** | 176 ± 27 * | 116 ± 42 | 0,5 | 346 ± 61 * | 875 ± 241 * | 657 ± 275 |
| 1 | 75 ± 37 | 686 ± 233 * | 241 ± 89 | 1 | 1130 ± 426 | 2075 ± 594 * | 3794 ± 3039 |

Die dazugehörige graphische Darstellung ist in Abb. 4.20 zu finden.

Anhang Tabelle 4:

Analyse des Einflusses der BKE-Behandlung auf die Stimulation verschiedener Kinasen beider Zelllinien

| | WT Zelllinie | | | | RAGE KO Zelllinie | |
|-------------|-------------------------------|----------------|--|-------------|-------------------------------|----------------|
| BKE [mg/ml] | [5 min] P-ERK ^{MAPK} | [10 min] P-AKT | | BKE [mg/ml] | [5 min] P-ERK ^{MAPK} | [10 min] P-AKT |
| 0 | 100 | 100 | | 0 | 100 | 100 |
| 0,1 | 145 ± 13 * | 101 ± 16 | | 0,1 | 101 ± 8 | 97 ± 21 |
| 0,3 | 225 ± 21 ** | 81 ± 6 * | | 0,3 | 117 ± 23 | 74 ± 11 |
| 1 | 391 ± 47 ** | 81 ± 13 | | 1 | 165 ± 28 ** | 67 ± 20 |
| 3 | 569 ± 69 ** | 72 ± 15 | | 3 | 266 ± 36 ** | 105 ± 38 |
| 10 | 729 ± 113 ** | 62 ± 21 | | 10 | 660 ± 212 * | 96 ± 33 |

| [60 min] | WT Zelllinie | | [60 min] | RAGE KO Zelllinie | | | |
|-------------|-----------------------|-----------------------|----------|-------------------|-----------------------|-----------------------|----------|
| BKE [mg/ml] | P-ERK ^{MAPK} | P-p38 ^{MAPK} | P-AKT | BKE [mg/ml] | P-ERK ^{MAPK} | P-p38 ^{MAPK} | P-AKT |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| 0,1 | 102 ± 22 | 142 ± 69 | 90 ± 16 | 0,1 | 211 ± 21 ** | 133 ± 25 | 109 ± 18 |
| 0,3 | 144 ± 41 | 218 ± 101 | 66 ± 14 | 0,3 | 246 ± 63 ** | 142 ± 42 | 71 ± 4 * |
| 1 | 248 ± 82 | 286 ± 61 * | 83 ± 15 | 1 | 336 ± 63 * | 138 ± 21 | 82 ± 24 |
| 3 | 530 ± 156 | 494 ± 61 ** | 137 ± 16 | 3 | 352 ± 67 * | 264 ± 103 | 56 ± 15 |
| 10 | 522 ± 114 * | 810 ± 169 * | 83 ± 11 | 10 | 430 ± 113 * | 399 ± 59 ** | 108 ± 44 |

Die dazugehörige graphische Darstellung ist in Abb. 4.21a zu finden.

Anhang Tabelle 5:**Analyse des Einflusses der BL-Behandlung auf die Stimulation verschiedener Kinasen beider Zelllinien**

| BL [mg/ml] | WT Zelllinie | |
|------------|----------------------------------|-------------------|
| | [5 min] P-ERK ^{MAPK} | [10 min] P-AKT |
| 0 | 100 | 100 |
| 0,1 | 145 ± 12 * | 70 ± 20 |
| 0,3 | 223 ± 37 * | 99 ± 38 |
| 1 | 237 ± 28 ** | 110 ± 39 |
| 3 | 273 ± 54 * | 92 ± 36 |
| 10 | 333 ± 33 ** | 139 ± 58 |

| BL [mg/ml] | RAGE KO Zelllinie | |
|------------|----------------------------------|-------------------|
| | [5 min] P-ERK ^{MAPK} | [10 min] P-AKT |
| 0 | 100 | 100 |
| 0,1 | 135 ± 16 * | 128 ± 32 |
| 0,3 | 131 ± 18 | 140 ± 49 |
| 1 | 175 ± 36 * | 133 ± 44 |
| 3 | 208 ± 46 * | 109 ± 22 |
| 10 | 312 ± 100 * | 123 ± 29 |

