

Identifizierung einer bioaktiven Komponente in der Brotkruste

Dissertation

Zur Erlangung des

Doktorgrades der Ernährungswissenschaften (Dr. troph.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät III

Agrar- und Ernährungswissenschaften,

Geowissenschaften und Informatik

Der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Vorgelegt von

Frau Sandy Katzberg, geb. Pöttsch

geboren am 28.02.1985 in Lutherstadt Wittenberg

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Simm

Prof. Dr. Gabriele Stangl

Prof. Dr. Veronika Somoza

Datum der Verteidigung: 30.01.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis.....	11
Abbildungsverzeichnis	12
1 Einleitung	14
1.1 Glykierungsendprodukte	14
1.1.1 Entstehung der Maillard-Reaktion	14
1.1.2 Metabolisierung.....	16
1.1.3 Signaltransduktionsmechanismen.....	17
1.1.3.1 Rezeptorvermittelte Wirkung	17
1.1.3.2 Oxidativer Stress.....	19
1.1.3.3 Detoxifizierung.....	20
1.1.4 Potentielle gesundheitliche Wirkung von MRPs	20
1.2 Getreideproteine	21
1.2.1 Nicht-Kleberproteine.....	23
1.2.2 Kleberproteine	23
1.3 Die Brotherstellung	24
1.3.1 Die Teigbereitung und -aufbereitung.....	24
1.3.2 Der Backprozess.....	25
1.4 Zielsetzung der Arbeit	26
2 Material.....	28
2.1 Chemikalien	28
2.2 Materialien	29
2.3 Kits und Größenmarker.....	29
2.4 Geräte.....	30
2.5 Software	30
3 Methoden	31
3.1 Herstellung des Nahrungsmittlextraktes und der Referenzproteine	31
3.1.1 Herstellung des löslichen Brotkrustenextraktes.....	31
3.1.2 Herstellung von AGE-BSA und AGE-Gliadin	31

3.2	Zellbiologische Methoden.....	32
3.2.1	Zellkulturtechniken.....	32
3.2.1.1	humane embryonale Nierenzellen (NF- κ B/293/GFP-Luc TM -Zellen).....	32
3.2.1.1.1	Einfrieren und Auftauen der Zellen	32
3.2.1.1.2	Kultivierung der Zellen.....	32
3.2.1.2	humane T-Zellen (NF- κ B/Jurkat/GFP-Luc TM -Zellen).....	33
3.2.1.2.1	Einfrieren und Auftauen der Zellen	33
3.2.1.2.2	Kultivierung der Zellen.....	33
3.2.1.3	murine Makrophagen (RAW/NF- κ B/SEAPorter TM -Zellen).....	33
3.2.1.3.1	Einfrieren und Auftauen der Zellen	34
3.2.1.3.2	Kultivierung der Zellen.....	34
3.2.2	Zellbasierte Experimente.....	34
3.2.2.1	Durchflusszytometrie	34
3.2.2.2	SEAPorter TM -Assay Kit.....	35
3.3	Aufreinigung des Nahrungsmittlextraktes.....	35
3.3.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	35
3.3.2	Festphasenextraktion (<i>Solid-Phase Extraction</i>)	37
3.3.3	TCA-Fällung	37
3.3.4	Boronsäuren-Affinitäts-Chromatographie.....	37
3.3.5	Immunopräzipitation	39
3.4	Analytische Methoden.....	39
3.4.1	Herstellung von Proteinlysaten	39
3.4.2	Proteinbestimmung.....	39
3.4.3	Fluoreszenzmessung AGE-modifizierter Proteine	40
3.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	40
3.4.5	Coomassie Färbung.....	41
3.4.6	Western Blot und Immunodetektion	42
3.4.7	Strippen von PVDF-Membranen.....	43
3.4.8	Spot-Blot-Methode (Vakuum-Blot-System).....	44
3.4.9	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR)	45
3.4.10	Aminosäurenanalyse.....	46
3.4.11	Proteinidentifizierung mittels LC-MS/MS.....	47
3.4.12	Nachweis von AGEs mittels HPLC-MS/MS	48

3.5	Molekularbiologische Methoden	48
3.5.1	RNA-Isolierung.....	48
3.5.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	48
3.5.3	Reverse Transkription	49
3.5.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	49
3.6	Statistik.....	51
4	Ergebnisse.....	52
4.1	Charakterisierung des Brotkrustenextraktes	52
4.1.1	Proteinidentifizierung mittels LC-MS/MS und Aminosäurenanalyse.....	53
4.1.2	Nachweis von Gliadin im Brotkrustenextrakt	54
4.1.3	Nachweis von AGE-Modifikationen im Brotkrustenextrakt.....	55
4.2	Wirkung des löslichen Brotkrustenextraktes auf die NF- κ B-Aktivierung in verschiedenen Zellmodellen.....	57
4.2.1	Einfluss des Brotkrustenextraktes auf die NF- κ B-Aktivierung in NF- κ B/293/GFP- Luc TM -Zellen	57
4.2.2	Einfluss des Brotkrustenextraktes auf die NF- κ B-Aktivierung in NF- κ B/Jurkat/GFP- Luc TM -Zellen	58
4.2.3	Einfluss des Brotkrustenextraktes auf die NF- κ B-Aktivierung in RAW/NF- κ B/SEAPorter TM -Zellen	59
4.2.3.1	Einfluss des Brotkrustenextraktes auf die Phosphorylierung der ERK-2- MAPKinase	60
4.2.3.2	Einfluss des Brotkrustenextraktes auf die Phosphorylierung der p38- MAPKinase	61
4.3	Chromatographische Auftrennung des löslichen Brotkrustenextraktes mittels RP- HPLC	62
4.3.1	Charakterisierung der chromatographisch aufgetrennten Brotkrustenextrakt- Fraktionen.....	62
4.3.1.1	Nachweis von Gliadin in den aufkonzentrierten BCE-Fraktionen.....	63
4.3.1.2	Nachweis von AGE-Modifikationen in den aufkonzentrierten BCE-Fraktionen	64
4.3.2	Einfluss der aufkonzentrierten BCE-Fraktionen auf die NF- κ B-Aktivierung in RAW/NF- κ B/SEAPorter TM -Zellen	66
4.4	Immunpräzipitation	67
4.4.1	Isolierung von Gliadin aus dem Brotkrustenextrakt.....	67
4.4.2	Einfluss der Gliadin-freien BCE-Fraktion auf die NF- κ B-Aktivierung in RAW/NF- κ B/SEAPorter TM -Zellen	68

4.4.3	Einfluss der Gliadin-freien BCE-Fraktion auf die MnSOD-mRNA-Konzentration	70
4.4.4	Einfluss der Gliadin-freien BCE-Fraktion auf die mRNA-Konzentration von NQO-1, GSTM-1 und HO-1	71
4.4.5	Einfluss der Gliadin-freien BCE-Fraktion auf die mRNA-Konzentrationen von AGE-spezifischen Rezeptoren	72
4.5	AGE-Gliadin als Referenzprotein.....	74
4.5.1	Einfluss von AGE-Gliadin auf die NF- κ B-Aktivierung in RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen.....	75
4.5.1.1	Einfluss von AGE-Gliadin auf die Phosphorylierung der ERK-2-MAPKinase...	76
4.5.1.2	Einfluss von AGE-Gliadin auf die Phosphorylierung der p38-MAPKinase.....	77
4.5.2	Einfluss von AGE-Gliadin auf die MnSOD-mRNA-Konzentration.....	78
4.5.3	Einfluss von AGE-Gliadin auf die mRNA-Konzentration von NQO-1, GSTM-1 und HO-1	79
4.5.4	Einfluss von AGE-Gliadin auf die mRNA-Konzentration von AGE-spezifischen Rezeptoren	80
5	Diskussion.....	82
5.1	Charakterisierung der löslichen Brotkruste	82
5.1.1	Antioxidative und chemopreventive Wirkung der Brotkruste	83
5.1.2	Einfluss der Brotkruste auf die AGE-spezifischen Rezeptoren	84
5.2	Identifizierung von Gliadin als bioaktive Komponente	85
5.2.1	Antioxidative und chemopräventive Wirkung der Prolamine	86
5.2.2	Einfluss des Gliadins auf die AGE-spezifischen Rezeptoren	87
5.3	Einfluss der Maillard Reaktion auf die Bioaktivität der Prolamine	88
5.3.1	Chemopräventive und antioxidative Wirkung von AGE-Gliadin	89
5.3.2	Einfluss von AGE-Gliadin auf die AGE-spezifischen Rezeptoren.....	91
5.4	Gibt es Unterschiede zwischen den verschiedenen Brotsorten?	93
5.5	Klinische Relevanz einer möglichen Brotkrustendiät	96
6	Zusammenfassung.....	98
7	Literaturverzeichnis	100
8	Anhang.....	110
8.1	Genspezifische Primersequenzen für die RT-PCR.....	110
8.2	Nachweis von AGE-Modifikationen in AGE-BSA	111
8.3	Einfluss von AGE-BSA auf die NF- κ B-Aktivierung in RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen	

8.4 Einfluss von AGE-BSA auf die Phosphorylierung der ERK-2- und p38-MAPKinase	.113
Danksagung115
Eidesstattliche Erklärung / Declaration under Oath116
Lebenslauf117
Publikationsverzeichnis119

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AGE	<i>Advanced glycation end products</i>
AGE-BSA	glykiertes BSA
AGE-Gliadin	glykiertes Gliadin
AGE-R1	<i>Advanced glycation end product receptor 1</i>
AGE-R2	<i>Advanced glycation end product receptor 2</i>
AGE-R3	<i>Advanced glycation end product receptor 3</i>
AP-1	Aktivator-protein 1
ARE	<i>Antioxidant response element</i>
BAC	Boronsäure-Affinitätschromatographie
BCA	Bicinchoninsäure
BCE	Brotkrustenextrakt
BSA	<i>Bovine serume albumine</i>
C ₂ H ₃ NaO ₂	Natriumacetat
CD36	<i>Platelet glycoprotein 4</i>
cDNA	Komplementäre DNA
CEA	N-ε-Carboxyethylarginin
CEL	N-ε-Carboxyethyllysin
CML	N-ε-Carboxymethyllysin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cov (%)	prozentuale Wiederfindungsrate
Cu ⁺	Einwertiges Kupferion
Cu ²⁺	Zweiwertiges Kupferion
DAD	Diodenarray-Detektor
deam.	deamidiert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphat
DPPH	2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EpRE	<i>Electrophile response element</i>
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinases
FCS	Fötale Kälberserum
FLD	Fluoreszenzdetektor
FTIR	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie
G	Glyoxal
G418	Geneticin
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GSH	Glutathion
GST	Glutathione-S-Transferase
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Hb	Hämoglobin
HCL	Salzsäure
HEK Zellen	Humane embryonale Nieren-Zellen
HMGB1	<i>High mobility group box protein 1</i>

HMW-GS	<i>High molecular weight</i> -Glutenin-Untereinheit
H-NMR	Nuclear Magnetic Resonance
HO-1	Hämoxygenase-1
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	<i>horseradish</i> (Meerrettichperoxidase)
IgE	Immunglobuline E
I κ B	Inhibitor von kappa B
IL-1 α	Interleukin-1 α
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
iNOS	Inducible nitric oxide synthases
INT- γ	Interferon- γ
IP	Immunopräzipitation
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
kDa	Kilo Dalton
Keap1	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
LC-MS/MS	Flüssigkeits-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie
LPS	Lipopolysaccharid
LU	Fluoreszenzeinheit
M	molar
mAU	milli Absorptionseinheit
mCMV	Mouse Cytomegalovirus
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein 1
MCT	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
MG	Methylglyoxal
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MG-H1	Methylglyoxyl-Hydroimidazoln 1
mM	millimolar
MRP	Maillard-Reaktionsprodukt
MW	Mittelwert
ng	Nanogramm
NK	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
Nrf-2	<i>Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>
NQO-1	NAD(P)H-Dehydrogenase-1
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NO	Stickstoffmonoxid
ONOO ⁻	Peroxyradikal
p38 MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
PBMCs	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pen/Strep	Penicillium/Streptomycin
pERK	Phosphorylierte Form der pERK1/2-MAPKinase
PITC	Phenylisothiocyanat
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNPP	para-Nitrophenylphosphat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
p ₂₁ Ras	<i>Ras</i> GTPase activating protein
p-p38	Phosphorylierte Form der p38-MAPKinase
RAGE	<i>Receptor for advanced glycation end products</i>

RIPA	<i>Radio-Immunoprecipitation Assay buffer</i>
RP	Reverse Phase
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezien
S100	Calcium-bindendes Protein 100
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEAP	sezernierte embryonale alkaline phosphatase
SEM	Standardfehler
SOD	Superoxid-Dismutase
SPE	Festphasenextraktion
T	Tonne
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Triethylamin
TEAC	<i>Trolox Equivalent Antioxidative Capacity</i>
TFA	Trifluoressigsäure
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
THP	Tetrahydropyrimidin
UPS	Ubiquitin-Proteasome-System
UV	Ultraviolettstrahlung
3-DG	3-Deoxyglucosone

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Laufbedingungen zur Auftrennung der Brotkruste mittels RP-HPLC.....	36
Tabelle 2: zeitliche Übersicht der gesammelten Fraktionen der Brotkruste mittels RP-HPLC	37
Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Trenn- und Sammelgele in der SDS-PAGE.....	41
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten primären und sekundären Antikörper	44
Tabelle 5: Übersicht der spezifischen Schwingungen zur Proteinstrukturaufklärung mittels FTIR	46
Tabelle 6: Übersicht der Laufbedingungen für die Aminosäurenanalyse	47
Tabelle 7: Übersicht des Gradienten für die Aminosäurenanalyse.....	47
Tabelle 8: Zusammensetzung des RT-PCR Mixes für einen Reaktionsansatz	49
Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Reagenzien für einen PCR-Ansatz.....	50
Tabelle 10: Ergebnisse der Aminosäurenanalyse des löslichen Brotkrustenextraktes.....	54
Tabelle 11: Proteinverteilung (%) auf die Osborne-Fraktionen ausgewählter Getreideprodukte	95
Tabelle A12: Genspezifische Primersequenzen mit spezifischer Annealing-Temperatur (TA) und Zyklenzahl.....	110

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Übersicht zur Bildung von Advanced glycation end products.....	15
Abbildung 2: Signaltransduktionswege durch Bindung von AGEs an RAGE.....	18
Abbildung 3: Zusammensetzung der Getreideproteine am Beispiel von Weizen und Roggen	22
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Bindung von AGE-modifizierten Proteinen an Boronsäure-gekoppelter Agarose.....	38
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Semi-dry-Verfahrens.....	42
Abbildung 6: FTIR-Spektrum des Brotkrustenextraktes verglichen zum Referenzprotein Gliadin	52
Abbildung 7: Proteinidentifizierung des Brotkrustenextraktes und des Eluats der BAC mittels LC-MS/MS	53
Abbildung 8: Immunodetektion von Gliadin im Brotkrustenextrakt	55
Abbildung 9: Nachweis von AGE-Modifikationen im Brotkrustenextrakt.....	56
Abbildung 10: NF- κ B-Aktivierung der NF- κ B/293/GFP-Luc TM -Zellen nach Stimulation mit dem Brotkrustenextrakt.....	58
Abbildung 11: NF- κ B-Aktivierung in NF- κ B/Jurkat/GFP-Luc TM -Zellen nach Stimulation mit dem Brotkrustenextrakt.....	59
Abbildung 12: NF- κ B-Aktivierung in RAW/NF- κ B/SEAPorter TM -Zellen nach Stimulation mit dem Brotkrustenextrakt.....	60
Abbildung 13: Einfluss des Brotkrustenextraktes auf die Phosphorylierung der ERK-2-MAPKinase	61
Abbildung 14: Einfluss des Brotkrustenextraktes auf die Phosphorylierung der p38-MAPKinase	62
Abbildung 15: Proteinbestimmung und Fluoreszenzmessung der chromatographisch aufgetrennten Brotkrustenextrakt-Fractionen	63
Abbildung 16: Bestimmung der relativen Menge an Gliadin in den aufkonzentrierten BCE- Fraktionen	64
Abbildung 17: Fluoreszenzmessung der aufkonzentrierten BCE-Fractionen.....	65
Abbildung 18: Bestimmung der relativen Menge an AGE-Modifikationen in den aufkonzentrierten BCE-Fractionen.....	66
Abbildung 19: NF- κ B-Aktivierung in RAW/NF- κ B/SEAPorter TM -Zellen nach Stimulation mit den aufkonzentrierten BCE-Fractionen	67

Abbildung 20: Nachweis von CML-Modifikationen in den IP-Fractionen	68
Abbildung 21: NF- κ B-Aktivierung in RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen nach Stimulation mit den IP-Überständen des Brotkrustenextraktes und des Fruktose-Gliadins	69
Abbildung 22: Fluoreszenzmessung des IP-Überstandes des Brotkrustenextraktes	70
Abbildung 23: Einfluss des Brotkrustenextraktes und der Gliadin-freien BCE-Fraktion auf die MnSOD-mRNA-Konzentration	71
Abbildung 24: Einfluss des Brotkrustenextraktes und der Gliadin-freien BCE-Fraktion auf die mRNA-Konzentration von NQO-1, GSTM-1 und HO-1	72
Abbildung 25: Einfluss des Brotkrustenextraktes und der Gliadin-freien BCE-Fraktion auf die mRNA-Konzentration von AGE-spezifischen Rezeptoren	73
Abbildung 26: Fluoreszenzmessung von AGE-Gliadin	74
Abbildung 27: Nachweis von AGE-Modifikationen von AGE-Gliadin	75
Abbildung 28: NF- κ B-Aktivierung in RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen nach Stimulation mit AGE-Gliadin.....	76
Abbildung 29: Einfluss von AGE-Gliadin auf die Phosphorylierung der ERK-2-MAPKinase	77
Abbildung 30: Einfluss von AGE-Gliadin auf die Phosphorylierung der p38-MAPKinase	78
Abbildung 31: Einfluss von AGE-Gliadin auf die MnSOD-mRNA-Konzentration.....	79
Abbildung 32: Einfluss von AGE-Gliadin auf die mRNA-Konzentration von NQO-1, GSTM-1 und HO-1	80
Abbildung 33: Einfluss von AGE-Gliadin auf die mRNA-Konzentration von AGE-spezifischen Rezeptoren	81
Abbildung 34: Schematische Darstellung des Signaltransduktionsweges von AGE-Gliadin durch Bindung an AGE-spezifische Rezeptoren	93
Abbildung 35: Fluoreszenzmessung von AGE-BSA.....	111
Abbildung 36: Nachweis von AGE-Modifikationen von AGE-BSA mittels Immunodetektion	112
Abbildung 37: NF- κ B-Aktivierung in RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen nach Stimulation mit AGE-BSA.....	113
Abbildung 38: Einfluss von AGE-BSA auf die Phosphorylierung der ERK-2 und p38- MAPKinasen.....	114

1 Einleitung

1.1 Glykierungsendprodukte

Zu Anfang der Entdeckung der Maillard-Reaktion wurde der Begriff der *Advanced glycation endproducts* (AGEs) vorwiegend für Substanzen benutzt, die eine gelb-braun fluoreszierende Farbe aufwiesen (Bierhaus et al. 1998). Heutzutage stellen die Glykierungsendprodukte eine heterogene Gruppe von Verbindungen mit verschiedenen chemischen Eigenschaften dar, die sowohl endogen als auch exogen gebildet werden. Als Abgrenzung zum Entstehungsort werden in der vorliegenden Arbeit die mit der Nahrung aufgenommenen Glykierungsendprodukte als Maillard-Reaktionsprodukte (MRPs) bezeichnet. Die endogenen und *in vitro* gebildeten Glykierungsendprodukte werden als AGEs gekennzeichnet.