| [60 min] BL [mg/ml] | P-ERK ^{MAPK} | WT Zelllinie P-p38 ^{MAPK} | P-AKT |
|------------------------|-----------------------|---------------------------------------|----------|
| 0 | 100 | 100 | 100 |
| 0,1 | 216 ± 26 ** | 148 ± 18 * | 128 ± 15 |
| 0,3 | 231 ± 38 ** | 158 ± 35 | 108 ± 11 |
| 1 | 290 ± 71 * | 236 ± 58 * | 114 ± 20 |
| 3 | 389 ± 83 ** | 326 ± 75 * | 112 ± 22 |
| 10 | 594 ± 92 ** | 834 ± 105 ** | 139 ± 43 |

| [60 min] BL [mg/ml] | P-ERK ^{MAPK} | RAGE KO Zelllinie P-p38 ^{MAPK} | P-AKT |
|------------------------|-----------------------|--|----------|
| 0 | 100 | 100 | 100 |
| 0,1 | 131 ± 12 * | 160 ± 28 | 128 ± 32 |
| 0,3 | 143 ± 9 ** | 147 ± 19 * | 140 ± 49 |
| 1 | 211 ± 30 ** | 178 ± 20 ** | 133 ± 44 |
| 3 | 295 ± 76 * | 191 ± 22 * | 109 ± 22 |
| 10 | 395 ± 66 ** | 531 ± 164 * | 123 ± 29 |

Die dazugehörige graphische Darstellung ist in Abb. 4.21b zu finden.

Anhang Tabelle 6: Angabe der Referenzen zu den durch cDNA-Microarray ermittelten unterschiedlich exprimierten Genen bei Vergleich der WT vs. RAGE KO Zelllinie

| Genname | Kurzform Genname | vermehrte Expression | Exp. | Proliferation Wachstum | Apoptose | Referenzen |
|--|------------------|----------------------|------|------------------------|----------|---|
| Gene, assoziiert mit proliferativen Eigenschaften | | | | | | |
| insulin-like growth factor 2 | <i>Igf2</i> | WT | ↑ | ↑ | ↓ | [Liu, et al. 1996] |
| c-fos induced growth factor | <i>Figf</i> | WT | ↑ | ↑ | | [Orlandini, et al. 1996] |
| apoptosis inhibitor 1 | <i>Birc2</i> | WT | ↑ | | ↓ | [Reed, et al. 2003] |
| guanine nucleotide binding protein, alpha 12 + | <i>Gna12</i> | WT | ↑ | ↑ | | [Kumar, et al. 2004] |
| platelet-derived growth factor, C polypeptide | <i>Pdgfc</i> | WT | ↑ | ↑ | | [Reigstad, et al. 2003] |
| spindlin | <i>Spin</i> | WT | ↑ | ↑ | | [Gao, et al. 2005] |
| cell division cycle 2 homolog A | <i>Cdc2a</i> | RAGE KO | ↑ | ↑ | | [Berthet and Kaldis 2006] |
| secretogranin II | <i>Scg2</i> | RAGE KO | ↑ | ↑ | ↓ | [Kirchmair, et al. 2004] |
| cysteine rich protein 61 | <i>Cyr61</i> | RAGE KO | ↑ | ↑ | | [Kireeva, et al. 1997, Chen, et al. 2001] |
| inhibitor of DNA binding 4 | <i>Idb4</i> | RAGE KO | ↑ | ↑ | | [Zebedee and Hara 2001] |
| pEL98 protein | <i>S100a4</i> | RAGE KO | ↑ | ↑ | | [Fernandez-Fernandez, et al. 2005] |
| preproendothelin-1 | <i>Edn1</i> | RAGE KO | ↑ | ↑ | | [Cheng, et al. 2003] |
| Gene, assoziiert mit antiproliferativen Eigenschaften | | | | | | |
| receptor (calcitonin) activity modifying protein 2 | <i>Ramp2</i> | RAGE KO | ↑ | ↓ | | [Autelitano and Ridings 2001] |
| glypican 3 | <i>Gpc3</i> | RAGE KO | ↑ | ↓ | | [Neri, et al. 1998] |
| sphingomyelin phosphodiesterase 3, neutral | <i>Smpd3</i> | RAGE KO | ↑ | | ↑ | [Marchesini, et al. 2004] |
| novel ras effector 1 | <i>Nore1</i> | RAGE KO | ↑ | ↓ | | [Avruch, et al. 2006, Praskova, et al. 2004] |
| adrenomedullin | <i>Adm</i> | RAGE KO | ↑ | ↓ | | [Autelitano and Ridings 2001, Shichiri and Hirata 2003, Tsuruda, et al. 1999] |
| N-myc downstream regulated 1 | <i>Ndr1</i> | RAGE KO | ↑ | ↓ | | [Zhou, et al. 2001, Piquemal, et al. 1999] |
| embryonic epithelial gene 1 | <i>Eeg1</i> | RAGE KO | ↑ | ↓ | | [Aerbajinai, et al. 2004] |
| sprouty homolog 2 (Drosophila) | <i>Spry2</i> | RAGE KO | ↑ | ↓ | | [Gross, et al. 2001] |
| growth arrest specific 1 | <i>Gas1</i> | RAGE KO | ↑ | ↓ | | [Del Sal, et al. 1995, Seol, et al. 2005, Evdokiou and Cowled 1998] |
| death associated protein kinase 1 | <i>Dapk1</i> | WT | ↑ | ↓ | ↑ | [Raveh, et al. 2001] |
| phosphatase and tensin homolog | <i>Pten</i> | WT | ↑ | ↓ | | [Maehama 2007] |
| differential display and activated by p53 | <i>Dda3</i> | WT | ↑ | | ↑ | [Hsieh, et al. 2002] |
| leucine-rich and death domain containing | <i>Lrdd</i> | WT | ↑ | ↓ | ↑ | [Lin, et al. 2000, Tinel and Tschopp 2004] |

Referenzen:

- Liu Q, Yan H, Dawes NJ, Mottino GA, Frank JS, Zhu H. 1996. Insulin-like growth factor II induces DNA synthesis in fetal ventricular myocytes in vitro. *Circ Res* 79: 716-726.
- Orlandini M, Marconcini L, Ferruzzi R, Oliviero S. 1996. Identification of a c-fos-induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 11675-11680.
- Reed JC, Doctor K, Rojas A, Zapata JM, Stehlik C, Fiorentino L, Damiano J, Roth W, Matsuzawa S, Newman R, Takayama S, Marusawa H, Xu F, Salvesen G, Godzik A. 2003. Comparative analysis of apoptosis and inflammation genes of mice and humans. *Genome Res* 13: 1376-1388.
- Kumar RN, Radhakrishnan R, Ha JH, Dhanasekaran N. 2004. Proteome analysis of NIH3T3 cells transformed by activated Galpha12: regulation of leukemia-associated protein SET. *J Proteome Res* 3: 1177-1183.
- Reigstad LJ, Sande HM, Fluge O, Bruland O, Muga A, Varhaug JE, Martinez A, Lillehaug JR. 2003. Platelet-derived growth factor (PDGF)-C, a PDGF family member with a vascular endothelial growth factor-like structure. *J Biol Chem* 278: 17114-17120.
- Gao Y, Yue W, Zhang P, Li L, Xie X, Yuan H, Chen L, Liu D, Yan F, Pei X. 2005. Spindlin1, a novel nuclear protein with a role in the transformation of NIH3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 335: 343-350.
- Berthet C, Kaldis P. 2006. Cdk2 and Cdk4 cooperatively control the expression of Cdc2. *Cell Div* 1: 10.
- Kirchmair R, Gander R, Egger M, Hanley A, Silver M, Ritsch A, Murayama T, Kaneider N, Sturm W, Kearny M, Fischer-Colbrie R, Kircher B, Gaenger H, Wiedermann CJ, Ropper AH, Losordo DW, Patsch JR, Schratzberger P. 2004. The neuropeptide secretoneurin acts as a direct angiogenic cytokine in vitro and in vivo. *Circulation* 109: 777-783.
- Kireeva ML, Latinkic BV, Kolesnikova TV, Chen CC, Yang GP, Abler AS, Lau LF. 1997. Cyr61 and Fisp12 are both ECM-associated signaling molecules: activities, metabolism, and localization during development. *Exp Cell Res* 233: 63-77.
- Chen CC, Chen N, Lau LF. 2001. The angiogenic factors Cyr61 and connective tissue growth factor induce adhesive signaling in primary human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 276: 10443-10452.
- Zebedee Z, Hara E. 2001. Id proteins in cell cycle control and cellular senescence. *Oncogene* 20: 8317-8325.
- Fernandez-Fernandez MR, Veprintsev DB, Fersht AR. 2005. Proteins of the S100 family regulate the oligomerization of p53 tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 4735-4740.
- Cheng CM, Hong HJ, Liu JC, Shih NL, Juan SH, Loh SH, Chan P, Chen JJ, Cheng TH. 2003. Crucial role of extracellular signal-regulated kinase pathway in reactive oxygen species-mediated endothelin-1 gene expression induced by endothelin-1 in rat cardiac fibroblasts. *Mol Pharmacol* 63: 1002-1011.
- Autelitano DJ, Ridings R. 2001. Adrenomedullin signalling in cardiomyocytes is dependent upon CRLR and RAMP2 expression. *Peptides* 22: 1851-1857.
- Neri G, Gurrieri F, Zanni G, Lin A. 1998. Clinical and molecular aspects of the Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *Am J Med Genet* 79: 279-283.
- Marchesini N, Osta W, Bielawski J, Luberto C, Obeid LM, Hannun YA. 2004. Role for mammalian neutral sphingomyelinase 2 in confluence-induced growth arrest of MCF7 cells. *J Biol Chem* 279: 25101-25111.
- Avruch J, Praskova M, Ortiz-Vega S, Liu M, Zhang XF. 2006. Nore1 and RASSF1 regulation of cell proliferation and of the MST1/2 kinases. *Methods Enzymol* 407: 290-310.