1.1.1 Entstehung der Maillard-Reaktion

Die Maillard-Reaktion wurde das erste Mal 1912 durch den französischen Chemiker L. C. Maillard beschrieben und stellt eine nicht-enzymatische Reaktion zwischen Carbonylverbindungen und Aminogruppen dar (Bastos und Monaro 2012). Die Maillard-Reaktion lässt sich in drei wesentliche Stufen einteilen (Henle 2005; Assar et al. 2009). In der Anfangsphase reagiert eine Aminosäure, ein Peptid oder Protein mit einem reduzierenden Zucker (Abbildung 1). Durch eine nukleophile Addition entsteht zwischen der freien Aminogruppe einer Aminosäure und der Carbonylgruppe des reduzierenden Zuckers eine Schiff'sche Base (Sell 1997; Thornalley et al. 1999; Ahmed et al. 2002; Tuohy et al. 2006; Krantz 2010; Uribarri et al. 2010). Anschließend findet eine reversible Umlagerung der Schiff'schen Base zum Amadori-Produkt statt (Bastos und Monaro 2012). Bedeutendster Vertreter der Amadori-Produkte stellt das Fructoselysin dar (Krantz 2010). Im zweiten Schritt kommt es durch erneute Umlagerungen und Degradationsschritten zur Entstehung von 1,2-Dicarbonylen bzw. reaktiven α -Oxoaldehyden, wie z.B. Methylglyoxal (MG), Glyoxal (G), 3-Deoxyglucoson (3-DG) und Glycolaldehyd (Hodge 1953; Ahmed et al. 2002; Henle 2005; Tuohy et al. 2006; Grillo und Colombatto 2008). Dabei stellen 1,2-Dicarbonyle wichtige Vorstufen sowohl für die Bildung von niedrig-molekularen heterozyklischen Komponenten (wichtige Aromastoffe in verschiedenen Lebensmitteln), als auch für die Entstehung von fortschreitenden Endprodukten der Maillard-Reaktion dar (Henle 2005; Grillo und Colombatto 2008). Aufgrund der Reaktion zwischen 1,2-Dicarbonylen und weiteren freien Aminogruppen von Aminosäuren, Peptiden, Proteinen oder Nukleinsäuren werden in der fortschreitenden Phase der Maillard-Reaktion irreversibel AGEs gebildet (Henle 2005). Vor allem Lysyl-, Arginyl- und Cysteinreste von Peptiden oder Proteinen weisen eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit auf (Henle 2005; Grillo und Colombatto 2008; Krantz 2010; Sena et al. 2012). Aber auch freie Aminogruppen von Tryptophan,

Histidin und Prolin können mit reduzierenden Zuckern nicht-enzymatisch reagieren (Münch et al. 1999).

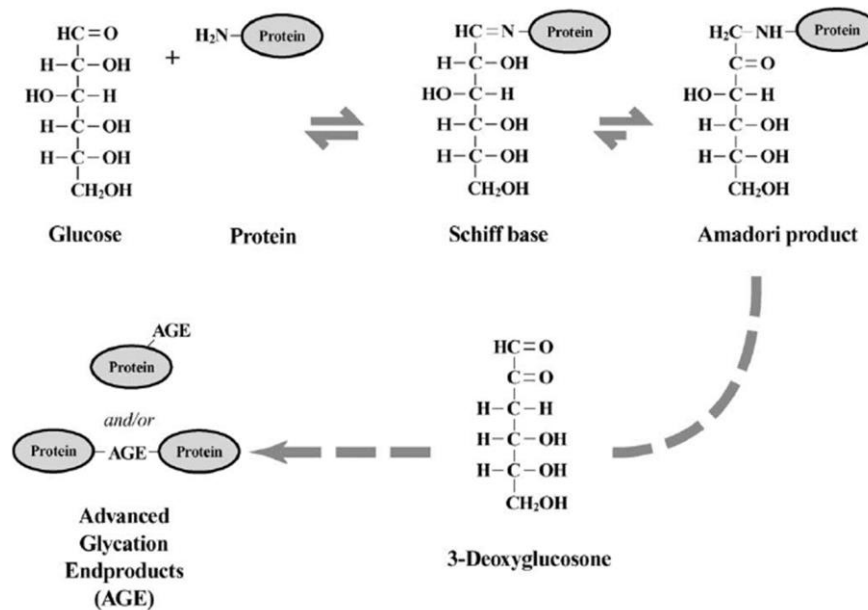


Abbildung 1: Schematische Übersicht zur Bildung von *Advanced glycation end products* (Ahmed 2005)

Die endogene Bildung von AGEs findet in allen Geweben und Körperflüssigkeiten unter physiologischen Bedingungen statt. Während des normalen Alterungsprozesses unterliegen viele Proteine, wie z.B. das Kollagen in der Haut oder Augenkristalline, einer nicht-enzymatischen Reaktion. Diese akkumulieren mit der Zeit und fördern die Entstehung weiterer AGEs. Die Entstehung altersbedingter Erkrankungen, wie z.B. Diabetes Mellitus, ist AGE-assoziiert (Brownlee 1984; Morales und Babbel 2002; Uribarri et al. 2007; Assar et al. 2009; Bastos und Monaro 2012; Sena et al. 2012).

In der Lebensmittelherstellung spielt die Maillard-Reaktion eine entscheidende Rolle, da sie für die Bildung von Aroma, Geruchsstoffen, Farbe, Geschmack und Textur eines Lebensmittels verantwortlich ist (Bastos und Monaro 2012; Poulsen et al. 2013). So ist z.B. im Zuge der Brotherstellung die charakteristische Braunfärbung eines Lebensmittels aufgrund der Maillard-Reaktion erwünscht und bei der Lagerung von Orangensaft unerwünscht (Bastos und Monaro 2012). In Prolin-reichen Lebensmitteln, wie dem Brot, kommt es durch die Maillard-Reaktion an den Aminosäuren Prolin und Ornithin zur Bildung von 2-Acetyltetrahydropyridin und 2-Acetyl-1-Pyrrolin (Schieberle und Grosch 1991; Blank et al. 2003). Diese Aromakomponenten sind verantwortlich für den charakteristischen Röstgeschmack der Brotkruste (Schieberle und Grosch 1991; Blank et al. 2003; Bastos und Monaro 2012). Die Textur der jeweiligen Lebensmittel wird durch Ausbildung von Proteinquervernetzungen, die im Zuge der Maillard-Reaktion entstehen, mit

beeinflusst (Bastos und Monaro 2012). So sind die Quervernetzungen z.B. für die charakteristische viskoelastische Textur des Teiges während der Backwarenherstellung verantwortlich (Gerrard 2002).

MRPs nehmen auch einen bedeutenden Einfluss auf die funktionellen Eigenschaften und Nährstoffgehalte eines Lebensmittels (Summa et al. 2006; Bastos und Monaro 2012). So kann eine durch die Maillard-Reaktion hervorgerufene Quervernetzung der Proteine die Verdaulichkeit von MRPs verringern, wodurch es zu einem funktionellem Verlust wichtiger Aminosäuren, wie z.B. Lysin (Rérat et al. 2002; Rutherford et al. 2006), Arginin (Singh et al. 2007), Prolin oder Glutaminsäure kommt (Bastos und Monaro 2012).

1.1.2 Metabolisierung

Eine normale Ernährung liefert pro Tag ca. 1000 bis 2000 μmol Amadori-Produkte und ca. 100 bis 150 μmol MRPs. Die Brotkruste weist dabei den höchsten Gehalt an Glykierungsendprodukten auf (Henle 2005). Starkes Erhitzen und langes Lagern protein- und fettreicher Nahrung verstärkt die Bildung von 1,2-Dicarbonylen und erhöht die tägliche Aufnahme der MRPs (Henle 2005).

Die mit der Nahrung aufgenommenen Glykierungsprodukte gelangen über den Magen zum Darm, wo etwa 80 % der aufgenommenen Menge an Amadori-Produkten aufgrund der vorhandenen Mikroorganismen im Kolon vollständig metabolisiert werden (Tuohy et al. 2006). Es ist bekannt, dass etwa 3-10 % der protein-gebundenen Amadori-Produkte über den Urin und 1-3 % über die Fäzes ausgeschieden werden. Dagegen ist der genaue Metabolismus der MRPs bis heute nicht eindeutig geklärt. Es wird vermutet, dass die mit der Nahrung aufgenommenen *High Molecular Weight*-(HMW)-MRPs durch die gastrointestinalen Enzyme in vereinzelt *Low Molecular Weight*-(LMW)-MRPs verdaut und in den Blutfluss eingeschleust werden, wodurch sie folglich zur Niere gelangen (Bierhaus et al. 1998; Faist und Erbersdobler 2001; Seiquer et al. 2008; Roncero-Ramos et al. 2013; Poulsen et al. 2014). Über die Glomeruli werden die LMW-MRPs gefiltert, im proximalen Tubulus resorbiert und so der Abbau und die Ausscheidung mit dem Urin ermöglicht (Sourris und Forbes 2009). Abhängig vom Gesundheitsstatus der Patienten werden so etwa 30 % der absorbierten MRPs über den Urin ausgeschieden (Faist und Erbersdobler 2001; Tuohy et al. 2006; Morales et al. 2012). Erfolgt keine vollständige enzymatische Verdauung der aufgenommenen HMW-MRPs aufgrund starker Quervernetzungen, so können HMW-MRPs auch direkt mit der Fäzes ausgeschieden werden. Durch eine nicht vollständige Ausscheidung von Glykierungsendprodukten akkumulieren die MRPs im Blutfluss, sodass weitere Modifikationen von körpereigenen Proteinen und Lipiden begünstigt werden und vaskuläre Schäden auftreten können (Bierhaus et al. 1998; Tuohy et al. 2006; Krantz 2010).

1.1.3 Signaltransduktionsmechanismen

Mit der oralen Aufnahme von MRPs und der endogenen Bildung von AGEs kommt es zu einer Vielzahl an biologischen Folgen. Dabei wirken AGEs rezeptor- als auch rezeptorunabhängig modulierend auf das antioxidative System des Körpers, sodass oxidativer Stress induziert und Einfluss auf die Detoxifizierung genommen wird (Lu et al. 2004).

1.1.3.1 Rezeptorvermittelte Wirkung

Die Wirkung der AGEs kann durch die Bindung an spezifische Rezeptoren erfolgen. Der am ausführlichsten untersuchte Rezeptor ist der *Receptor for advanced glycation endproducts* (RAGE), ein Oberflächenrezeptor der Immunglobulin-Superfamilie (Krantz 2010, Ott et al. 2014). Er wird auf einer Vielzahl an Geweben und Zellen, wie Makrophagen, Endothelien und Neuronen exprimiert (Sourris und Forbes 2009; Kierdorf und Fritz 2013). Als Multiligandenrezeptor bindet RAGE neben AGE-modifizierten Proteinen weitere Liganden, wie Amyloid- β -Peptide, S100 und HMGB1 (Sourris und Forbes 2009; Kierdorf und Fritz 2013).

Die Bindung von AGEs an RAGE führt zu zwei markanten Signaltransduktionswegen (Abbildung 2): dem redox-sensitiven und dem mitogenen Signaltransduktionsweg (Faist und Erbersdobler 2001). Im Zuge des redox-sensitiven Weges kommt es aufgrund der Bindung von AGEs an RAGE zu einer Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase, wodurch vermehrt Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen (Sumi und Ignarro 2004). Die verstärkte Zunahme von ROS induziert oxidativen Stress in der Zelle und aktiviert den NF- κ B-Weg (Lu et al. 2004; Ott et al. 2014). Dies führt wiederum zur Induktion von iNOS und zur Bildung von Peroxylradikalen (ONOO-), was über eine weitere Oxidation von Proteinen und Lipiden eine Inaktivierung funktioneller Proteine zur Folge hat (Ott et al. 2014). Gleichzeitig begünstigt eine hohe Menge an ROS die Expression von RAGE auf der Zelloberfläche durch einen positiven Feedback-Mechanismus (Lu et al. 2004).

Während des mitogenen Signalweges kommt es ebenfalls zur Induktion von oxidativem Stress durch erhöhte Level an ROS (Bierhaus et al. 1998; Vlassara 2000). AGEs aktivieren über Bindung an RAGE, die ERK1/2-MAPKinase, p38-MAPKinase (Daoud et al. 2001; Ye et al. 2001; Zill et al. 2001; Zill et al. 2003; Lu et al. 2004; Sumi und Ignarro 2004; Ruhs et al. 2007; Leuner et al. 2012) und Proteinkinase C (Ye et al. 2001; Sumi und Ignarro 2004; Uribarri et al. 2007; Krantz 2010). Die p38-MAPKinase führt dabei zu einer Phosphorylierung des I κ B- α (Carter et al. 1999). Das dadurch freigesetzte NF- κ B transloziert verstärkt in den Zellkern (Lander et al. 1997; Ye et al. 2001; Ruhs et al. 2007) und führt zu einer erhöhten Expression von proinflammatorischen Zytokinen, wie z.B. TNF- α , IL-1 β und MCP-1 (Bierhaus et al. 1998; Vlassara 2001; Ye et al. 2001; Zill et al. 2001; Henle 2005; Krantz 2010; Hellwig und Henle 2014). Durch gleichzeitige Erhöhung der iNOS-mRNA kommt es zu einer vermehrten NO-Produktion (Sumi und Ignarro 2004).

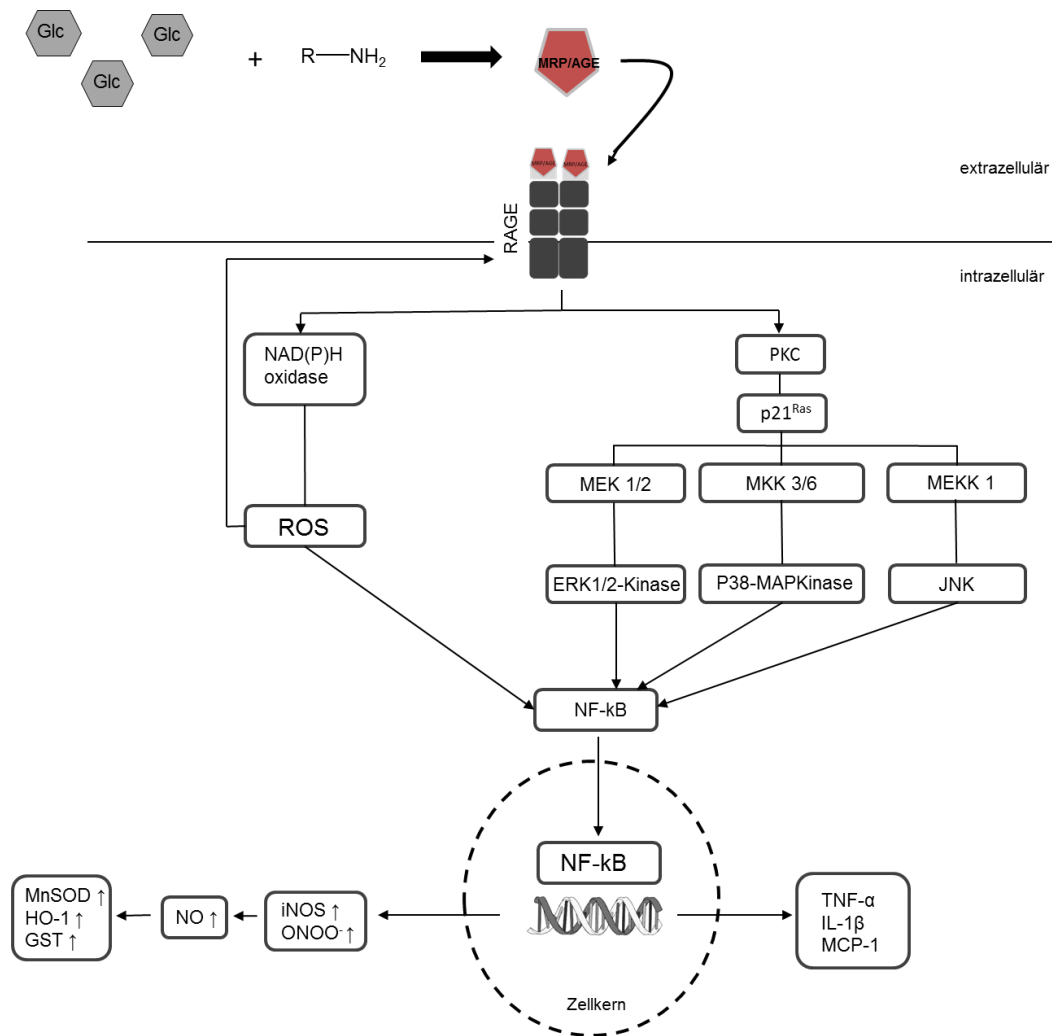


Abbildung 2: Signaltransduktionswege durch Bindung von AGEs an RAGE

Die Interaktion von AGEs mit RAGE führt zu einer redox-abhängigen NF-κB-Aktivierung durch Phosphorylierung der NAD(P)H-Oxidase. Die mitogene NF-κB-Aktivierung erfolgt über eine Aktivierung der PKC, wodurch es zu einer verstärkten Phosphorylierung der JNK, ERK-1/2-MAPKinase und der p38-MAPKinase kommt. Der Transkriptionsfaktor NF-κB transloziert in den Zellkern und induziert die Expression proinflammatorischer Zytokine, (z.B TNF-α) als auch die Expression antioxidativer und chemopräventiver Gene, wie z.B. MnSOD und HO-1 (modifiziert nach Ott et al. 2014).

AGEs binden auch an weiteren Rezeptorproteinen, wie AGE-R1 (Type I Integralmembranprotein), AGE-R2 (Tyrosin-phosphoryliertes Protein), AGE-R3 (Kohlenhydrat-, Laminin- und IgE-Bindungsprotein) und CD36 (Scavenger-Rezeptor-Klasse B). Es wird vermutet, dass die Bindung von AGEs an den AGE-R1 protektive Effekte hat, da, verglichen zu anderen Rezeptoren, weniger ROS gebildet werden (Cai et al. 2007). Die Aufgabe des AGE-R2 besteht in der Phosphorylierung von AGEs (Vlassara 2001; Sourris und Forbes 2009; Krantz 2010). Es wird vermutet, dass eine Bindung von AGEs an den AGE-R2 zu einer frühzeitigen Zellaktivierung über Phosphorylierung der ERK1/2-MAPKinase führt (Vlassara 2001). Der AGE-R3 wird in einer Vielzahl von Geweben und Zellen exprimiert und kommt im Zytoplasma als auch auf der Oberfläche von Monozyten und

Makrophagen vor (Vlassara et al. 1995; Vlassara 2001; Sourris und Forbes 2009). Vlassara et al. (1995) konnten zeigen, dass eine Erhöhung der AGE-Konzentration zu einer gezielten Translokation des AGE-R3 vom Zytoplasma zur Zelloberfläche führt. Das C-terminale Fragment des AGE-R3 bindet dabei sehr stark AGEs und nimmt diese über Endozytose in die Zelle auf (Vlassara et al. 1995; Vlassara 2001; Sourris und Forbes 2009). Aus diesem Grund weist dieser Rezeptor dem Scavenger-Rezeptor ähnliche Eigenschaften auf (Krantz 2010). Der CD36-Rezeptor besitzt eine hohe Bindungsaffinität zu AGEs, sodass diese ebenfalls über Endozytose aufgenommen und lysosomal abgebaut werden (Sourris und Forbes 2009; Krantz 2010).