- Praskova M, Khoklatchev A, Ortiz-Vega S, Avruch J. 2004. Regulation of the MST1 kinase by autophosphorylation, by the growth inhibitory proteins, RASSF1 and NORE1, and by Ras. *Biochem J* 381: 453-462.
- Shichiri M, Hirata Y. 2003. Regulation of cell growth and apoptosis by adrenomedullin. *Hypertens Res* 26 Suppl: S9-14.
- Tsuruda T, Kato J, Kitamura K, Kawamoto M, Kuwasako K, Imamura T, Koiwaya Y, Tsuji T, Kangawa K, Eto T. 1999. An autocrine or a paracrine role of adrenomedullin in modulating cardiac fibroblast growth. *Cardiovasc Res* 43: 958-967.
- Zhou RH, Kokame K, Tsukamoto Y, Yutani C, Kato H, Miyata T. 2001. Characterization of the human NDRG gene family: a newly identified member, NDRG4, is specifically expressed in brain and heart. *Genomics* 73: 86-97.
- Piquemal D, Joulia D, Balaguer P, Basset A, Marti J, Commes T. 1999. Differential expression of the RTP/Drg1/Ndr1 gene product in proliferating and growth arrested cells. *Biochim Biophys Acta* 1450: 364-373.
- Aerbajinai W, Lee YT, Wojda U, Barr VA, Miller JL. 2004. Cloning and characterization of a gene expressed during terminal differentiation that encodes a novel inhibitor of growth. *J Biol Chem* 279: 1916-1921.
- Gross I, Bassit B, Benezra M, Licht JD. 2001. Mammalian sprouty proteins inhibit cell growth and differentiation by preventing ras activation. *J Biol Chem* 276: 46460-46468.
- Del Sal G, Ruaro EM, Utrera R, Cole CN, Levine AJ, Schneider C. 1995. Gas1-induced growth suppression requires a transactivation-independent p53 function. *Mol Cell Biol* 15: 7152-7160.
- Seol MB, Bong JJ, Baik M. 2005. Expression profiles of apoptosis genes in mammary epithelial cells. *Mol Cells* 20: 97-104.
- Evdokiou A, Cowled PA. 1998. Growth-regulatory activity of the growth arrest-specific gene, GAS1, in NIH3T3 fibroblasts. *Exp Cell Res* 240: 359-367.
- Raveh T, Droguett G, Horwitz MS, DePinho RA, Kimchi A. 2001. DAP kinase activates a p19ARF/p53-mediated apoptotic checkpoint to suppress oncogenic transformation. *Nat Cell Biol* 3: 1-7.
- Maehama T. 2007. PTEN: its deregulation and tumorigenesis. *Biol Pharm Bull* 30: 1624-1627.
- Hsieh SC, Lo PK, Wang FF. 2002. Mouse DDA3 gene is a direct transcriptional target of p53 and p73. *Oncogene* 21: 3050-3057.
- Lin Y, Ma W, Benchimol S. 2000. Pidd, a new death-domain-containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis. *Nat Genet* 26: 122-127.
- Tinel A, Tschopp J. 2004. The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* 304: 843-846.

Anhang Tabelle 7: Angabe der Referenzen zu unterschiedlich pro-/antioxidativ exprimierten Genen bei Vergleich der WT Kontrollzellen vs. BL-behandelten WT Zellen

| | Genname | Kurzform Genname | vermehrte Expression | Referenzen |
|--|--------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|---|
| Gene, assoziiert mit prooxidativen Eigenschaften | | | | |
| NADPH-Oxidase | Cytochrome b-245, beta Polypeptid | <i>Gp91^{phox}</i> | BL | [Lassegue and Clempus 2003, Vignais 2002] |
| | NAD(P)H Oxidase 4 | <i>Nox4</i> | Kontrolle | [Rocic and Lucchesi 2005] |
| Xanthin-Oxidoreduktase | Xanthin-Dehydrogenase | <i>Xdh</i> | unverändert | [Berry and Hare 2004] |
| mitochondriale Atmungskette | Komplex I bis III | | unverändert | [Niedowicz and Daleke 2005] |
| NO-Synthasen | (Nos1 bis Nos3) | | nicht exprimiert | [Niedowicz and Daleke 2005] |
| Cytochrome P450 Monooxygenasen | | | unverändert | [Finkel and Holbrook 2000] |
| Lipoxygenasen | Arachidon-Lipoxygenase 3 | <i>Aloxe3</i> | unverändert | |
| Markergene des oxidativen Stresses | | | | |
| | Stress induziertes Protein | <i>Sip</i> | unverändert | [Tomasini, et al. 2001, Tomasini, et al. 2003] |
| | N-myc downstream regulated 1 | <i>Ndr1</i> | Kontrolle | [Lachat, et al. 2002] |
| | suppressor of lin-12 | <i>Sell</i> | Kontrolle | [Kaneko, et al. 2007] |
| Vanin-Genfamilie | Vanin-1 | <i>Vnn1</i> | BL | [Pitari, et al. 2000] |
| | Vanin-3 | <i>Vnn3</i> | BL | |
| Gene, assoziiert mit antioxidativen Eigenschaften | | | | |
| | Catalase | <i>Cat</i> | unverändert | [Scibior and Czczot 2006] |
| Superoxid-Dismutase Familie | Superoxid-Dismutase 1, zytosolisch | <i>Cu-Zn Sod</i> | unverändert | [Uriu-Adams and Keen 2005; Tanaka, et al. 2004] |
| | Superoxid-Dismutase 2, mitochondrial | <i>Mn-Sod</i> | BL | [Warner, et al. 1996] |
| | Superoxid-Dismutase 3, extrazellulär | <i>Ec-Sod</i> | unverändert | [Chen, et al. 1996] |
| Glutathion assoziierte Gene | γ -Glutamylcystein Synthetase | <i>Gss</i> | unverändert | [Winyard, et al. 2005] |
| | Glutathion-Reduktase 1 | <i>Gsr</i> | unverändert | |
| | Glutathion-Peroxidase 1 | <i>Gpx1</i> | unverändert | |
| | Glutathion-Peroxidase 4 | <i>Gpx4</i> | BL (tendenziell) | |
| | Glutathion-S Transferase, mu 1 | <i>Mgst1</i> | unverändert | [Zimniak 2008] |
| | Glutathion-S Transferase, mu 2 | <i>Mgst2</i> | unverändert | |
| | Glutathion-S Transferase, mu 3 | <i>Mgst3</i> | unverändert | |
| | Glutathion-S Transferase, omega 1 | <i>Gsto1</i> | unverändert | |
| Übergangsmetall-bindende Enzyme | Ceruloplasmin | <i>Cp</i> | BL | [Goldstein, et al. 1979; Fox, et al. 2000] |
| | Metallothionein-1 | <i>Mt1</i> | BL | [Feng, et al. 2005] |