1.1.3.2 Oxidativer Stress

ROS spielen eine bedeutende Rolle in der Regulierung des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung, führen aber auch zu Zellschädigungen und Zelltod (Martindale und Holbrook 2002; Krantz 2010). Zu ROS zählen vor allem das Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das Superoxid anion und Hydroxylradikale (Bowie und O'Neill 2000). Im normalen Organismus herrscht ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen Pro- und Antioxidantien. Geringe Konzentrationen an ROS wirken positiv auf den Organismus, da sie gezielt Signaltransduktionswege und Abwehrmechanismen gegen Prooxidantien induzieren (Li und Karin 1999; Krantz 2010). Dies erfolgt über die Aktivierung von nicht-enzymatischen (z.B. Glutathion, Vitamin A, C und E) und enzymatischen Antioxidantien (z.B. Superoxid-Dismutase (SOD), Katalase), um die vorhandenen Prooxidantien abzuwehren (Li und Karin 1999; Finkel und Holbrook 2000; Martindale und Holbrook 2002). Verschiebt sich diese Balance in Richtung hoher Konzentrationen an Prooxidantien, so wirken hohe Mengen an ROS zellschädigend und fördern die Entstehung von Nekrosen und altersbedingten Erkrankungen (Krantz 2010; Ott et al. 2014). Oxidativer Stress stellt somit eine Imbalance zwischen Pro- und Antioxidantien dar.

Im Zuge von oxidativem Stress stellt NF- κ B einen zentralen zellulären Regulator der Stressantwort dar, der sowohl antiapoptotische als auch proapoptotische Effekte auslösen kann (Muscat et al. 2007; Hayden und Ghosh 2008; Krantz 2010). Der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist ein Homo- oder Heterodimer von Rel-Proteinen (Li und Karin 1999; Martindale und Holbrook 2002; Hayden und Ghosh 2008). Als inaktive Form liegt er im Zytoplasma gebunden an I κ Bs vor (Li und Karin 1999; Bowie und O'Neill 2000; Hayden 2004; Maeng et al. 2006; Hayden und Ghosh 2008). Proinflammatorische Zytokine, wie TNF- α und LPS, induzieren die Phosphorylierung der I κ Bs (Li und Karin 1999; Hayden 2004). Anschließend kommt es zu einer Ubiquitinierung durch das 26S-Proteasom, wodurch NF- κ B freigesetzt wird, in den Zellkern transloziert und zur Expression der Zielgene führt (Li und Karin 1999; Bowie und O'Neill 2000; Hayden 2004; Maeng et al. 2006; Hayden und Ghosh 2008) .

Die Aufnahme von MRPs bzw. die endogene Bildung von AGEs führt zu einer Induktion von oxidativem Stress, welcher sowohl rezeptorabhängig als auch rezeptorunabhängig erfolgen kann. Rezeptorunabhängig kommt es zu einer vermehrten ROS-Freisetzung (Ruhs et al. 2010; Ruhs et al. 2007; Cai et al. 2006; He et al. 2010; Lander et al. 1997), wodurch MRPs bzw. AGEs einen zusätzlichen Einfluss auf die Inflammation des Organismus nehmen (Ye et al. 2001; Krantz 2010).

1.1.3.3 Detoxifizierung

Glykierungsendprodukte nehmen auch Einfluss auf die Detoxifizierung körperfremder Stoffe (Xenobiotikum). Die Detoxifizierung erfolgt in zwei Schritten. Der erste Schritt impliziert eine Funktionalisierung, indem funktionale Gruppen in ein Molekül eingefügt werden bzw. reaktive Gruppen entstehen (Morales et al. 2012). Dieser Vorgang wird über Phase-I-Enzyme katalysiert. Anschließend kommt es zur Konjugation mit wasserlöslichen Komponenten an dem Xenobiotikum mit Hilfe der Phase-II-Enzyme, wodurch körperfremde Stoffe über die Niere oder Galle ausgeschieden werden (Morales et al. 2012). Die Balance zwischen diesen zwei Phasen wird zur Beurteilung möglicher Krebsrisiken benutzt (Somoza et al. 2005b). So zeigten Menschen mit einer niedrigen Expression an chemopräventiven Phase-II-Enzymen, wie Glutathion-S-Transferase (GST), ein erhöhtes Risiko für Kolonkarzinom (Somoza et al. 2005b).

Die Aufnahme von MRPs bzw. die Anreicherung von AGEs im Organismus führt zu einem moderaten oxidativen Stresslevel, sodass die Expression chemopräventiver Gene, wie z.B. Mangan-Superoxid-Dismutase (Ruhs et al. 2007; Leuner et al. 2012), GST (Faist et al. 2002; Lindenmeier et al. 2002; Somoza et al. 2005) und Hämoxxygenase-1 (Ye et al. 2001; He et al. 2010) gesteigert wird. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass eine vermehrte NF- κ B-Translokation aufgrund der zellulären Aufnahme von AGEs mit einer gesteigerten HO-1- und NAD(P)H Dehydrogenase-1 (NQO-1)-mRNA-Expression korrelierte (Yan et al. 1994; Lander et al. 1997; Sumi und Ignarro 2004; He et al. 2010). Dabei scheint die Expression der chemopräventiven Enzyme organspezifisch zu sein. So untersuchten Wenzel et al. (2002) die Auswirkung einer CML-angereicherten Fütterung auf die Enzymaktivität der GST am Modell der Ratte. Sie zeigten, dass eine, mit CML-modifiziertem Casein angereicherte Nahrung, zu einer signifikanten Steigerung der GST-Aktivität in der Niere führte, wobei dieser Effekt in der Leber nicht zu sehen war (Wenzel et al. 2002).

1.1.4 Potentielle gesundheitliche Wirkung von MRPs

Die endogen gebildeten AGEs werden vorwiegend mit pathophysiologischen Wirkungen assoziiert. So zeigten hohe AGE-Plasma-Level eine Korrelation mit kardiovaskulären Komplikationen altersbedingter Erkrankungen, wie z.B. Diabetes mellitus (Brownlee 1984; Morales und Babbal 2002; Uribarri et al. 2007; Assar et al. 2009; Bastos und Monaro 2012; Sena

et al. 2012). Im Gegenzug dazu treten in der Literatur immer mehr Belege auf, dass durch die starke thermische Behandlung von Lebensmitteln, wie z.B. durch das Rösten, Grillen oder Kochen, vermehrt MRPs entstehen, die die antioxidative Kapazität eines Lebensmittels fördern (Delgado-Andrade et al. 2005). Dabei hat die Dauer der Wärmebehandlung vermutlich einen entscheidenden Einfluss auf die antioxidative Kapazität des Lebensmittels (Nicoli et al. 1999). Zum einen nimmt der Gehalt an natürlichen Antioxidantien im Lebensmittel mit der Dauer der Behandlung ab. Zum anderen werden neue antioxidativ wirkende Komponenten gebildet, je länger und intensiver die Wärmebehandlung andauert (Nicoli et al. 1999). So ermöglicht die thermische Behandlung einen Anstieg der allgemeinen antioxidativen Kapazität im Lebensmittel. Mittels DPPH-Assay konnte gezeigt werden, dass geröstete Kaffeebohnen als Radikalfänger dienten (Borrelli et al. 2002; Summa et al. 2006) und dass die Brotkruste als MRP-reiches Lebensmittel zu einer verbesserten Oxidationsempfindlichkeit von LDL gegenüber Kupfersulfat führte (Dittrich et al. 2009). In einer Interventionsstudie konnte nachgewiesen werden, dass eine MRP-reiche Kost die LDL-Oxidation verlangsamt und so zu einer verbesserten Oxidationsempfindlichkeit von LDL führte (Dittrich et al. 2009). Auch ein Einfluss von MRPs auf die Detoxifizierung konnte in Zellstudien anhand der Brotkruste nachgewiesen werden. So induzierte die Brotkruste die Expression von Phase-II-Enzymen, wie MnSOD und GST, bei gleichzeitiger Abnahme des Phase-I-Enzyms NADPH Cytochrome C-Reduktase (Faist et al. 2002; Lindenmeier et al. 2002; Ruhs et al. 2010).

Eine weitere physiologische Eigenschaft stark hitzebehandelter Lebensmittel ist die Stimulierung des Wachstums von Bifidobakterien im Dickdarm. Es zeigte sich, dass MRPs der Brotkruste als Kohlenstoffquelle für Bifidobakterien dienten und eine prebiotische Wirkung vermittelten (Ames et al. 1999; Borrelli und Fogliano 2005). Summa et al. (2008) demonstrierten einen wachstumshemmenden Effekt von gerösteten Kakaobohnen auf *Enterobacter cloacae*. In einer Fütterungsstudie mit Ratten konnte eine erhöhte Bioverfügbarkeit von Phosphor aufgrund einer Brotkrusten-angereicherten Diät nachgewiesen werden (Roncero-Ramos et al. 2012). Demnach führte die Aufnahme von MRP-reichen Lebensmitteln auch zu einer Beeinflussung des Mineralstoffhaushaltes (Bastos und Monaro 2012; Roncero-Ramos et al. 2012).

1.2 Getreideproteine

Die Getreideproduktion nimmt von Jahr zu Jahr zu. Dabei ist der Weizen das meist-verwendete Getreideprodukt zur Verwendung von Backwaren (Hui et al. 2008). Die jährlich weltweite Weizenproduktion (2006) liegt bei ca. 600 Mio T (Hui et al. 2008; Belitz et al. 2009). Dagegen weist das Roggenmehl als zweit-häufigstes Getreideprodukt eine jährliche Produktion (2006) von rund 15 Mio T weltweit auf (Michalska et al. 2007; Belitz et al. 2009; Horszwald et al. 2009). Die

AIBI (*International Association of Plant Bakeries*) ermittelte für das Jahr 2013 einen durchschnittlichen Brotkonsum von 56 kg/Einwohner in Deutschland (AIBI Bread Market Report 2013). Dabei wurden vor allem Mischbrote (33,7 %) und Toastbrote (19,3 %) konsumiert (Bäckerhandwerk, Stand: 2015).

Getreideproteine lassen sich hinsichtlich der charakteristischen Löslichkeit der Proteine nach der Osborne-Fraktionierung einteilen (Abbildung 3). Man unterscheidet nach wasserlöslichem Albumin, salzlöslichen Globulinen und in einer alkohol-wässrigen Lösung extrahierbare Prolamine (Belitz et al. 2009). Die vierte Fraktion, das Glutenin, verbleibt im Rückstand (Rimbach et al. 2010). Im Weizen werden die Prolamine als Gliadin bezeichnet. In den anderen Getreidesorten erfolgt die genaue Bezeichnung basierend auf deren lateinischen Namen. So werden z.B. die Prolamine des Roggens (*Secale cereale*) als Secalin bezeichnet (Shewry und Tatham 1990; Rimbach et al. 2010).

Eine andere Einteilungsmöglichkeit erfolgt nach der Funktionalität der Getreideproteine in Nicht-Kleberproteine und Kleberproteine (Abbildung 3). Nicht-Kleberproteine entsprechen der Albumin/Globulin-Gruppe der Osborne-Fraktionierung (Goesaert et al. 2005). Sie kommen vor allem in den äußeren Randschichten des Weizenkerns vor und sind in salzhaltigen Puffern löslich. Die Kleberproteine stellen die Hauptspeicherproteine des Weizens dar und befinden sich im Endosperm. Aufgrund ihrer Unlöslichkeit in Wasser und in salzhaltigen Lösungen werden sie den Prolaminen und Glutelinen der Osborne-Fraktionierung gleich gestellt (Goesaert et al. 2005).

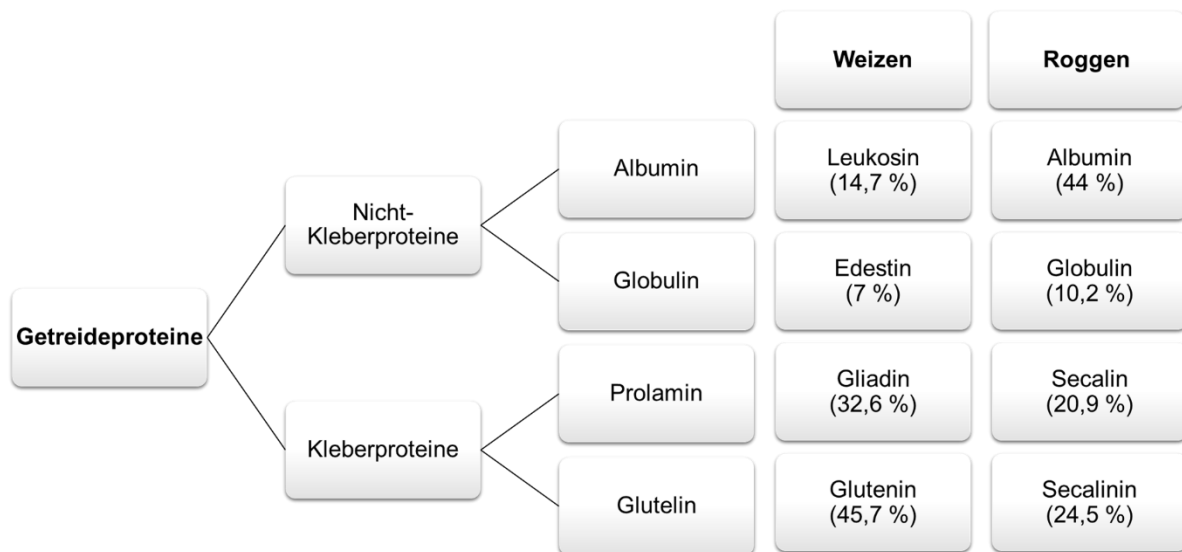


Abbildung 3: Zusammensetzung der Getreideproteine am Beispiel von Weizen und Roggen
 Die angegebene Proteinverteilung bezieht sich prozentual auf das jeweilige Aschegewicht der Mehlsorten Weizen und Roggen (modifiziert nach Belitz et al. 2009; Rimbach et al. 2010)

Die Aufnahme von Getreide führt zu einer positiven Beeinflussung der Gesundheit. So korreliert ein hoher Getreidekonsum mit einer besseren Blutzucker- und Körpergewichtsregulierung, als auch mit der Verminderung kardiovaskulärer Erkrankungen (Horszwald et al. 2009). Verglichen zum Weizenmehl besitzt Roggenmehl einen schlechteren Proteingehalt (Hui et al. 2008). Dennoch weisen vor allem Roggen und Roggenprodukte antioxidative Eigenschaften auf, da sie eine gute Quelle für Lignane, Phytosterole und Phenolsäuren darstellen (Michalska et al. 2007; Horszwald et al. 2009). Auch die Deckung der täglichen Ballaststoffmenge kann über Roggenprodukte erreicht werden, da sie hohe Gehalte an Fruktane und β -Glukane besitzen (Horszwald et al. 2009).

1.2.1 Nicht-Kleberproteine

Die Nicht-Kleberproteine entsprechen der Albumin- und Globulin-Fraktion der Osborne-Fraktionierung. Diese Weizenproteine machen ca. 15-20 % des Gesamtgetreideproteins mit einer ausgewogenen Aminosäuren-Bilanz aus (Rimbach et al. 2010; Žilić et al. 2011). Bedeutende Vertreter der Albumine und Globuline sind die α -Amylasen und Trypsin-Inhibitoren (Žilić et al. 2011). Demnach stellt ein Großteil dieser Gruppe Enzyme dar, die eine metabolische Aktivität aufweisen und nicht als Speicherproteine fungieren (Žilić et al. 2011). Aus diesem Grund nehmen sie bedeutenden Einfluss auf die Lebensmittelherstellung als auch auf die rheologischen Eigenschaften der Weizenmehle (Žilić et al. 2011). Der Albuminanteil des Roggens ist deutlich höher verglichen zu dem in Weizenmehlen. So sind etwa 45 % der Proteine im Roggen Albumine (Belitz und Grosch 2009).

1.2.2 Kleberproteine

Kleberproteine, auch bezeichnet als Gluten, stellen die Speicherproteine der Getreideprodukte dar und sind unter anderem für deren technologische Qualität und der daraus resultierenden Produkte verantwortlich (Goesaert et al. 2005; Hui et al. 2008; Belitz et al. 2009; Ang et al. 2010; Žilić et al. 2011; Tatham und Shewry 2012). Sie lassen sich anhand ihrer Löslichkeit in zwei Gruppen einteilen: zum einen in die wässrig-alkohollöslichen Prolamine und zum anderen in Glutenin, welche sich nur in alkoholischer Lösung unter Zugabe reduzierender Stoffen lösen lassen (Goesaert et al. 2005; Ang et al. 2010).

Die Prolamine werden im Weizen als Gliadine bezeichnet. Sie sind monomere Proteine mit einem Molekulargewicht von 30 kDa bis 80 kDa (Goesaert et al. 2005; Ang et al. 2010; Ebermann und Elmadfa 2011). Hinsichtlich der elektrophoretischen Eigenschaften bei saurem pH lassen sich Gliadine in vier Untergruppen einteilen: α -, β -, γ - und ω -Gliadin (Kawase et al. 1998; Goesaert et al. 2005; Wieser 2007; Ang et al. 2010). Eine weitere mögliche Klassifizierung erfolgt anhand des Schwefelgehaltes. Demnach gibt es schwefelreiche Gliadine und schwefelarme Gliadine (Shewry

und Tatham 1990; Tatham und Shewry 2012). Schwefelarme Gliadine machen etwa 10-20 % der Gesamtkleberproteine im Weizen aus (Shewry und Tatham 1990). Ein wichtiger Vertreter ist hier das ω -Gliadin (Shewry und Tatham 1990; Tatham und Shewry 2012). Den größten Anteil der Kleberproteine stellen die schwefelreichen α - und γ -Gliadine dar (Shewry und Tatham 1990; Kawase et al. 1998). Sie sind besonders für die Backfähigkeit des Teiges verantwortlich. Prolamine besitzen einen hohen Gehalt an Asparagin, Glutaminsäure, Arginin, Prolin und geringe Mengen an Lysin, Tryptophan und Methionin (Ebermann und Elmadfa 2011; Žilić et al. 2011). Aufgrund des hohen Prolin- und Glutaminsäuregehaltes sind Gliadine resistent gegenüber dem proteolytischen Abbau durch Enzyme des Magens, Pankreas und der Bürstensaummembran (Shan et al. 2002; Wieser 2007). Zusätzlich begünstigt der hohe Gehalt an den unpolaren Aminosäurenresten, die Unlöslichkeit in wässrigen Lösungen (Iwami et al. 1987).

Die Glutenine gehören zur zweiten Gruppe der Kleberproteine. Ihr Molekulargewicht liegt zwischen 80 kDa und mehreren Millionen kDa (Goesaert et al. 2005; Wieser 2007; Žilić et al. 2011). In konventionellen Puffern weisen sie eine geringe Löslichkeit auf (Goesaert et al. 2005). Glutenine bestehen aus Untereinheiten, die über Disulfidbindungen miteinander verknüpft sind und eine gewisse Ähnlichkeit zum Gliadin aufweisen (Shewry und Tatham 1990; Goesaert et al. 2005; Tatham und Shewry 2012). Aus diesem Grund lassen sie sich in vier verschiedene Gruppen einteilen: hochmolekulare (HMW-GS) und B-, C-, D-Typ niedermolekulare (LMW-GS) Glutenin-Untereinheiten (Goesaert et al. 2005; Tranquet et al. 2012).

1.3 Die Brotherstellung

Die klassische Brotherstellung gliedert sich in drei verschiedene Phasen: die Teigbereitung, die Teigaufbereitung und der abschließende Backprozess.

1.3.1 Die Teigbereitung und -aufbereitung

Für die Herstellung von Brot werden am meisten Weizen- und Roggenmehle verwendet. Eine geeignete Qualität von Weizenmehlen zeichnet sich durch eine gute Quellfähigkeit, Elastizität, Dehnbarkeit des Glutens und einer guten Verkleisterungsfähigkeit der Stärke aus (Heiss 2013). Des Weiteren muss das Weizenmehl in der Lage sein Maltose zu bilden, damit eine optimale Bedingung für die verwendeten Hefen geschaffen werden kann (Heiss 2013). Die Qualität der Roggenmehle wird vorwiegend anhand der Beschaffenheit der Pentosane und der Stärke bestimmt (Horszwald et al. 2009; Heiss 2013).