| | | | | |
|------------------------------|---------------------------------|----------------|-------------------------|--|
| | Metallothionein-2 | <i>Mt2</i> | BL (tendenziell) | [Kang 1999] |
| | Heme Oxygenase 1 | <i>Hmox1</i> | unverändert | [Chen, et al. 2003] |
| | Haptoglobin | <i>Hp</i> | BL | [Faye, et al. 2007] |
| | | | | |
| Thioredoxin assoziierte Gene | Peroxiredoxin 1 | <i>Prdx1</i> | | [Winyard, et al. 2005, Yamawaki and Berk 2005] |
| | Peroxiredoxin 2 | <i>Prdx2</i> | | |
| | Peroxiredoxin 3 | <i>Prdx3</i> | | |
| | Peroxiredoxin 4 | <i>Prdx4</i> | unverändert | |
| | Thioredoxin Reduktase 1 | <i>Txnrd1</i> | unverändert | |
| | Thioredoxin Reduktase 2 | <i>Txnrd2</i> | unverändert | |
| | Thioredoxin bindendes Protein | <i>Txnip</i> | Kontrolle (tendenziell) | |
| | | | | |
| | Aldehyd Dehydrogenase Familie 3 | <i>Aldh3a1</i> | BL | [Lassen, et al. 2006] |

Referenzen:

Lassegue B, Clempus RE. 2003. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: R277-297.

Vignais PV. 2002. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 59: 1428-1459.

Rocic P, Lucchesi PA. 2005. NAD(P)H oxidases and TGF-beta-induced cardiac fibroblast differentiation: Nox-4 gets Smad. *Circ Res* 97: 850-852.

Berry CE, Hare JM. 2004. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol* 555: 589-606.

Niedowicz DM, Daleke DL. 2005. The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell Biochem Biophys* 43: 289-330.

Finkel T, Holbrook NJ. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239-247.

Tomasini R, Samir AA, Vaccaro MI, Pebusque MJ, Dagorn JC, Iovanna JL, Dusetti NJ. 2001. Molecular and functional characterization of the stress-induced protein (SIP) gene and its two transcripts generated by alternative splicing. SIP induced by stress and promotes cell death. *J Biol Chem* 276: 44185-44192.

Tomasini R, Samir AA, Carrier A, Isnardon D, Cecchinelli B, Soddu S, Malissen B, Dagorn JC, Iovanna JL, Dusetti NJ. 2003. TP53INP1s and homeodomain-interacting protein kinase-2 (HIPK2) are partners in regulating p53 activity. *J Biol Chem* 278: 37722-37729.

Lachat P, Shaw P, Gebhard S, van Belzen N, Chaubert P, Bosman FT. 2002. Expression of NDRG1, a differentiation-related gene, in human tissues. *Histochem Cell Biol* 118: 399-408.

Kaneko M, Yasui S, Niinuma Y, Arai K, Omura T, Okuma Y, Nomura Y. 2007. A different pathway in the endoplasmic reticulum stress-induced expression of human HRD1 and SEL1 genes. *FEBS Lett* 581: 5355-5360.

Pitari G, Malergue F, Martin F, Philippe JM, Massucci MT, Chabret C, Maras B, Dupre S, Naquet P, Galland F. 2000. Pantetheinase activity of membrane-bound Vanin-1: lack of free cysteamine in tissues of Vanin-1 deficient mice. *FEBS Lett* 483: 149-154.