Werden Brote mit einem Gehalt von mehr als 20 % Roggenmehl hergestellt, so ist als erster Schritt die Herstellung eines Sauerteiges notwendig (Brandt und Gänzle 2006). Dabei wird Roggenmehl mit Wasser gemischt und für eine bestimmte Zeit bei 26 °C inkubiert wird (Klingler 2010; Heiss 2013). Da Roggenproteine ein geringeres Wasserbindungsvermögen und, verglichen zu den

Weizenproteinen, eine erhöhte Löslichkeit in Wasser bei Raumtemperatur aufweisen, spielen die Pentosane hier eine wichtige Rolle (Klingler 2010). Durch die Säuerung des Roggenteiges wird ein Herabsetzen der Löslichkeit der Proteine und Pentosane sowie ein verbessertes Quellverhalten erreicht (Michalska et al. 2008; Klingler 2010). Der Sauerteig besteht dabei aus Hefen und Bakterien, wobei vor allem Milchsäurebakterien zum Einsatz kommen (Hui 2006; Hui et al. 2008). Durch den Fermentationsprozess bei der Sauerteigherstellung entstehen aufgrund der Bakterien organische Säuren, wie z.B. Essigsäure, Zitronensäure und Milchsäure (Hui et al. 2008; Michalska et al. 2008; Ktenioudaki et al. 2013). Durch die Hefefermentation wird Alkohol, Wasser und CO₂ gebildet (Hui et al. 2008). Während der Milchsäuregärung und Hefefermentation reagieren verschiedene organische Säuren miteinander, sodass wichtige Aromaesterverbindungen entstehen, die das charakteristische Aroma von Backwaren bestimmen (Michalska et al. 2007; Hui et al. 2008; Michalska et al. 2008). Als abschließender Schritt erfolgt die Zugabe von weiterem Mehl, Wasser und sonstiger Zutaten, sodass der klassische Teig entsteht.

Für die Herstellung von reinem Weizenbrot kann der erste Schritt der Sauerteigherstellung entfallen, da die Verwendung des Sauerteigs bei Weizen nur einen Einfluss auf die sensorischen Eigenschaften des Brotes nimmt (Brandt und Gänzle 2006). Dem Weizenmehl wird Wasser beigemischt, wodurch Proteine und Pentosane hydratisieren, aufquellen und eine einheitliche Masse, den Teig, bilden (Hui 2006; Klingler 2010). Dabei nimmt die Stärke etwa 50 % des enthaltenen Wassers auf und verkleistert zusätzlich (Klingler 2010). Unter Wasserabgabe denaturieren die enthaltenen Proteine. Die Kleberproteine bilden ein Netzwerk über Disulfidbindungen aus, wodurch eine Extrahierfähigkeit der Kleberproteine erreicht wird (Gerrard 2002; Goesart et al. 2005; Hui et al. 2008; Klingler 2010). Nach dem mechanischen Vermischen der Zutaten ermöglicht die Teigruhe eine Relaxation des Teiges (Michalska et al. 2007; Klingler 2010). Es kommt zu einer Nachquellung und Förderung des Hefetriebs, sowie zur Bildung von charakteristischen Aroma- und Geschmacksstoffen (Klingler 2010).

1.3.2 Der Backprozess

Der allgemeine Backprozess untergliedert sich in drei Schritten: Im ersten Schritt wird die Ausgangstemperatur des Teiges von 29 °C konstant auf 60 °C erhöht (Therdthai et al. 2002). Währenddessen nimmt die Enzymaktivität und das Hefewachstum zu (Therdthai et al. 2002; Hui 2006; Heiss 2013). Im zweiten Schritt wird der Ofen konstant auf 240 °C geheizt. Im Teig liegt dabei eine Temperatur von max. 100 °C vor, sodass sich der Teig zur Krume ausbildet (Therdthai et al. 2002; Michalska et al. 2008). Alle Reaktionen erreichen in diesem Schritt ihr Maximum, sodass es zur Verdampfung des verbleibenden Wassers im Teig und zur Gelatinierung kommt

(Therdthai et al. 2002; Mondal und Datta 2008; Assar et al. 2009; Vanin et al. 2009; Heiss 2013). Während des zweiten Schrittes des Backprozesses erreicht die Kruste eine Temperatur von 105 °C bis 205 °C. Durch die Verringerung der Feuchtigkeit und der erhöhten Temperatur kommt es daher zur Förderung der Maillard-Reaktion (Zill et al. 2001; Therdthai et al. 2002; Michalska et al. 2008; Assar et al. 2009; Vanin et al. 2009; Bastos und Monaro 2012). Die fortschreitende Maillard-Reaktion an den Aminosäuren Prolin und Ornithin führt zur Bildung von 2-Acetyltetrahydropyridin und 2-Acetyl-1-Pyrrolin, welche die charakteristischen Aromastoffe des Brotes vor allem in der Kruste darstellen (Schieberle und Grosch 1991; Blank et al. 2003; Klingler 2010). Im Teig hingegen ist weiterhin eine erhöhte Feuchtigkeit und eine niedrigere Temperatur vorhanden, sodass die Maillard-Reaktion dort nur langsam ablaufen kann (Michalska et al. 2008). Im letzten Schritt des Backprozesses kommt es zum Verdampfen organischer Substanzen, wie z.B. Essigsäure und Milchsäure (Therdthai et al. 2002; Heiss 2013).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Untersuchungen zeigen, dass exogen aufgenommene Glykierungsendprodukte (MRPs) potentiell gesundheitsfördernd wirken (Maslo 2006). So konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von stark erhitzten, MRP-reichen Lebensmitteln, wie der Brotkruste, einen protektiven Effekt auf das antioxidative System des Organismus nimmt (Borrelli et al. 2002; Summa et al. 2006; Dittrich et al. 2009) und die Expression chemopräventiver Gene fördert (Faist et al. 2002; Lindenmeier et al. 2002; Somoza et al. 2005; Ruhs et al. 2007; Leuner et al. 2012).

Da MRP-reiche Lebensmittel eine sehr komplexe Matrix darstellen, bleibt zu klären, auf welche definierten Strukturen die gesundheitsfördernden Effekte zurückzuführen sind. Die ersten chemischen Untersuchungen zur Identifikation einzelner bioaktiver Substanzen aus erhitzten Lebensmitteln wurden am Beispiel der Brotkruste durchgeführt. Lindenmeier et al. (2002) identifizierten dabei Pronyl-Lysin, ein Pyrrolinon-Reductonyl-Lysin, welches aufgrund einer erhöhten antioxidativen Kapazität und über die Induzierung der Glutathion-S-Transferase (GST) eine protektive Wirkung vermittelt. Ruhs et al. (2010) zeigten, dass eine Präkonditionierung von Cardiofibroblasten mit der Brotkruste einen, aufgrund ischämischer Bedingungen (keine Glukose, Sauerstoffmangel, saurer pH) induzierten Zelltod, entgegen wirkte. Eine Präkonditionierung dieser Zellen mit reinem/isoliertem Pronyl-Lysin bestätigte den protektiven Effekt jedoch nicht (Ruhs et al. 2010). Somit scheinen neben Pronyl-Lysin andere bioaktive Komponenten in der Brotkruste vorhanden zu sein, die die antioxidative Wirkung vermitteln.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen bioaktive Substanzen der Brotkruste identifiziert und isoliert werden. Dabei wird die Bioaktivität anhand der zellkernspezifischen Translokation von NF-κB in drei verschiedenen Reporterzellen (RAW/NF-κB/SEAPorterTM-, NF-κB/293/GFP-LucTM-

und NF- κ B/Jurkat/GFP-LucTM-Zellen) analysiert. Eine Bestimmung der mRNA-Konzentration von Phase-II-Enzymen (MnSOD, NQO-1, HO-1, GSTM-1) ermöglicht die Untersuchung chemopräventiver Eigenschaften dieser Substanzen. Zusätzlich wird der Frage nachgegangen, ob, die durch den Backprozess entstandenen Glykierungsendprodukte, eine mögliche Rolle bei der Vermittlung der Bioaktivität spielen. Da die Brotkruste eine sehr komplexe Matrix darstellt, erfolgte eingangs eine Charakterisierung des Brotkrustenextraktes.

2 Material

2.1 Chemikalien

Aceton	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
Acetonitril	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Acrylamid 4K-Lösung 40% (37,5:1)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Protein-G-Agarose	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Amidoschwarz 10B	Bio-Rad Laboratories, München
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
Bromphenolblau Natriumsalz	Bio-Rad Laboratories, München
BSA (Rinderalbumin Fraktion V, pH 7,0)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
6-Amino-n-Carbonsäure	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
Chloroform	Merck Millipore KGaA, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue G-250	Bio-Rad Laboratories, München
p-Cumarsäure	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat (C ₂ H ₃ NaO ₂)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
DMSO	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
DMEM 4,5g/l Glucose	Life Technologies
dNTPs	Promega GmbH, Mannheim
Tritriplex III (EDTA)	Merck Millipore KGaA, Darmstadt
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol, 99,9 %	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
Ethidiumbromid-Lösung, 1 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
HyClone® Fötale Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientifics Inc., Rockford, USA
D-(-)-Fructose	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
Gliadin	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
D-(+)-Glucose	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
L-Glutamin (GlutaMAX (100x))	Life Technologies
Glycerol	Merck Millipore KGaA, Darmstadt
Glyoxal	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
G-418 Sulfat (Geneticin)	Calbiochem-Merck KGaA, Darmstadt
Luminol	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
D-(+)-Maltose Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
Methanol	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
40 % Methylglyoxal-Lösung (MGO)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
M-MLV-reversen Transkriptase	Promega GmbH, Mannheim
Natriumazetat (wasserfrei)	Merck Millipore KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natriumhydroxid	Merck Millipore KGaA, Darmstadt
Orange G	Merck Millipore KGaA, Darmstadt
PBS (1x), pH=7,4	Life Technologies
PCR Mastermix	Promega GmbH, Mannheim
Penicillin-Streptomycin (100x)	Life Technologies
Phenylisothiocyanate (PITC)	Thermo Fisher Scientifics Inc., Rockford, USA

ortho-Phosphorsäure 85 %	Merck Millipore KGaA, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Alkaline Phosphatase Yellow (pNPP)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
2-Propanol	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
Random Primer	Promega GmbH, Mannheim
Reinstwasser	Merck Millipore KGaA, Darmstadt
D-(-)-Ribose	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
RIPA-Puffer (10x)	Cell Signaling Technology®
RPMI 1640	Life Technologies
Salzsäure, 37 %	Merck Millipore KGaA, Darmstadt
D-(-)-Sorbitol	AppliChem GmbH, Darmstadt
D-(+)-Sucrose (Saccharose)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (Temed)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
Trichloressigsäure (TCA)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Triethylamine (TEA)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Trifluoressigsäure (TFA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris ultrapure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TRIZOL® Reagenz	Life Technologies
Trypsin-EDTA-Lösung (10x)	Invitrogen, Karlsruhe
Tween® 20	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
RNase-freies Wasser	Zymo Research, Freiburg
Wasserstoffperoxid, 30 %	Universitätsapotheker, Halle (Saale)

2.2 Materialien

m-Aminophenyl-boronic acid-Agarose	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim
Blotpapier	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
C18 Pico-tag® Säule	Waters
Immobilon® Transfer PVDF-Membran	Merck Millipore KGaA, Darmstadt
Extra Thick Blot Papier	Bio-Rad Laboratories, München
Hydrolyseröhrchen	Thermo Fisher Scientifics Inc., Rockford, USA
Kryoröhrchen	Greiner Bio-one
Minisart® 0,45µm sterile Filter	Bio-Rad Laboratories, München
Protino Column 14 ml	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
SPE-Säulen	Phenomenex
10 cm-Zellkulturschale	TPP Techno Plastic Products AG, Schweiz
T-25cm ² Zellkulturschale	Becton Dickinson and Company, USA
T-75 cm ² Zellkulturflasche	BD Biosciences, Bedford, USA
Zellkulturplatten (24-well, 96-well)	TPP Techno Plastic Products AG, Schweiz
Zorbax 300SB-C18	Agilent Technologies, Santa Clara, USA

2.3 Kits und Größenmarker

Pierce™ BCA Protein Assay Kits	Thermo Fisher Scientifics Inc., Rockford, USA
RNA MiniPrep™ Kit Systems	Zymo Research, Freiburg
SEAPorter Assay Kit	Biomol GmbH, Hamburg
Aminosäurenstandard H	Thermo Fisher Scientifics Inc., Rockford, USA
GeneRuler™ 100 bp	Thermo Fisher Scientifics Inc., Rockford, USA
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientifics Inc., Rockford, USA

2.4 Geräte

Colonee Picotag	Pico.tag technology, Waters
Casy® Cell Counter	Schärfe-System GmbH, Reutlingen
Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene® Labware, Wiesbaden
Blotkammer (SemiDry)	Bio-Rad, München
Inkubator: Function Line	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Hera Cell	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Eppendorf Concentrator 5301	Eppendorf GmbH, Hamburg
FACSCalibur	BD Biosciences, Bedford, USA
Feinwaage: BP301S	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
FLUOstar Optima	BMG Labtechnologies, Offenburg
Gelkammer (SDS-Page)	Bio-Rad, München
Agilent 1200 HPLC System	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Image Reader LAS-3000	Fujifilm, Raytest GmbH, Straubenhardt
Mikroprozessor pH-Meter	WTW, Weilheim
Mikroskop: Eclipse TS100	Nikon GmbH, Düsseldorf
Mini Fold® Spot-Bloteinheit	Schleicher & Schuell, Dassel
Mini-Protean® 2-D Electrophoresis Cell Kammer	Bio-Rad, München
NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientifics Inc., Rockford, USA
Nicolet Magna-IR 550 Spektrometer Serie II	GMI Inc., Ramsey, USA
PCR-Gerät: TRIO-Thermoblock	Biometra GmbH, Göttingen
iCycler	BioRad, München
Mastercycler Gradient	Eppendorf AG, Hamburg
GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems
Pico Tag™ & Vacuum Station	Waters
Reinstwasseranlage Milli-Q® Biocel	Millipore GmbH, Schwalbach
Schüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments, Schwabach
Spannungsquelle: Power Pac 200	Bio-Rad, München
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Überkopffleer: MACSmix™ Tube Rotor	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Ultraschall: Sonopuls	Bandelin, Berlin
Waage: Sartorius portable	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Wide Mini-Sub® Cell GT	Bio-Rad, München
Zentrifuge: Varifuge 3.0R	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Biofuge Fresco	Heraeus Holding GmbH, Hanau

2.5 Software

AIDA Software Version 3.51.042	Raytest GmbH, Straubenhardt
OMNIC™ Spectra Software	Thermo Fisher Scientifics Inc., Rockford, USA
Chemstation B.03.02	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Cell Quest Pro	BD Biosciences, Bedford, USA
Sigma Plot 12.3	Systat Software Inc., San Jose, USA

3 Methoden

3.1 Herstellung des Nahrungsmittlextraktes und der Referenzproteine

3.1.1 Herstellung des löslichen Brotkrustenextraktes

Im Rahmen einer Kooperation mit Frau Prof. Dr. Somoza (Institut für Ernährungsphysiologie und Physiologische Chemie, Universität Wien, Österreich) wurde der Arbeitsgruppe ein entfetteter Brotkrustenextrakt zur Verfügung gestellt. Wie bei Lindemeier et al. (2002) beschrieben, wurde zur Herstellung des Brotkrustenextraktes Weizen-, Roggenmehl, Wasser, Sauerteig, Bäckerhefe und Natriumchlorid herangezogen. Nach dem Backprozess wurde die braune Brotkruste von dem Brot entfernt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und mithilfe eines Mörsers zerkleinert. Die zerkleinerte Brotkruste wurde anschließend mittels Chloroform entfettet und lyophilisiert. Das lyophilisierte Pulver wurde in einer Konzentration von 250 mg/ml in PBS gelöst, für 3 min bei 80 % Power mittels Ultraschall homogenisiert und anschließend bei 600 x g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut bei 4 °C und 20.000 x g für 30 min zentrifugiert. Die lösliche Fraktion des Brotkrustenextraktes wurde bis zur weiteren Verwendung aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

3.1.2 Herstellung von AGE-BSA und AGE-Gliadin

Um den Einfluss einer AGE-bedingten Modifikation auf den NF- κ B-Signalweg zu untersuchen, wurden die Standardproteine BSA und Gliadin mit verschiedenen Zuckern, sowie mit MG/G modifiziert. Dazu wurde 20 mg BSA/ml PBS eingewogen und für 3 Tage bei 50 °C mit 500 mM Ribose, 500 mM Glukose oder 10 mM MG/10 mM G schüttelnd inkubiert. Die daraus resultierenden AGE-BSAs werden in der vorliegenden Arbeit wie gefolgt gekennzeichnet: Ribose-BSA, Glukose-BSA und MG/G-BSA.

Da Gliadine während der Brotherstellung deamidiert (Umwandlung von Glutamin zu Glutaminsäure) werden, wurde 20 mg herkömmliches Gliadin vor der Modifizierung in 1 ml 0,1 M Salzsäure gelöst und für 70 min bei 90 °C schüttelnd inkubiert wurde. Anschließend wurde die Reaktion mittels 0,1 M Natriumhydroxid gestoppt und gegen Reinstwasser über Nacht dialysiert. Die Modifizierung von deam. Gliadin erfolgte durch Inkubation mit 400 mM Fruktose, einem Zuckermix (bestehend aus 20 mM Glukose, 33 mM Saccharose, 27 mM Maltose und 37 mM Fruktose) oder 10 mM MG/10 mM G für 7 Tage bei 70 °C. Die daraus resultierenden AGE-Gliadine werden in der vorliegenden Arbeit wie gefolgt gekennzeichnet: Fruktose-Gliadin, Zucker-Gliadin und MG/G-Gliadin.

Die entstandenen AGE-Modifikationen an den jeweiligen Proteinen wurden mittels Fluoreszenzbestimmung und Immunodetektion überprüft.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Zellkulturtechniken

3.2.1.1 humane embryonale Nierenzellen (NF- κ B/293/GFP-LucTM-Zellen)

Da die Niere ein wichtiges Organ zur Metabolisierung von AGEs darstellt, wurden in der vorliegenden Arbeit transfizierte HEK-293-Zellen, die NF- κ B/293/GFP-LucTM-Zellen der Firma System Bioscience, verwendet. Diese Reporterzellen wurden mit einem HIV-basierten Lentivirus transfiziert, sodass unter Kontrolle eines minimalen Cytomegalovirus (mCMV) Promoters, verbunden mit 4 Kopien eines NF- κ B-Transkriptionresponse Elements, die Zellen ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) als Reporter gen exprimieren.

3.2.1.1.1 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Zum Einfrieren der NF- κ B/293/GFP-LucTM-Zellen wurden die subkonfluent gewachsenen Zellen mit einer Trypsin-EDTA Lösung (0,1 % (w/v) Trypsin-EDTA in PBS) von der Zellkulturflasche abgelöst und anschließend in 10 ml Wachstumsmedium (DMEM, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 1 % Pen/Strep) aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl mittels Casy® Cell Counter wurden die Zellen abzentrifugiert und 2×10^6 Zellen in 500 μ l Wachstumsmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt und anschließend mit eiskaltem Einfriermedium (80 % FCS/20 % DMSO) in einem Verhältnis von 1:1 gemischt. Das schrittweise Einfrieren erfolgte im Cryo 1 °C Freezing Container bei -80 °C. Für die Langzeitlagerung der Zellen wurde flüssiger Stickstoff benutzt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte zügig im warmen Wasserbad mit anschließender Überführung in eine T-75 cm² Zellkulturflasche, welche 20 ml Wachstumsmedium enthielt. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel und nach weiteren 2 Tagen das Passagieren.