- Scibior D, Czczot H. 2006. [Catalase: structure, properties, functions]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 60: 170-180.
- Uriu-Adams JY, Keen CL. 2005. Copper, oxidative stress, and human health. *Mol Aspects Med* 26: 268-298.
- Tanaka M, Mokhtari GK, Terry RD, Balsam LB, Lee KH, Kofidis T, Tsao PS, Robbins RC. 2004. Overexpression of human copper/zinc superoxide dismutase (SOD1) suppresses ischemia-reperfusion injury and subsequent development of graft coronary artery disease in murine cardiac grafts. *Circulation* 110: II200-206.
- Warner BB, Stuart L, Gebb S, Wispe JR. 1996. Redox regulation of manganese superoxide dismutase. *Am J Physiol* 271: L150-158.
- Chen EP, Bittner HB, Davis RD, Folz RJ, Van Trigt P. 1996. Extracellular superoxide dismutase transgene overexpression preserves postischemic myocardial function in isolated murine hearts. *Circulation* 94: II412-417.
- Winyard PG, Moody CJ, Jacob C. 2005. Oxidative activation of antioxidant defence. *Trends Biochem Sci* 30: 453-461.
- Zimniak P. 2008. Detoxification reactions: Relevance to aging. *Ageing Res Rev*.
- Goldstein IM, Kaplan HB, Edelson HS, Weissmann G. 1979. Ceruloplasmin. A scavenger of superoxide anion radicals. *J Biol Chem* 254: 4040-4045.
- Fox PL, Mazumder B, Ehrenwald E, Mukhopadhyay CK. 2000. Ceruloplasmin and cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med* 28: 1735-1744.
- Feng W, Benz FW, Cai J, Pierce WM, Kang YJ. 2005. Metallothionein disulfides are present in metallothionein-overexpressing transgenic mouse heart and increase under conditions of oxidative stress. *J Biol Chem*.
- Kang YJ. 1999. The antioxidant function of metallothionein in the heart. *Proc Soc Exp Biol Med* 222: 263-273.
- Chen YH, Yet SF, Perrella MA. 2003. Role of heme oxygenase-1 in the regulation of blood pressure and cardiac function. *Exp Biol Med (Maywood)* 228: 447-453.
- Faye A, Ramey G, Foretz M, Vaulont S. 2007. Haptoglobin is degraded by iron in C57BL/6 mice: a possible link with endoplasmic reticulum stress. *Blood Cells Mol Dis* 39: 229-237.
- Yamawaki H, Berk BC. 2005. Thioredoxin: a multifunctional antioxidant enzyme in kidney, heart and vessels. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 14: 149-153.
- Lassen N, Pappa A, Black WJ, Jester JV, Day BJ, Min E, Vasiliou V. 2006. Antioxidant function of corneal ALDH3A1 in cultured stromal fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 41: 1459-1469.

Danksagung

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich während der praktischen Arbeit und Erstellung dieser Dissertation unterstützt haben.

Zuerst gilt mein Dank Herrn Prof. Behrens, welcher mich als „Waisenkind“ an der naturwissenschaftlichen Fakultät I aufgenommen hat und für seine Betreuung und Unterstützung bei der Eröffnung und der Durchführung des Promotionsverfahrens.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Silber für die Möglichkeit diese interessante Promotion in der Abteilung der Herz- und Thorax Chirurgie des Klinikums Kröllwitzs, unter der Leitung von Herrn HD Dr. Andreas Simm, anzufertigen.

Herrn HD Dr. Simm danke ich für die Vergabe und Betreuung dieser interessanten Arbeit sowie über die anregenden und ausführlichen Diskussionen und sein fortwährendes Interesse am Voranschreiten der Dissertation.

Für die Kooperation und die Bereitstellung der Nahrungsmittelextrakte möchte ich mich bei Frau PD Dr. Veronika Somoza (Stellvertretende Direktorin der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching) bedanken, ohne sie jene interessanten Ergebnisse nicht existieren würden.

Weiterhin möchte ich den Postdocs Norbert Nass und Torsten Gursinsky für Ihre theoretische und praktische Unterstützung während meiner Promotion danken.

Herrn PD Dr. Brömme danke ich für die detaillierte Einarbeitung in die ESR-Spektroskopie sowie für die Unterstützung bei der kritischen Auswertung der Ergebnisse.