3.2.1.1.2 Kultivierung der Zellen

Die NF- κ B/293/GFP-LucTM-Zellen wurden bei 37 °C und 10 % CO₂ in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/10 ml Wachstumsmedium in einer T-25cm² Zellkulturschale kultiviert. Alle 4 Tage erfolgte das Passagieren der Zellen. Dafür wurden die Zellen mit 37 °C warmer Trypsin/EDTA-Lösung (0,1 % (w/v) Trypsin-EDTA in PBS) für 2 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und anschließend in 10 ml Wachstumsmedium gelöst. Die Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität erfolgte am Casy® Cell Counter.

Für Stimulationsversuche erfolgte die Aussaat in einer Zelldichte von 7×10^4 Zellen/cm² in einer 96-well Platte. Nach Erreichen der Zellsubkonfluenz (nach 48 h) wurden die Zellen entsprechend der jeweiligen Versuchsbedingungen behandelt.

3.2.1.2 humane T-Zellen (NF- κ B/Jurkat/GFP-LucTM-Zellen)

Die weitere Reporterzelllinie NF- κ B/Jurkat/GFP-LucTM der Firma System Bioscience ist eine nicht-adhärenente humane T-Lymphozyten-Zelllinie. Diese Reporterzelllinie wurde mit einem HIV-basiertem Lentivirus transfiziert, sodass unter Kontrolle eines mCMV Promoters und vier Kopien des NF- κ B-Response-Elementes die Transkription des GFP-Gens erfolgt und die Zellen grün fluoreszieren.

3.2.1.2.1 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Zum Einfrieren der NF- κ B/Jurkat/GFP-LucTM-Zellen wurden die konfluent gewachsenen Zellen in ein 10 ml Falcon überführt, bei 750 x g für 5 min zentrifugiert und in 10 ml Wachstumsmedium (RPMI, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 1 % Pen/Strep) resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl mittels Casy® Cell Counter wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und 2×10^6 Zellen in 500 μ l Wachstumsmedium gelöst. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt und anschließend mit eiskaltem Einfriermedium (80 % FCS/20 % DMSO) in einem Verhältnis von 1:1 gemischt. Das schrittweise Einfrieren erfolgte im Cryo 1 °C Freezing Container bei -80 °C. Für die Langzeitlagerung der Zellen wurde flüssiger Stickstoff benutzt.

Zum Auftauen wurden die in Einfriermedium gelagerten Zellen zügig im warmen Wasserbad aufgetaut, in 10 ml Wachstumsmedium überführt und anschließend bei 750 x g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml frischem Wachstumsmedium resuspendiert und in einer T-75cm² Zellkulturflasche kultiviert (37 °C, 5 % CO₂).

3.2.1.2.2 Kultivierung der Zellen

Die NF- κ B/Jurkat/GFP-LucTM-Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/10 ml Wachstumsmedium in einer T-25cm² Zellkulturschale kultiviert. Alle 4 Tage erfolgte das Passagieren der Zellen, indem die nicht-adhärenenten Zellen in ein 10 ml Falcon überführt, bei 750 x g für 5 min zentrifugiert und in 10 ml Wachstumsmedium erneut resuspendiert wurden. Die Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität erfolgte am Casy® Cell Counter.

Für Stimulationsversuche erfolgte die Aussaat in einer Zelldichte von $1,96 \times 10^4$ Zellen/ml in einer 96-well Platte. Nach Erreichen der Zellkonfluenz (nach 48 h) wurden die Zellen entsprechend der jeweiligen Versuchsbedingungen behandelt.

3.2.1.3 murine Makrophagen (RAW/NF- κ B/SEAPorterTM-Zellen)

Die dritte verwendete Reporterzelllinie der Firma Imgenex ist eine murine RAW/NF- κ B/SEAPorterTM-Zelllinie. Diese stabil transfizierten RAW 264.7-Zellen sezernieren unter der Kontrolle eines NF- κ B-Response-Elements die alkalische Phosphatase (SEAP) ins Zellkulturmedium und ermöglichen damit die Untersuchung des NF- κ B-Signalweges.

3.2.1.3.1 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Zum Einfrieren der RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen wurden die subkonfluent gewachsenen Zellen mit einer Trypsin-EDTA Lösung (0,1 % (w/v) Trypsin-EDTA in PBS) von der 10 cm-Zellkulturschale abgelöst und anschließend in 10 ml Wachstumsmedium (DMEM, 10 % FCS, 4 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 1 % Pen/Strep) aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl mittels Casy® Cell Counter wurden die Zellen abzentrifugiert und 2×10^6 Zellen in 500 μ l Wachstumsmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt und anschließend mit eiskaltem Einfrieremedium (80 % FCS/20 % DMSO) in einem Verhältnis von 1:1 gemischt. Das schrittweise Einfrieren erfolgte im Cryo 1 °C Freezing Container bei -80 °C. Für die Langzeitlagerung der Zellen wurde flüssiger Stickstoff benutzt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte zügig im warmen Wasserbad mit anschließender Überführung in einen 10 ml Falcon mit 10 ml Wachstumsmedium. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 750 x g wurde das Pellet in frischem Wachstumsmedium resuspendiert und in eine 10 cm-Zellkulturschale ausgesät. Nach 48 h erfolgte ein Mediumwechsel und nach weiteren 2 Tagen das Passagieren.

3.2.1.3.2 Kultivierung der Zellen

Die RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen wurden bei 37 °C und 10 % CO₂ in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/10 ml Kultivierungsmedium (DMEM, 10 % FCS, 4 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 1 mM G418-Sulfat) in einer 10 cm-Zellkulturschale kultiviert. Alle 4 Tage erfolgte das Passagieren der Zellen. Dafür wurden die Zellen mit 37 °C warmer Trypsin/EDTA-Lösung (0,1 % (w/v) Trypsin-EDTA in PBS) für 5 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und anschließend in 10 ml Wachstumsmedium gelöst. Die Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität erfolgte am Casy® Cell Counter.

Für Stimulationsversuche erfolgte die Aussaat in einer Zelldichte von 7×10^4 Zellen/cm² in einer 24-well bzw. 96-well Platte. Nach Erreichen der Zellsubkonfluenz (nach 24 h) wurde das serumhaltige Medium durch serumarmes, phenolrotfreies Medium (DMEM, 0,1 % FCS, 4 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 1 mM G418-Sulfat) substituiert und weiterhin für 24 h inkubiert. Fortführend wurden die Zellen entsprechend der jeweiligen Versuchsbedingungen behandelt.

3.2.2 Zellbasierte Experimente

3.2.2.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit Zellen anhand ihrer Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaften und der intrazellulären Zusammensetzung zu unterscheiden. Dabei werden die Zellen einzeln im Probenstrom von einem Laserstrahl erfasst, wodurch die

gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert wird (Luttmann et al., 2006).

Die zu untersuchten Reporterzellen NF- κ B/293/GFP-LucTM und NF- κ B/Jurkat/GFP-LucTM exprimieren GFP unter Kontrolle des NF- κ B-Signalweges. Aufgrund dieser Eigenschaft konnte untersucht werden, inwiefern die Stimulanzen Einfluss auf den NF- κ B-Signalweg nehmen. Dazu wurden die NF- κ B/293/GFP-LucTM-Zellen 24 h mit den jeweiligen Proben stimuliert, spezifisch abgelöst und in 300 μ l PBS gelöst. Die NF- κ B/Jurkat/GFP-LucTM-Zellen wurden nach 24-stündiger Stimulation mit den Proben in ein Eppendorf-Tube überführt, für eine Minute bei 300 x g zentrifugiert und das Zellpellet in 300 μ l PBS gelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension mit dem Durchflusszytometer FACSCalibur der Firma BD Biosciences analysiert. Die Messung erfolgte anschließend mit zellspezifischen Einstellungen für Signalverstärkung, Kompensation und Grenzwerte. Als Auswertungssoftware wurde Cell Quest Pro verwendet.

3.2.2.2 SEAPorterTM-Assay Kit

Die quantitative Bestimmung der sezernierten alkalischen Phosphatase (SEAP) erfolgte mithilfe des SEAPorterTM-Assay Kits. Durch die Zugabe von para-Nitrophenylphosphat (pNPP) wird die Hydrolyse von pNPP durch das sezernierte Protein SEAP katalysiert, wodurch es zur Bildung eines Farbumschwunges von farblos zu gelb kommt. Diese Farbbildung kann mittels Spektrophotometer bei einer Absorption von 405 nm gemessen werden.

Die murinen RAW/NF- κ B/SEAPorterTM-Zellen wurden nach 24-stündigem Serumentzug für weitere 24 h in phenolrotfreiem Medium mit den jeweiligen Proben stimuliert. Anschließend wurde der Überstand der Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt. In einer 96-well Platte wurden pro Well 10 μ l Überstand mit 10 μ l Reinstwasser gemischt und bei 65 °C für 30 min inkubiert, sodass mögliche endogene alkalische Phosphatasen inhibiert wurden. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 μ l pNPP pro Well. Die Absorption wurde bei 405 nm nach 1,5 h am FLUOstar Optima gemessen. Um die Freisetzung der SEAP quantitativ zu bestimmen, wurde ein SEAP-Protein-Standard (0 – 200 ng SEAP/ml) unter den gleichen Bedingungen mitgeführt. Mithilfe einer Eichkurve erfolgte die quantitative Bestimmung des SEAPs im Zellkulturüberstand.

3.3 Aufreinigung des Nahrungsmittelextraktes

3.3.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Zur Charakterisierung der Brotkruste und Isolierung der bioaktiven Komponente wurde der Brotkrustenextrakt hinsichtlich seiner Hydrophobizität chromatographisch aufgetrennt. Dazu wird die Probe mittels einer mobilen Phase in das System eingeschleust und unter hohem Druck durch eine entsprechende Säule (stationäre Phase) gedrückt. Zwischen den Bestandteilen der Probe

und der stationären Phase entstehen Wechselwirkungen, sodass die Probe verzögert aus der Säule eluiert und durch einen anschließenden Detektor erkannt wird.

Für die vorliegende Arbeit wurde eine RP-HPLC an einem Agilent 1200 HPLC System durchgeführt, welches aus folgenden Einheiten besteht: Entgaser, Binäre Pumpe, automatischer Probengeber mit Thermostatisiereinheit, Thermostatisierter Säulenofen, Diodenarray-Detektor, Fluoreszenzdetektor und einem analytischen Fraktionssammler. Die Kontrolle aller Instrumente, sowie die Datengenerierung und –Auswertung erfolgte über die Chemstation B.03.02.

400 µl des Brotkrustenextraktes wurde in einer 1400 µl Schleife eingeführt und auf die semi-präparative Säule Zorbax 300SB-C18 (Narrow Bore RR; 2,1 x 100 mm; 3,5 µm) gegeben. Durch einen linearen Gradienten von 0 % bis 40 % Acetonitril/0,1 % TFA in 40 min erfolgte die chromatographische Auftrennung der Brotkruste (Tabelle 1). Anhand des Diodenarray-Detektors konnte ein spezifisches Proteinprofil der Brotkruste erstellt werden, da die Absorption von 214 nm charakteristisch für Peptidbindungen ist. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen des Fluoreszenzdetektors wurden den spezifischen AGE-Fluoreszenzwerten (Exc./Em. 360/440 nm) angepasst.

Tabelle 1: Übersicht der Laufbedingungen zur Auftrennung der Brotkruste mittels RP-HPLC

Bedingung		
Flow	4 ml/min	
Laufmittel	99,9 % H ₂ O/0,1 % TFA	
Temperatur	50 °C	
DAD	214 nm	
FLD	360 nm Anregung/440 nm Emission	
Druck	max. 400 bar	
Injektion	400 µl	
Gradient	0 min	100 % H ₂ O/0,1 % TFA 0 % Acetonitril/0,1 % TFA
	40 min	60 % H ₂ O/0,1 % TFA 40 % Acetonitril/0,1 % TFA

Zur Isolierung der bioaktiven Komponenten des Brotkrustenextraktes wurde ein Fraktionssammler eingesetzt, der basierend auf der Absorption von 214 nm (Peptidbindung) 31 Fraktionen sammelte. Die genaue Zeittafel des Fraktionssammlers ist in Tabelle 2 angegeben. Insgesamt wurden 10 Läufe à 31 Fraktionen durchlaufen. Alle Fraktionen der 10 Läufe wurden anschließend mittels Festphasenextraktion (siehe Kapitel 3.3.2) entsalzt und durch eine anschließende Vakuumzentrifugation bei 60°C aufkonzentriert.

Tabelle 2: zeitliche Übersicht der gesammelten Fraktionen der Brotkruste mittels RP-HPLC

Fraktions-Nr. #	Anfangszeit (min)	Endzeit (min)	Fraktions-Nr. #	Anfangszeit (min)	Endzeit (min)
1	5,6	6,25	17	13,46	14,30
2	6,25	6,70	18	14,31	14,85
3	7,00	7,40	19	14,86	15,25
4	7,41	7,83	20	15,60	16,38
5	7,84	8,02	21	16,39	17,18
6	8,03	8,27	22	18,50	18,80
7	8,28	8,60	23	19,33	20,15
8	8,61	8,93	24	20,58	21,20
9	9,13	9,70	25	23,50	24,40
10	9,71	10,42	26	24,80	25,20
11	10,43	10,80	27	28,50	30,00
12	10,81	11,27	28	30,01	31,10
13	11,29	11,55	29	31,11	32,20
14	11,87	12,49	30	33,00	34,00
15	12,50	13,00	31	34,01	35,25
16	13,01	13,45			

3.3.2 Festphasenextraktion (*Solid-Phase Extraction*)

Die Festphasenextraktion wurde im Anschluss an die RP-HPLC durchgeführt, um eine Aufkonzentrierung der Fraktionen zu erreichen. Dabei wurden die SPE-Säulen zuerst mit 3 ml 60 % Acetonitril aktiviert, mit 8 ml Reinstwasser gewaschen und erneut aktiviert. Anschließend wurden alle Läufe der gleichen Fraktion auf die Säule gegeben und mit 1 ml 60 % Acetonitril eluiert.

3.3.3 TCA-Fällung

Die Methode der Trichloressigsäure-(TCA)-Fällung ermöglicht die Ausfällung und Aufkonzentrierung von Proteinen in einer wässrigen Lösung. Dafür wurde 375 µl der löslichen Brotkruste mit 125 µl 40 %-iger TCA-Lösung vermischt und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 20.000 x g für 5 min. Das Pellet wurde zweimal mit jeweils 250 µl eiskaltem Aceton gewaschen und erneut bei 20.000 x g für 15 min zentrifugiert. Das gewaschene Protein-Pellet wurde an der Luft getrocknet und in 200 µl Reinstwasser resuspendiert.

3.3.4 Boronsäuren-Affinitäts-Chromatographie

Mittels der Boronsäuren-Affinitäts-Chromatographie ist es möglich, AGE-modifizierte Proteine von nicht-AGE-modifizierten Proteinen zu trennen (Frolov und Hoffmann 2008). Dafür wird eine

Trägersubstanz mit Boronsäure ummantelt, sodass AGE-modifizierte Proteine über cis-diol Bindungen an die Boronsäure der Agarose binden können. Somit kann eine Trennung zu nicht-AGE-modifizierten Proteinen vorgenommen werden. Eine schematische Darstellung des Vorgangs ist in Abbildung 4 dargestellt.

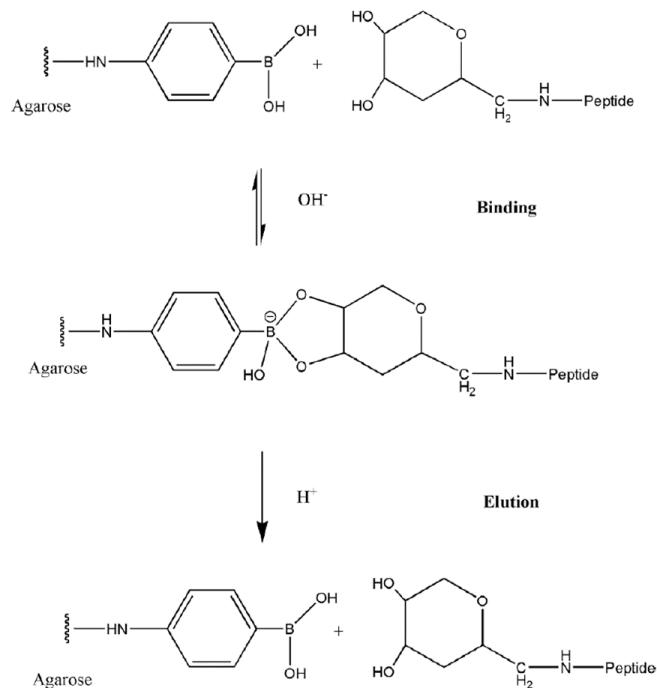


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Bindung von AGE-modifizierten Proteinen an Boronsäure-gekoppelte Agarose (Takátsy et al. 2009)

Boronsäure-gekoppelte Agarose wurde in eine leere Säule (Macherey-Nagel) überführt und mit 25 ml Waschpuffer (250 mM Ammoniumacetat; 50 mM Magnesiumchlorid; pH = 8,1) gereinigt. Anschließend wurden 1 ml Brotkrustenextrakt mit 1,5 ml Waschpuffer vermischt und 1,5 h bei 4 °C inkubiert. Alle ungebundenen Proteine wurden mithilfe von 10 ml Waschpuffer ausgewaschen und als Fraktion W gelagert. Die Trennung der cis-diol Bindungen zwischen Boronsäure und AGE-modifizierten Proteinen erfolgte durch Zugabe von 10 ml Eluierungspuffer (250 mM Essigsäure), sodass AGE-modifizierte Proteine als Fraktion E für weitere Versuche verwendet wurden. Ein Sorbitolpuffer (200 mM D-Sorbitol) wurde ebenfalls benutzt, um die restlichen AGE-modifizierten Proteine zu eluieren. Zur Neutralisierung und weiteren Aufkonzentrierung der verschiedenen Proben wurde eine Festphasenextraktion, gefolgt von einer Vakuumzentrifugation bei 60 °C und 20.000 x g durchgeführt. Alle Pellets wurden am Ende in 50 µl PBS resuspendiert.

3.3.5 Immunopräzipitation

Bei der Methode der Immunopräzipitation (IP) kommt es zur Ausfällung des löslichen Antigens mittels Antikörpers. Durch den Antikörper-Antigen-Komplex wird ein bestimmtes Protein aus einem Probengemisch isoliert und anschließend mittels Gelelektrophorese charakterisiert.

Für die IP wurde 1 ml des Brotkrustenextraktes mit 1 ml 2x IP-Puffer gemischt und anschließend 30 µl des Antikörpers S3B512 (anti-γ-Gliadin) hinzugefügt. Der Protein-Antikörper-Mix wurde für vier Stunden bei 4 °C im Überkopffroller inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl Protein-G gekoppelter Agarose (Behringer), welche vorher in 1x IP-Puffer gereinigt wurde. Dieser Protein-Antikörper-Agarose Mix wurde erneut bei 4 °C über Nacht rotierend inkubiert, um den spezifischen Antikörper-Protein-Mix auszufällen. Um alle ungebundenen Proteine zu entfernen wurde der Protein-Antikörper-Agarose Mix dreimal mit 500 µl 1x IP-Puffer gewaschen (Zentrifugation bei 600 x g für eine Minute). Zur Abtrennung des Agarose-Antikörper-Mix von dem Protein wurde das gereinigte Pellet denaturiert. Dafür wurde das Pellet in 35 µl 2x Ladepuffer gelöst, für fünf Minuten bei 95 °C gekocht und bei 600 g für eine Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde als Gliadin-freie BCE-Fraktion und das Eluat als Gliadin-reiche BCE-Fraktion bezeichnet.

2x IP-Puffer

100 mM Tris-HCL (pH=7,5)
300 mM NaCl
2 mM Na-EDTA

1x IP-Puffer

50 mM Tris-HCL (pH=7,5)
150 mM NaCl
1 mM Na-EDTA

3.4 Analytische Methoden

3.4.1 Herstellung von Proteinlysaten

Zur Gewinnung von Proteinlysaten aus NF-κB/293/GFP-LucTM- und RAW/NF-κB/SEAPorterTM-Zellen wurde das Medium von den kultivierten Zellen abgesaugt und in 30 µl 1x RIPA-Puffer mit 10 mM PMSF aufgenommen. Im Falle der NF-κB/Jurkat/GFP-LucTM-Zellen wurden die kultivierten Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 2000 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das enthaltene Pellet wurde in 30 µl 1x RIPA-Puffer mit 10 mM PMSF gelöst. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proteinlysate bei -20°C gelagert.

3.4.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mit Hilfe des PierceTM-BCA-Protein-Assay Kits durchgeführt. Das Prinzip dieser Bestimmung beruht auf die Reduzierung der zweiwertigen Kupfer-Ionen (Cu²⁺) zu einwertigen Kupfer-Ionen (Cu⁺) in Anwesenheit von Proteinen. Das entstandene Cu⁺ bildet

zusammen mit der Bicinchoninsäure einen violetten Farbkomplex, der bei einer Absorption von 562 nm quantitativ bestimmt werden kann.

Zur Bestimmung wurden die Proben bzw. Zellysate jeweils in einer 1:25 bzw. 1:12,5 Verdünnung in PBS eingesetzt. Als Arbeitsreagenz wurden pro 25 µl Probe 200 µl BCA-Lösung (bestehend aus Reagenz A [enthält die Bicinchoninsäure] und Reagenz B [enthält Kupfersulfat] in einem Verhältnis von 50:1) verwendet. Nach 30-minütiger Inkubation bei 60 °C erfolgte die Messung des Farbumschwunges spektrophotometrisch am Absorptionsmaximum von 570 nm. Als Standard wurde eine BSA-Eichgerade mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 und 2000 µg Protein/ml) mitgeführt, sodass die Proteinkonzentration der Proben anhand der Eichgerade ermittelt werden konnten.

3.4.3 Fluoreszenzmessung AGE-modifizierter Proteine

Der relative AGE-Gehalt der Proben wurde durch die Messung der AGE-Fluoreszenz untersucht. Dafür wurden die verwendeten Proben 1:80 verdünnt und mittels des ELISA-Readers FLUOstar Optima im 96-well Maßstab analysiert. Hinsichtlich der Autofluoreszenz AGE-modifizierter Proteine wurden zwei verschiedene Anregungs-/Emissionswellenlängen benutzt. Bei 330/405 nm wurden spezifische AGEs, wie Arg-Pyrimidin und Pentosidin, gemessen. Die Erfassung der gesamten AGE-Gehalte in den Proben erfolgte durch Messung bei 360/440 nm (Beisswenger et al. 2012). Anschließend wurden die Fluoreszenzwerte auf den jeweiligen Proteingehalt der Probe normalisiert.

3.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Trennung der Proteine anhand ihrer Molekülmasse erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli 1970). Dafür wurden Trenn- und Sammelgele mit unterschiedlichem Acrylamidgehalten gegossen, deren genaue Zusammensetzung in Tabelle 3 zusammengefasst wurde.

Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Trenn- und Sammelgele in der SDS-PAGE

Trenngel (5ml)			Sammelgel (5ml)	
	10 % Gel	12,5 % Gel	5 % Gel	
Reagenzien	Volumen	Volumen	Reagenzien	Volumen
Wasser	2,35 ml	2,10 ml	Wasser	3,40 ml
40 % Acrylamide Mix	1,25 ml	1,50 ml	40 % Acrylamid Mix	0,83 ml
1,5 M Tris (pH=8,8)	1,30 ml	1,30 ml	1,0 M Tris (pH=6,8)	0,63 ml
10 % SDS	50 µl	50 µl	10 % SDS	50 µl
10 % APS	50 µl	50 µl	10 % APS	50 µl
Temed	2 µl	2 µl	Temed	5 µl

Die Proteinlysate wurden mit einem 5x SDS-Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C im Thermocycler erhitzt. Das im Probenpuffer enthaltene SDS führte zu einer negativen Ladung der Proteine. Durch das Erhitzen und der Zugabe von β -Mercaptoethanol erfolgte die Denaturierung der Proteine, was eine Auftrennung hinsichtlich der molekularen Größe ermöglichte. Pro Probe wurden 5 µg Protein aufgetragen. Unter Verwendung der Mini-Protean® 2-D Elektrophorese-Kammer wurde die Elektrophorese mit 1x Laufpuffer zunächst für 30 min bei 60 V gestartet, um alle Proteinproben im Sammelgel zu fokussieren. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine für ca. 60 min bei 130 V im Trenngel. Zur Größenbestimmung der Proteine wurde ein kommerzieller Proteingrößenmarker benutzt.

5x SDS-Ladepuffer

1 M Tris/HCL pH 6,8
 25 % (v/v) β -Mercaptoethanol
 50 % (v/v) Glycerol
 10 % (w/v) SDS
 1 mg Bromphenolblau

10x Laufpuffer (pH 8,3)

0,25 M Tris
 1,92 M Glycerol
 1,5 % (w/v) SDS

→ Vor der Verwendung wurde der 10x Puffer 1:10 mit Reinstwasser verdünnt

3.4.5 Coomassie Färbung

Die kolloidale Coomassie-Färbung der PAGE-Gele beruht auf dem Anlagern des Farbstoffs Coomassie-Blau an die basischen Seitenketten der Aminosäuren. Dadurch werden die Proteine unspezifisch gefärbt und durch anschließendes Entfärben sichtbar.

Die Gele wurden zuerst mit 2 % Phosphorsäure und 50 % Ethanol für 2 h fixiert. Anschließend erfolgte ein Waschschrift (2 % Phosphorsäure) für 1 h und die Inkubation der Gele mit einem Sensibilisierungspuffer für 20 min. Über Nacht wurden die Proteine mittels der Coomassie-Blau-Färbelösung (0,1 % Coomassie-Blau G250 in Sensibilisierungspuffer) inkubiert und durch erneutes Waschen mit Wasser und 20 % Ethanol für jeweils 10 min entfärbt.

Sensibilisierungspuffer

17 % Ethanol
 15 % Ammoniumsulfat
 2 % Phosphorsäure

3.4.6 Western Blot und Immunodetektion

Der Western Blot ermöglicht die Identifizierung und Quantifizierung spezifischer Proteine innerhalb eines Proteingemisches. Dabei werden nach vollendeter Elektrophorese die Proteine auf eine Membran transferiert (Western Bot) und anschließend mittels spezifischer Antikörper detektiert (Immunodetektion).

Mittels des *Semi-dry*-Verfahrens wurden die Proteine der SDS-PAGE auf eine PVDF-Transfermembran übertragen, die vor Benutzung mit Methanol aktiviert wurde. Für den Aufbau des *Semi-dry*-Verfahrens wurden 6 Blotpapiere mit einer Dicke von jeweils 0,35 mm benutzt, um eine ausreichende Leitfähigkeit zu gewährleisten (Abbildung 5). Die untersten zwei Blotpapiere wurden in Transferpuffer I, Blotpapier Nr. 3, das Gel, sowie die aktivierte Membran in Transferpuffer II und die letzten 3 Blotpapiere in Transferpuffer III äquilibriert. Anschließend erfolgte der Transfer für 60 min bei einer konstanten Spannung von 1,2 mA/cm².

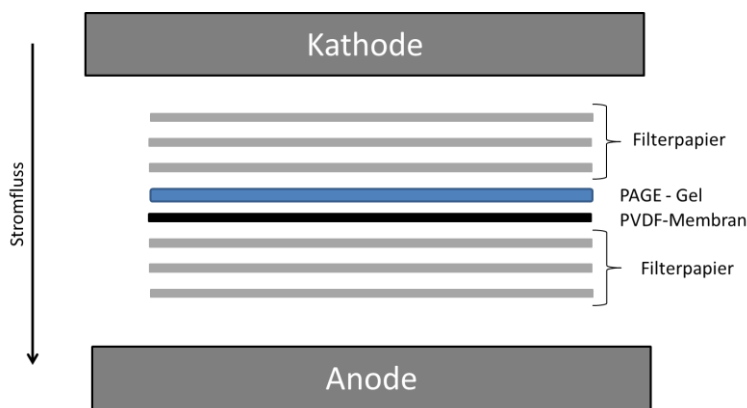


Abbildung 5: Schematische Darstellung des *Semi-dry*-Verfahrens

Transferpuffer I

0,3 M Tris (pH=10,4)
 10 % Methanol

Transferpuffer II

25 mM Tris/HCL (pH=10,4)
 10 % Methanol

Transferpuffer III

25 mM Tris/HCL (pH=9,4)
 40 mM 6-Amino-n-Caprinsäure
 10 % Methanol

Zur Überprüfung des Transfers wurde die Membran anschließend mit Amidoschwarz (0,1 % Amidoschwarz, 25 % 2-Propanol, 10 % Essigsäure) gefärbt. Durch mehrmaliges Waschen mit destilliertem Wasser erfolgte das Visualisieren der geblotteten Proteine.

Nach Entfärbung der PVDF-Membran mit Wasser wurden alle unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran mit einer 5 %-igen BSA-Lösung für 60 min bei Raumtemperatur blockiert und anschließend mit dem gewünschten primärem Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 min mit TBS-T erfolgte eine erneute Inkubation mit dem sekundären HRP-gekoppelten Antikörper für 60 min bei Raumtemperatur. Die Membran wurde dreimal mit TBS-T und einmal mit TBS für jeweils 5 min gewaschen. Die Visualisierung der spezifischen Proteinbanden erfolgte durch eine ein-minütige Inkubation einer Luminollösung mit 2,5 mM H₂O₂ und anschließender Chemilumineszenz-Detektion am Image Reader LAS-3000. Die Banden wurden mittels AIDA Software densitometrisch ausgewertet. Eine Übersicht der verwendeten primären und sekundären Antikörper ist in der Tabelle 4 dargestellt.

10x TBS-T

0,1 M Tris/HCL (pH=7,6)

1,5 M NaCL

1 % (v/v) Tween® 20

1x TBS

10 mM Tris/HCL (pH=7,6)

150 mM NaCL

Luminollösung

0,4 mM Cumarsäure

2,5 mM Luminol

→ Vor der Verwendung wurde
der 10x Puffer 1:10 mit
Reinstwasser verdünnt

3.4.7 Strippen von PVDF-Membranen

Um die Detektion von mehreren Proteinen hintereinander zu ermöglichen, wurde die PVDF-Membran nach erfolgreicher Immunodetektion gestrippt.

Dafür wurde die Membran 30 min mit einer Stripping-Lösung bei 50 °C schüttelnd inkubiert, sodass der primäre Antikörper von der Membran gewaschen wurde. Nach mehrmaligem Waschen mit Reinstwasser konnten die freien Bindungsstellen auf der PVDF-Membran erneut blockiert und die Inkubation mit dem neuen primären Antikörper erfolgen. Zur Berechnung der relativen Phosphorylierungsrate eines bestimmten Proteins erfolgte die Normalisierung der phosphorylierten Proteine auf die nicht-phosphorylierte Form der Proteine.

Stripping-Lösung

83 mM Tris/HCL pH 6,8

9,3 mM β-Mercaptoethanol

2,7 % SDS

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten primären und sekundären Antikörper

Primärer Antikörper	Firma	Verdünnung	Sekundärer Antikörper	Verdünnung	Spezifität
phospho p44/p42-MAPKinase (ERK1/2)	Cell Signaling	1 : 2.000	anti-rabbit	1 : 20.000	p-p42/44
phospho-p38-MAPKinase	Cell Signaling	1 : 1.000	anti-rabbit	1 : 20.000	p-p38
ERK-2-MAPKinase (C-14)	Santa Cruz,	1 : 1.000	anti-rabbit	1 : 20.000	p42
p38-MAPKinase	Cell Signaling	1 : 1.000	anti-rabbit	1 : 20.000	p38
CML2868	HTC Forschungslabor, Deutschland	1 : 10.000	anti-rabbit	1 : 20.000	CML
Arg-Pyrimidin	Biologo, Deutschland	1 : 2.000	anti-mouse	1 : 10.000	Arg-Pyrimidin
Pentosidin	Biologo, Deutschland	1 : 500	anti-mouse	1 : 10.000	Pentosidin
3-DG-Imidazolon	Biologo, Deutschland	1 : 500	anti-mouse	1 : 10.000	Imidazolon
Basilic	Kooperation Frankreich	1 : 2.000	anti-rabbit	1 : 20.000	α/β -Gliadin
PQQ3B4	Kooperation Frankreich	1 : 1.000	anti-mouse	1 : 10.000	γ -Gliadin
S3B512	Kooperation Frankreich	1 : 1.000	anti-mouse	1 : 10.000	deam. γ -Gliadin
Koblé	Kooperation Frankreich	1 : 1.000	anti-mouse	1 : 10.000	γ -Gliadin, N-terminal
Fromager	Kooperation Frankreich	1 : 4.000	anti-rabbit	1 : 20.000	ω 2-Gliadin
Elstar	Kooperation Frankreich	1 : 1.000	anti-rabbit	1 : 20.000	ω 5-Gliadin
OCT5C6B8	Kooperation Frankreich	1 : 1.000	anti-mouse	1 : 10.000	ω 5-Gliadin, C-terminal
ONT18A5	Kooperation Frankreich	1 : 1.000	anti-mouse	1 : 10.000	ω 5-Gliadin, N-terminal

3.4.8 Spot-Blot-Methode (Vakuum-Blot-System)

Die Spot-Blot-Methode kann ebenfalls zur Quantifizierung spezifischer Proteine eines Proteingemisches herangezogen werden, wobei es hier zu keiner elektrophoretischen Auftrennung kommt. Die Proteine werden nicht denaturiert und liegen daher in ihrer nativen Form vor. Das Spot-Blot-System besteht aus zwei Modulen, zwischen denen sich die PVDF-Transfermembran befindet. Das untere Modul stellt eine Auffangschale dar, die mit einem Vakuum-System verbunden ist. Das obere Modul enthält die Apparatur zur Probenauftragung, die in diesem Fall in punktförmigen Auftragskanälen erfolgt. Durch Anlegen des Vakuums können die Proteine auf der darunterliegenden PVDF-Transfermembran geblottet werden.

Die PVDF-Transfermembran wurde vor der Benutzung mit Methanol aktiviert und zusammen mit einem dicken Filterpapier (2,5 mm Dicke) in PBS äquilibriert. In der Spot-Blot-Apparatur wird unter

der aktivierten Membran das Filterpapier und auf die aktivierte Membran das Gitter mit den punktförmigen Auftragskanälen (Spots) gelegt. Nach dem Zusammenbauen der Apparatur wurden die Spots mit jeweils 200 µl PBS gespült. Pro Probe wurde jeweils 5 µg Protein in einem Volumen von 170 µl in die jeweiligen Slots pipettiert und durch das Vakuum auf die Membran geblottet. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschrift mit 200 µl PBS/Spot. Nach Abbau der Apparatur wurde die Membran mit Amidoschwarz gefärbt, in destilliertem Wasser entfärbt und mit Hilfe des Image Reader LAS-3000 dokumentiert. Analog zu der Western Blot Methode (Kapitel 3.4.6) konnten die fixierten Proteine mithilfe der Immunodetektion sichtbar gemacht werden. Dabei diente die Amidoschwarz-Färbung als Normalisierung für die Signale der spezifischen Proteine.

3.4.9 Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR)

Die Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR) wurde im Nationalen Institut für Agronomieforschung (INRA) in Nantes (Frankreich) in der Arbeitsgruppe *Edifices lipoprotéiques et protéopolysaccharidiques* unter Leitung von Dr. Marion durchgeführt. Die Methode der FTIR ermöglicht die Bestimmung der Sekundärstruktur eines Proteins. Dabei werden von dem Spektrometer Infrarotstrahlen (2,5 µm – 700 nm) ausgesandt, die je nach Zusammensetzung der Probe absorbiert und transmittiert werden. Dadurch kommt es in einer Probe zu verschiedenen Schwingungen zwischen den Atomen chemischer Bindungen, welche gemessen und mithilfe des Michelson Interferometer in ein spezifisches Absorptionsspektrum umgerechnet (Fourier Transformation) werden. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der OMNIC™ Spectra Software. Anschließend wurden die Spektren mit Referenzspektren verglichen.

Die Messung der Infrarotabsorption wurde an einem Nicolet Magna-IR 550 Spektrometer Serie II mit einem MCT Detektor durchgeführt, welches mithilfe von Flüssigstickstoff gekühlt wurde. Die Proben wurden vor Gebrauch mittels Festphasenextraktion (Kapitel 3.3.2) entsalzt und in 80 % Acetonitril/20 % Wasser/0,09 % TFA aufgenommen. Für die Messung wurden 20 µl Probe mit Stickstoff verdampft. Anschließend wurde ein Spektrum von 4000 – 650 cm⁻¹ aufgenommen und mittels Fourier Transformation die Interferogramme in ein Frequenzspektrum umgerechnet. Um eine Strukturaufklärung hinsichtlich der Proteine durchzuführen, wurden die Spektren der Peptidbindungen berücksichtigt. Tabelle 5 stellt die verschiedenen Peptidbindungen mit den zugehörigen Wellenzahlen dar.

Tabelle 5: Übersicht der spezifischen Schwingungen zur Proteinstrukturaufklärung mittels FTIR

	Wellenzahl (cm ⁻¹)	Schwingungen spezifischer Peptidbindungen
Amid I Schwingung	1690 – 1600	C=O; N-H; C-H
Amid II Schwingung	1575 – 1480	N-H; C-H
Amid III Schwingung	1300 – 1229	C-N; N-H; C=O; O=C-N

3.4.10 Aminosäurenanalyse

Die Aminosäurenanalyse wurde im Nationalen Institut für Agronomieforschung (*INRA*) in Nantes (Frankreich) in der Arbeitsgruppe *Edifices lipoprotéiques et protéopolysaccharidiques* unter Leitung von Dr. Marion durchgeführt. Zur Bestimmung der relativen Aminosäurezusammensetzung des verwendeten Brotkrustenextraktes erfolgte eine Aminosäurenanalyse mithilfe der RP-HPLC. Diese Analyse gliedert sich in zwei Abschnitte: der erste Abschnitt umfasst die Hydrolyse, wodurch die Proteine (Peptide) in einzelne Aminosäuren zerlegt werden. Im zweiten Schritt kommt es zur Auftrennung, Detektion und Quantifizierung der vorhandenen Aminosäuren.

Für die Durchführung der Analyse wurden 50 µl des Brotkrustenextraktes in einem Hydrolyseröhrchen mithilfe des Pico Tag™ & Vacuum Station getrocknet und anschließend mit 200 µl 6 N HCL für 24 h bei 110 °C unter Vakuum erneut hydrolysiert. Für die spätere Bestimmung der einzelnen Aminosäuren wurden 2,5 µmol/ml Aminosäurestandard H zur hydrolysierten Probe gegeben. Anschließend erfolgte ein weiterer Trocknungsschritt mittels eines Gemisch aus Ethanol, Wasser und Triethylamin im Verhältnis von 2:2:1, um die hydrolysierten Aminosäuren zu deprotonisieren und eine Derivatisierung mit Phenylisothiocyanat (PITC) zu begünstigen. Die Derivatisierung erfolgte mittels eines Gemisches aus Ethanol/Wasser/Triethylamin/PITC in einem Verhältnis von 7:1:1:1 für 60 min unter Vakuum. Die Auftrennung der derivatisierten Aminosäuren wurde mittels RP-HPLC durchgeführt. Dafür wurde die getrocknete Probe in 200 µl des Puffers (95 % 2 mM Dinatriumhydrogenphosphat pH=7,4; 5 % Acetonitril) gelöst. Die genauen Laufbedingungen sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Übersicht der Laufbedingungen für die Aminosäurenanalyse

Bedingung	
Flow	1 ml/min
Laufmittel	232 mM Dinatriumhydrogenphosphat pH=6,4/ 3,6 mM Triethylamin
Temperatur	38 °C
DAD	245 nm
Druck	Max. 400 bar
Injektion	4 µl

Die Detektion der Aminosäuren erfolgte mithilfe eines Gradienten aus 2 mM Dinatriumhydrogenphosphat und Acetonitril (Tabelle 7) unter Verwendung einer C18 Pico-tag®-Säule (3 µm; 150 x 4,6 mm; Waters). Anhand des mitgeführten Aminosäurenstandards H konnten die spezifischen Aminosäuren quantifiziert werden.