Mein weiterer Dank gilt allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern des Labors der Herz- und Thorax Chirurgie für die freundliche Atmosphäre im Labor. Ganz besonders möchte ich hierbei bei Grit Rehbein und Simone Kahrstedt bedanken, die mich unterstützt haben mich am Ende der Promotion zweizuteilen.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Gekle sowie meiner neuen Arbeitsgruppe, die geduldig das Ende dieser Promotion abwarteten und mir jede Unterstützung zu Teil werden ließen.

Abschließend möchte ich meinen Eltern und meinem Mann ein großes Dankeschön für Ihre Geduld, das aufgebrachte Verständnis für meine Unruhe und Sinnkrisen während der Endphase der Dissertation, das Korrekturlesen und die seelische wie moralische Unterstützung während meiner doch vierjährigen Promotion danken. Ohne diese Hilfen und Unterstützungen hätte ich bestimmt nicht durchgehalten. Vielen Dank!

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt zu haben. Die wörtlich oder inhaltlich aus veröffentlichten Schriften entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Stefanie Ruhs

Halle, Juli 2008

Lebenslauf

Name: Stefanie Ruhs
geboren: am 29.05.1980, in Halle/Saale
Staatsangehörigkeit: deutsch
Wohnort: Adam-Kuckhoff-Straße 21
06108 Halle/Saale

Werdegang

Sep. 1986 - Juni 1991 Oberschule Heinrich Heine
Aug. 1991 - Juli 1998 Südstadt-Gymnasium Halle/Saale
Abschluss: Abitur, 1998

Okt. 1998 - Okt. 2003 Studium der Biochemie an der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Abschluss: Diplom-Biochemikerin, 2003

Dez. 2002 - Sep.2003 Diplomarbeit am Institut für Pathophysiologie
Prof. Dr. Jürgen Holtz
Medizinische Fakultät
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Okt.2003 - März 2003 Mitarbeiterin am Institut der Herz-Thorax-Chirurgie

April 2004 - Feb.2008 Promotion am Institut der Herz-Thorax-Chirurgie
HD Dr. Andreas Simm
Medizinische Fakultät
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Juli 2004 - Dez.2006 Graduiertenstipendium

seit März 2008 wissenschaftliche Mitarbeiterin
Julius-Bernstein-Institut für Physiologie
Medizinische Fakultät
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Publikationen

Ruhs S, Nass N, Somoza V, Friess U, Schinzel R, Silber RE, Simm A

“Maillard reaction products enriched food extract reduce the expression of myofibroblast phenotype markers”

Mol Nutr. Food Res. 2007 Apr; 51 (4): 488-95

Gursinsky T, **Ruhs S**, Friess U, Diabate S, Krug HF, Silber RE, Simm A

“Air pollution – associated fly ash particles induce fibrotic mechanisms in primary fibroblasts”

Biol Chem. 2006 Oct - Nov; 387 (10-11):1411-20

Kongressbeiträge

März 2007

wissenschaftlicher Kongress der DGE (Deutsche Gesellschaft für Ernährung)

„Präkonditionierung mit Brotkrustenextrakt - einem „Advanced Glycation Endproduct“-reichem Modellnahrungsmittel - schützt kardiale Fibroblasten vor oxidativem Stress“

Juni 2006

3. Treffen des wissenschaftlichen Nachwuchses der Studiengruppe Biochemische Pharmakologie und Toxikologie des Wissenschaftszentrums der Universität Ulm

“Food-AGEs can protect cardiac fibroblasts against oxidative stress by preconditioning“

Posterpräsentation

Halle, 2005

Cardiovascular Ageing (Alterskongress)

Gursinsky T, **Ruhs S**, Friess U, Diabate S, Krug HF, Silber RE, Simm A

“Induction of fibrotic mechanisms and advanced glycation endproducts by fly ash particles in cardiac fibroblasts”

Halle, 2005

Cardiovascular Ageing (Alterskongress)

Ruhs S, Nass N, Somoza V, Silber RE, Simm A

“Preconditioning with Maillard-products enriched food extracts protects cardiac fibroblasts against oxidative stress”