Tabelle 7: Übersicht des Gradienten für die Aminosäurenanalyse

Zeit (min)	Flow (ml/min)	% Laufmittel A (232 mM C ₂ H ₃ NaO ₂ pH=6,4/ 3,6 mM TEA)	% Laufmittel B (60 % Acetonitril)
0	1,0	100	0
1,0	1,0	100	0
11,0	1,0	54	46
11,5	1,0	0	100
13,0	1,5	0	100
13,5	1,5	100	0
21,0	1,5	100	0

3.4.11 Proteinidentifizierung mittels LC-MS/MS

Die Proteinidentifizierung des Brotkrustenextraktes erfolgte in Zusammenarbeit mit der *plate-forme Biopolymères Biologie Structurale* des Nationalen Instituts für Agronomieforschung (INRA) in Nantes (Frankreich). Dazu wurde der Brotkrustenextrakt zuvor in einer 10 %-igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine mittels Coomassie-Färbung visualisiert. Die interessanten Proteinbanden wurden ausgeschnitten und unter Verwendung von Ammoniumbicarbonat entfärbt. Eine anschließende Inkubation der Proben mit DTT führte zur Reduzierung der Disulfidbindungen, gefolgt von einer Alkylierung der Cysteinseitenketten mittels Iodoacetamid. Durch Zugabe von Trypsin erfolgte der Proteinverdau bei 37 °C über Nacht. Eine Zugabe von 0,1 % Ameisensäure stoppte den Proteinverdau. Die Proben wurden anschließend in ein Ultimate U3000 RSLC System (Dionex) eingeschleust, welches mit einem LTQ-Orbitrap VELOS Massenspektrometer (Thermo Fisher) gekoppelt war. Mittels

Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) erfolgte die Strukturaufklärung des Brotkrustenextraktes. Die Verwendung der Xcalibur 2.1 Software ermöglichte die Datenerfassung der verschiedenen Massen. Die Identifizierung erfolgte über die Suchmaschine Mascot mit einer Suche in der Datenbank *TIGR TriticumTC*.

3.4.12 Nachweis von AGEs mittels HPLC-MS/MS

Die Bestimmung der AGEs im Brotkrustenextrakt erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Smuda aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Marcus A. Glomb am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Halle. Als Ausgangsbasis für die Analyse erfolgte eine Proteinfällung des löslichen Brotkrustenextraktes mithilfe von Ethanol. Die qualitative Bestimmung der vorhandenen AGEs wurde von der Arbeitsgruppe durchgeführt, wobei sie Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie koppelten (HPLC-MS/MS).

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 RNA-Isolierung

Um die RNA aus den verwendeten Zelllinien zu extrahieren erfolgte zuerst eine Trizolaufreinigung mit dem TRIzol® Reagenz. Dazu wurde das Medium der konfluenten Zellen vollständig entfernt und die Zellen mit PBS gespült. Anschließend wurde 1 ml TRIzol® Reagenz/10 cm² direkt zu den adhären Zellen pipettiert, um eine Denaturierung und Inaktivierung aller RNasen zu gewährleisten. Das entstandene Zellysate wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, 200 µl Chloroform hinzugefügt und gut gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur wurde das TRIzol-Chloroform-Gemisch für 15 min zentrifugiert (20.000 x g; 4 °C), sodass eine Phasentrennung erfolgte. Aufgrund dieser Phasentrennung war es möglich die RNA in der oberen wässrigen Phase von DNA und Protein in der intermediären und unteren phenolhaltigen Phase zu trennen. Die weitere RNA Aufreinigung erfolgte unter Verwendung des RNA-MiniPrep™ Kits nach Angaben des Herstellers. Dafür wurde die obere wässrige Phase auf eine Zymo-Spin-Säule gegeben, an der die RNA binden kann. Dies wurde durch Zugabe von Ethanol begünstigt. Durch weitere Ethanol- und Waschschrinen mit bestimmten Puffern erfolgte die Reinigung der gebundenen RNA von restlichen Zellbestandteilen. Abschließend wurde 25 µl RNase-freies Wasser benutzt, um mit Hilfe der Zentrifugation (2 min; 20.000 x g; 4 °C) die gereinigte RNA zu eluieren.

3.5.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Reinheit und Konzentration der extrahierten RNA wurde mittels NanoDrop® bestimmt und benötigte 2 µl der jeweiligen RNA-Probe. Die Methode basiert auf der Messung der optischen

Dichte am Absorptionsmaximum (260 nm Wellenlänge) der Nukleinsäuren. Dabei entspricht eine $OD_{260nm} = 1$ einer Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA, was zur Berechnung der RNA-Konzentration herangezogen wurde. Eine zusätzliche Messung der Absorption bei 280 nm gibt Aufschluss über mögliche Proteinverunreinigungen der Probe. Der Quotient aus OD_{260nm}/OD_{280nm} sollte daher zwischen 1,8 und 2,0 liegen, um eine gute RNA-Reinheit zu gewährleisten.

3.5.3 Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription wird die extrahierte RNA unter Verwendung einer reversen Transkriptase in eine cDNA umgeschrieben, welche anschließend als *template* für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) diene.

Für die cDNA Synthese wurden 500 ng RNA mit 5 μl 5x Erststrangpuffer, 1 μl Random Primer und 6 μl DECP-Wasser vermischt und für 10 min bei 72°C im Thermocycler inkubiert (Tabelle 8). Anschließend erfolgte die Kühlung auf 4 °C und die Zugabe von 10 mM dNTPs und 100 Units der M-MLV-reversen Transkriptase. Durch erneutes Erhitzen auf 42 °C für 35 min wurde die Umschreibung in cDNA begünstigt und anschließend durch eine zwei-minütige Erhitzung auf 95 °C beendet. Die somit synthetisierte cDNA wurde bei -20 °C gelagert und als *template* für die PCR benutzt.

Tabelle 8: Zusammensetzung des RT-PCR Mixes für einen Reaktionsansatz

1. Mix		2. Mix	
Reagenzien	Volumen	Reagenzien	Volumen
RNA (100 ng/ μl)	5 μl	Erststrangpuffer (5x)	2,0 μl
Erststrangpuffer (5x)	3 μl	dNTPs	1,0 μl
Random Primer	1 μl	Reverse Transkriptase (200 Units/ μl)	0,5 μl
Nuklease-freies Wasser	6 μl	Nuklease-freies Wasser	6,5 μl

3.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Untersuchung der Expression bestimmter Zielgene wurde die cDNA in einer semi-quantitativen PCR eingesetzt. Das Prinzip der PCR beruht auf einer exponentiellen Vervielfältigung der DNA zum Nachweis unmessbar kleiner Mengen an DNA. Dies wird durch einen wiederkehrenden Zyklus aus drei verschiedenen Schritten bewerkstelligt.

Nach einem initialisierenden Denaturierungsschritt (95 °C, 3 min) erfolgten drei verschiedene Schritte in einem Primer-spezifischen Zyklus: Als erstes fand die Trennung der komplementären Stränge (Denaturierung) bei 95 °C für 30 sec statt. Anschließend wurde die Temperatur auf die

Primer-spezifische Annealing-Temperatur (Tabelle A12) gesenkt, sodass die Primer an der DNA binden (Hybridisierung). Durch eine Temperaturerhöhung auf 72 °C wurde abschließend die Elongation durchgeführt, da bei dieser Temperatur das Temperaturoptimum der Polymerase erreicht ist. Durch die Wiederholung dieser Schritte wird eine exponentielle Vervielfältigung der DNA erreicht. Die PCR wurde mittels PCR Mastermix (50 Units/ml Taq DNA Polymerase, 400 µM dNTPs, 3 mM MgCl₂) und der spezifischen *sense* und *antisense* Primer (10 pmol/l) in einem Gesamtvolumen von 25 µl durchgeführt. Die genaue Zusammensetzung des PCR Mixes ist in Tabelle 9 angegeben.

Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Reagenzien für einen PCR-Ansatz

Reagenzien	Volumen
PCR Mastermix	12,5 µl
sense Primer 10 µM	1,0 µl
antisense Primer 10 µM	1,0 µl
cDNA	3,0 µl
DEPC-behandeltes Wasser	7,5 µl

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden anschließend mit 5 µl 6x Orange-G Ladepuffer versetzt und 10 µl des Probengemisches auf ein 1 %-iges Agarose-Gel aufgetragen. Gleichzeitig wurde ein 100 bp Größenmarker im Gel mitgeführt. Zur Visualisierung wurde dem Agarose-Gel 1 % (v/v) Ethidiumbromidlösung hinzugegeben. Die Größentrennung erfolgte in einer horizontalen Elektrophoresekammer (Wide Mini-Sub® Cell GT) in 1x TAE Puffer für 20 min bei 80 V. Mit Hilfe des Image Reader LAS-3000 wurden die amplifizierten DNA-Fragmente sichtbar gemacht und unter Verwendung der AIDA Software die mRNA-Konzentration der bestimmten Zielgene semi-quantifiziert. Zur Berechnung der relativen mRNA-Konzentration wurden alle Werte der Zielgene auf die Werte der 18s rRNA normiert.

6x Orange G Ladepuffer

10 mM Tris/HCL pH=7,6
60 mM EDTA pH=8
60 % (v/v) Glycerol
0,15 % Orange G

50x TAE Puffer

2 M Tris
50 mM EDTA
5,7 % (v/v) Essigsäure

→ Vor der Verwendung wurde der 50x Puffer 1:50 mit Reinstwasser verdünnt

3.6 Statistik

Die statistische und graphische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mithilfe der Sigma-Plot Software. Alle Daten wurden auf Normalverteilung untersucht. Im Fall einer Normalverteilung erfolgte die Überprüfung der statistischen Signifikanz mithilfe des *student-t-tests*. Die Werte der Messungen wurden in dem Fall als arithmetisches Mittel (MW) \pm Standardfehler (SEM, *standard error of mean*) angegeben und graphisch als Säulendiagramm gekennzeichnet. Lagen die Daten nicht-normalverteilt vor, so erfolgte die Überprüfung der möglichen Signifikanzen mithilfe des *Mann-Whitney Rank Sum Test*, gefolgt durch die graphische Darstellung anhand eines Box-plots. In diesem Fall sind die Daten als Median (50 % Perzentile) und 25/75 % Quantil dargestellt.

Die verschiedenen Signifikanzniveaus werden wie folgt gekennzeichnet: Irrtumswahrscheinlichkeit p kleiner als 5 % als * $p < 0,05$, sowie p kleiner als 0,1 % als ** $p < 0,001$.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung des Brotkrustenextraktes

Im Zuge einer Kooperation mit Frau Prof. Dr. Somoza der Universität in Wien wurde der Arbeitsgruppe ein Brotkrustenextrakt zur Verfügung gestellt, welcher zu 90 % aus Roggenmehl und zu 10 % aus Weizenmehl bestand. Für die Versuche wurde der lyophilisierte Extrakt in einer Konzentration von 250 mg/ml eingewogen und in PBS gelöst. Unter Verwendung des Pierce™-BCA-Protein Assay-Kits konnte ein Proteingehalt von ca. 15 mg/ml bestimmt werden. Als weitere Strukturaufklärung der enthaltenen Proteine im Brotkrustenextrakt, wurde in Kooperation mit der INRA Frankreich, Nantes, eine FTIR-Messung durchgeführt (Abbildung 6). Als Referenzprotein wurde ein klassisches Weizenprotein, das Gliadin, gewählt, welches in aufgereinigter Form vorlag. Verglichen zum Referenzprotein zeigte der Brotkrustenextrakt dabei eine relativ geringe Proteinkonzentration, da das Signal der Amidbanden (1200 – 1600 cm^{-1}) nur sehr schwach zu sehen waren. Im Gegensatz dazu war ein starkes Signal im Wellenzahlbereich von 800 - 1200 cm^{-1} zu sehen, was auf einen hohen Kohlenhydratgehalt im Brotkrustenextrakt hinweist.

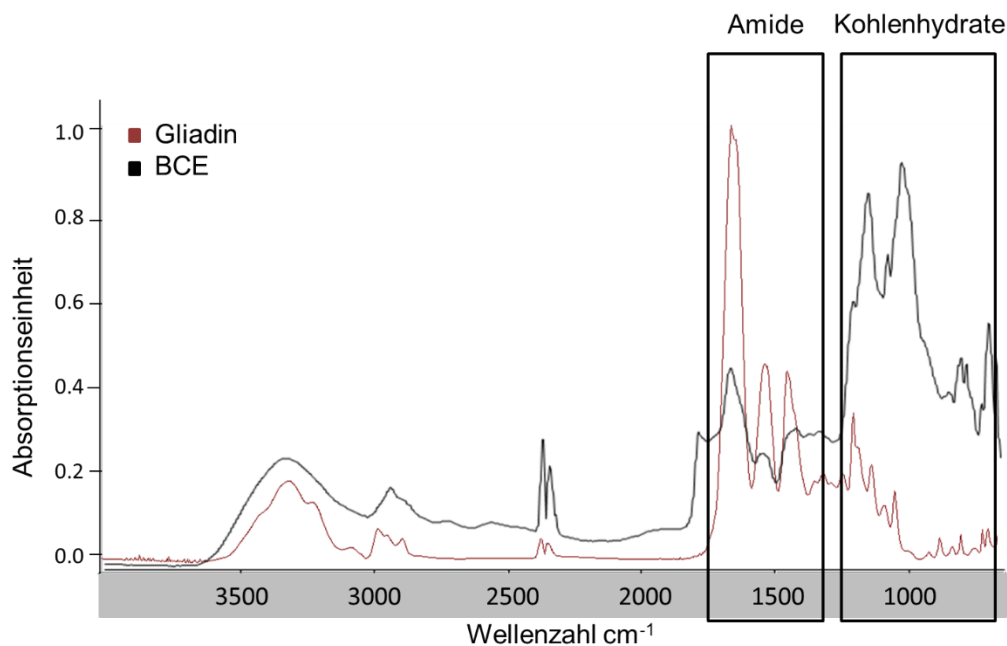


Abbildung 6: FTIR-Spektrum des Brotkrustenextraktes verglichen zum Referenzprotein Gliadin

Der Brotkrustenextrakt (BCE) wurde mittels Festphasenextraktion entsalzt. Die Aufnahme des FTIR-Spektrums des Brotkrustenextraktes verglichen zum Referenzprotein Gliadin erfolgte am Nicolet Magna-IR 550 Spektrometer. Das Spektrum des Brotkrustenextraktes ist in schwarz und das des Gliadins in rot dargestellt. Die charakteristischen Bereiche der Amidbanden und Kohlenhydrate sind mittels Kästchen gekennzeichnet.

4.1.1 Proteinidentifizierung mittels LC-MS/MS und Aminosäurenanalyse

Im Zuge einer Kooperation mit der INRA Nantes erfolgte die Proteinidentifizierung des Brotkrustenextraktes mittels LC-MS/MS. Dabei wurde der Brotkrustenextrakt, als auch das Eluat der Boronsäuren-Affinitäts-Chromatographie (BAC), für die Analyse herangezogen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt. In beiden Ausgangsproben (Brotkrustenextrakt und Eluat der BCA) konnte im Spot 4 als Hauptkomponente γ -Gliadin-Präkursor identifiziert werden. Des Weiteren konnten α -Amylase-Inhibitor, rRNA N-Glykosidase, *Early-methionine labelled* (Em) Protein (ein Glykoprotein im reifenden Weizenembryo) und hochmolekulare (HMW) Glutenin-Untereinheiten bestimmt werden. Im Spot 1 des Eluats der BAC konnten nur HMW Glutenin-Untereinheiten identifiziert werden. Der Spot 2 beider Proben lieferte keine identifizierbaren Proteine.

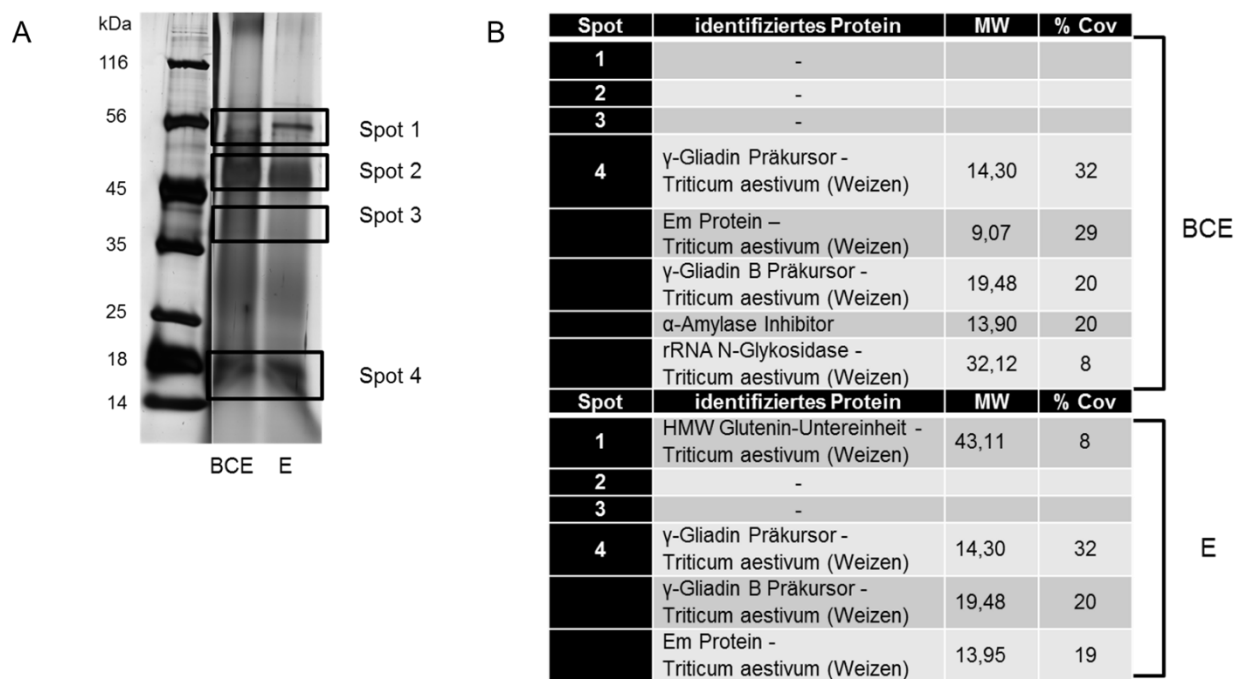


Abbildung 7: Proteinidentifizierung des Brotkrustenextraktes und des Eluats der BAC mittels LC-MS/MS

(A) Darstellung der ausgeschnittenen Proteinbanden (Spot 1 – 4) des zuvor elektrophoretisch aufgetrennten Brotkrustenextraktes (BCE) und der Fraktion E (Eluat der BAC). (B) Proteinidentifizierung der Proteinbanden mittels LC-MS/MS.

Eine anschließende Analyse der Aminosäurezusammensetzung (Tabelle 10) des Brotkrustenextraktes zeigte einen hohen Gehalt an Glutamin/Glutaminsäure und Prolin (34 % und 20,43 %). Lysin und Arginin machten 2,9 % und 1,68 % der Gesamtaminosäuren des löslichen Brotkrustenextraktes aus.

Tabelle 10: Ergebnisse der Aminosäurenanalyse des löslichen Brotkrustenextraktes

Der lösliche Brotkrustenextrakt wurde mittels 6 N HCL für 24 h hydrolysiert und anschließend unter Zugabe von PITC derivatisiert. Die Quantifizierung der Aminosäuren erfolgte mittels RP-HPLC.

Aminosäure	Fläche	%-Anteil	Aminosäure	Fläche	%-Anteil
Glutamin/ Glutaminsäure	1635,970	34,00 %	Threonin	164,009	3,41 %
Prolin	983,208	20,43 %	Lysin	139,625	2,90 %
Histidin	353,725	7,35 %	Valin	110,825	2,30 %
Phenylalanin	324,233	6,74 %	Alanin	98,164	2,04 %
Leucin	210,571	4,38 %	Isoleucin	107,192	2,23 %
Serin	194,721	4,05 %	Arginin	80,842	1,68 %
Glycin	186,827	3,88 %	Asparagin/ Asparaginsäure	51,364	1,07 %
Tyrosin	169,086	3,51 %	Methionin	1,901	0,04 %

4.1.2 Nachweis von Gliadin im Brotkrustenextrakt

Anhand der Ergebnisse der LC-MS/MS und Aminosäurezusammensetzung wurde Gliadin als mögliche Komponente des Brotkrustenextraktes identifiziert. Zur Überprüfung dieser Hypothese erfolgte eine Immunodetektion mit spezifischen Gliadin-Antikörpern, die der Arbeitsgruppe von der INRA Nantes zur Verfügung gestellt wurden.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl γ -Gliadin als auch $\omega 5$ -Gliadin in dem löslichen Brotkrustenextrakt vorhanden waren (Abbildung 8). Zusätzlich erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung des Brotkrustenextraktes. Als Positivkontrolle diente Roggenmehl und herkömmliches Gliadin, welche auf gleiche Art und Weise in PBS gelöst wurden, wie der Brotkrustenextrakt. Es konnte gezeigt werden, dass γ - und $\omega 5$ -Gliadin als auch α/β -Gliadin in dem Lebensmittelextrakt vorhanden waren. Verglichen zum Roggenmehl und herkömmlichem Gliadin war das Molekulargewicht des α/β -Gliadins in der SDS-PAGE deutlich größer.

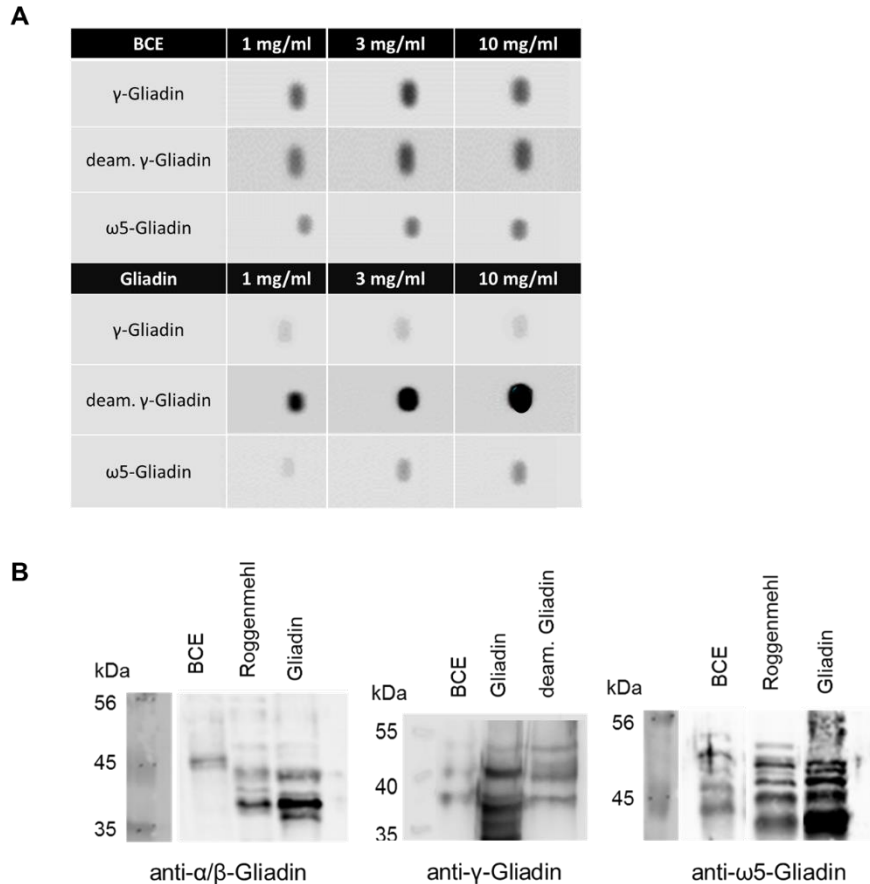


Abbildung 8: Immunodetektion von Gliadin im Brotkrustenextrakt

(A) Nachweis von γ - und ω -Gliadin im Brotkrustenextrakt (BCE) anhand der Spot-Blot-Methode. Als Positivkontrolle wurde herkömmliches Gliadin verwendet. (B) Elektrophoretische Auftrennung des Brotkrustenextraktes mittels SDS-PAGE und anschließende Immunodetektion mit Gliadin-spezifischen Antikörpern. Als Positivkontrollen wurden Roggenmehl und Gliadin verwendet. Für die Detektion von γ -Gliadin diente zusätzlich deamidiertes (deam.) Gliadin als Positivkontrolle

4.1.3 Nachweis von AGE-Modifikationen im Brotkrustenextrakt

Zum Nachweis von AGE-modifizierten Proteinen im Brotkrustenextrakt wurde unter anderem die Autofluoreszenz der modifizierten Proteine gemessen. Als Referenzprotein dieser Untersuchungen diente BSA.

Die AGE-spezifischen Fluoreszenzen (Exc./Em. 330/405 nm und 360/440 nm) zeigten im Brotkrustenextrakt ein deutlich stärkeres Signal verglichen zum BSA (Abbildung 9). Da bei der Herstellung des löslichen Brotkrustenextraktes nicht alle Proteine gelöst werden konnten, erfolgte eine Normierung der Fluoreszenzdaten auf den jeweiligen Proteingehalt. Immunodetektion mit spezifischen AGE-Antikörpern bestätigte das Vorkommen von AGEs im Brotkrustenextrakt (Abbildung 9). Der Gehalt an CML, Arg-Pyrimidin und Pentosidin nahm konzentrationsabhängig im löslichen Brotkrustenextrakt zu. Mittels Boronsäure-Affinitäts-Chromatographie (BAC) konnte gezeigt werden, dass das Eluat der BAC ein ähnliches Proteinmuster aufweist, wie der

herkömmliche Brotkrustenextrakt (Abbildung 9). Die Waschfraktion der BAC hingegen zeigte nur wenige Proteinbanden.

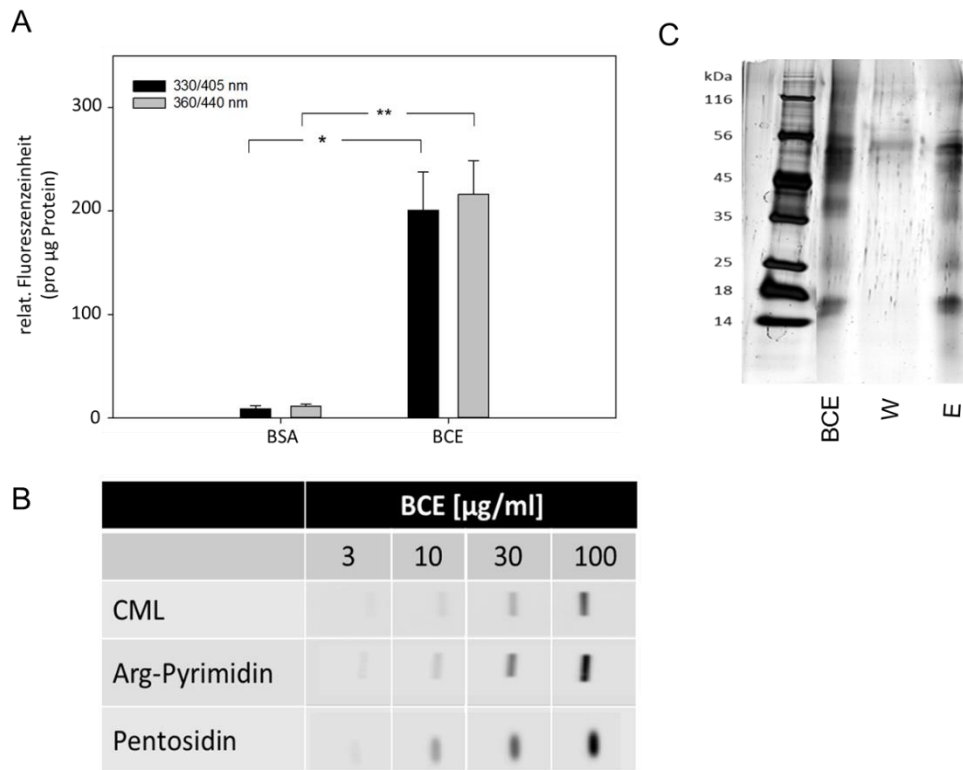


Abbildung 9: Nachweis von AGE-Modifikationen im Brotkrustenextrakt

(A) Darstellung der AGE-spezifischen Fluoreszenzen (Exc./Em. 330/405 nm und 360/440 nm) des Brotkrustenextraktes (BCE) verglichen zum Referenzprotein BSA (MW \pm SEM mit $n=3$, * $p<0,05$ und ** $p<0,001$). (B) Die Immunodetektion anhand der Spot-Blot Methode demonstriert den Nachweis von AGE-Modifikationen im löslichen Brotkrustenextrakt. (C) Die Boronsäuren-Affinitäts-Chromatographie zeigt die Trennung AGE-modifizierter von nicht-AGE-modifizierten Proteinen. Dargestellt ist die Silberfärbung der SDS-PAGE. Die Fraktion W bezeichnet die ungebundenen Proteine der Waschfraktion und die Fraktion E die AGE-modifizierten Proteine des Eluates der Boronsäuren-Affinitäts-Chromatographie.

Mittels HPLC-MS/MS, dem Goldstandard der AGE-Bestimmung wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Smuda aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Glomb am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Halle der Brotkrustenextrakt auf das Vorkommen spezifischer AGEs untersucht. Es konnten folgende AGEs qualitativ identifiziert werden: CML, CEL, N ϵ -Lactoyllysin, N ϵ -Acetyllysin, N ϵ -Formyllysin, CEA, THP, MG-H1 und Pyrallin. Der Nachweis von Pentosidin und Arg-Pyrimidin, als auch deren Quantifizierung waren nicht möglich.

4.2 Wirkung des löslichen Brotkrustenextraktes auf die NF- κ B-Aktivierung in verschiedenen Zellmodellen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zellaktivierung durch den Brotkrustenextrakt über Induktion des NF- κ B-Signalwegs untersucht. Dabei wurden drei verschiedene Reporterzelllinien verwendet, um die Wirkung der AGEs auf Immunzellen (NF- κ B/Jurkat/GFP-LucTM-Zellen, RAW/NF- κ B/SEAPorterTM-Zellen) und Nierenzellen (NF- κ B/293/GFP-LucTM-Zellen) zu untersuchen.

4.2.1 Einfluss des Brotkrustenextraktes auf die NF- κ B-Aktivierung in NF- κ B/293/GFP-LucTM-Zellen

Um die NF- κ B-Aktivierung nach 24-stündiger Inkubation mit der löslichen Brotkruste in NF- κ B/293/GFP-LucTM-Zellen zu untersuchen, wurde die GFP-Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie gemessen.

Abbildung 10 zeigt, dass der Brotkrustenextrakt in hohen Konzentrationen (300 μ g/ml und 1000 μ g/ml) zu einer signifikanten Induktion der GFP-Fluoreszenz ($p=0,022$ und $p=0,007$) in den Zellen führte. Die Stimulation der Zellen mit 1000 μ g/ml Brotkrustenextrakt erhöhte 2,5-fach die GFP-Fluoreszenz verglichen zu den unbehandelten Zellen (Kontrolle). In niedrigen Konzentrationen konnte keine Expression des GFP-Proteins gemessen werden. Eine Stimulation mit TNF- α führte zu einer starken und signifikanten Induktion der GFP-Fluoreszenz und diente als Positivkontrolle des NF- κ B-Signalweges.

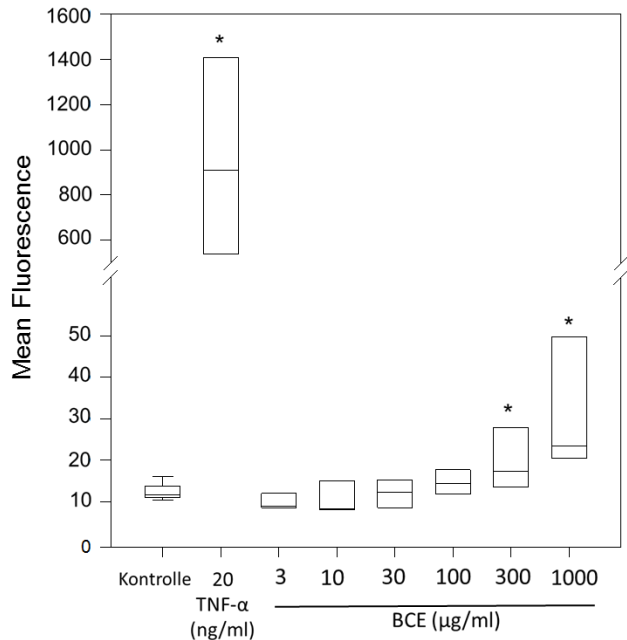


Abbildung 10: NF-κB-Aktivierung der NF-κB/293/GFP-Luc™-Zellen nach Stimulation mit dem Brotkrustenextrakt

Verglichen zu den unbehandelten Zellen (Kontrolle) wurden die NF-κB/293/GFP-Luc™-Zellen 24 h mit den angegebenen Mengen an Brotkrustenextrakt (BCE) stimuliert. Als Positivkontrolle diente TNF-α. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie erfolgte die Messung der GFP-Fluoreszenz als Maß für die Aktivierung des NF-κB-Signalweges. Die statistische Signifikanz (* $p < 0,05$, $n=3$;) bezieht sich auf die unbehandelten Zellen.

4.2.2 Einfluss des Brotkrustenextraktes auf die NF-κB-Aktivierung in NF-κB/Jurkat/GFP-Luc™-Zellen

Um die NF-κB-Aktivierung nach 24-stündiger Inkubation mit der Brotkruste in NF-κB/Jurkat/GFP-Luc™-Zellen zu untersuchen, wurde die GFP-Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie gemessen.

Die Jurkat-Zellen zeigten eine signifikante Induktion des GFPs nach Stimulation mit 20 ng/ml TNF-α, sodass dieses Zytokin als Positivkontrolle für die NF-κB-Aktivierung in diesen Zellen diente (Abbildung 11). Der Brotkrustenextrakt zeigte keine signifikante Induktion der GFP-Fluoreszenz. Eine Stimulation der NF-κB/Jurkat/GFP-Luc™-Zellen mit 100 µg/ml und 300 µg/ml Brotkruste führte zu einer tendenziellen Expression des GFPs.

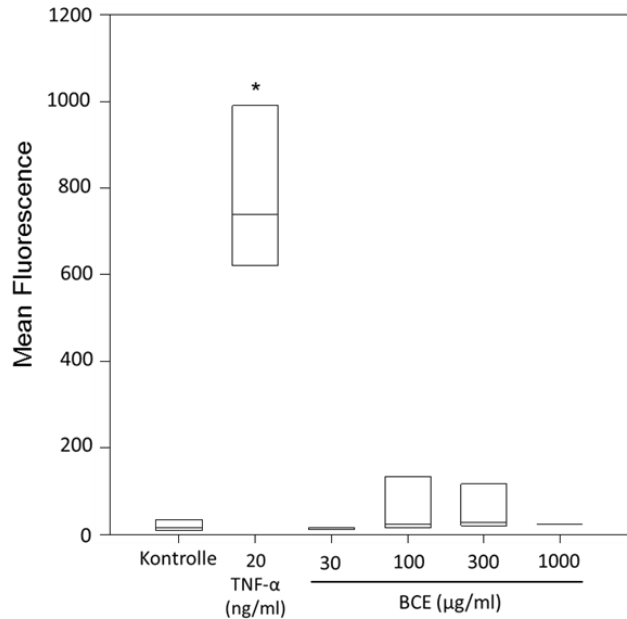


Abbildung 11: NF-κB-Aktivierung in NF-κB/Jurkat/GFP-LucTM-Zellen nach Stimulation mit dem Brotkrustenextrakt

Verglichen zu den unbehandelten Zellen (Kontrolle) wurden die NF-κB/Jurkat/GFP-LucTM-Zellen 24 h mit den angegebenen Mengen an Brotkrustenextrakt (BCE) stimuliert. Als Positivkontrolle der NF-κB-Aktivierung diente TNF-α. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie erfolgte die Messung der GFP-Fluoreszenz als Maß für die Aktivierung des NF-κB-Signalweges. Die statistische Signifikanz (* $p < 0,05$, $n = 5$) bezieht sich auf die unbehandelten Zellen.

4.2.3 Einfluss des Brotkrustenextraktes auf die NF-κB-Aktivierung in RAW/NF-κB/SEAPorterTM-Zellen

Um die NF-κB-Aktivierung nach 24-stündiger Inkubation mit der löslichen Brotkruste in RAW/NF-κB/SEAPorterTM-Zellen zu untersuchen, wurde die Menge an SEAP (sezernierte alkalische Phosphatase) im Zellkulturmedium mittels Spektrophotometrie bestimmt.

Abbildung 12 zeigt eine vermehrte Sezernierung der alkalischen Phosphatase in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentrationen. In Konzentrationen ab 30 µg/ml führte der Brotkrustenextrakt zu einer signifikanten Anreicherung von SEAP im Zellkulturüberstand. Niedrige Konzentrationen des Brotkrustenextraktes (3 µg/ml und 10 µg/ml) bewirkten keine SEAP-Anreicherung im Zellkulturüberstand. Eine Stimulation der Zellen mit 20 ng/ml LPS führte zu einer signifikanten Anreicherung von SEAP im Zellkulturüberstand und diente als Positivkontrolle des NF-κB-Signalweges.

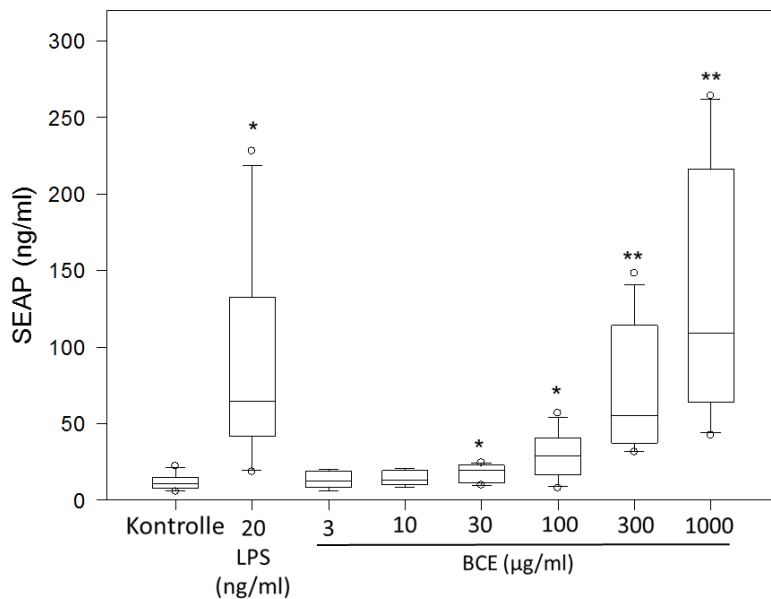


Abbildung 12: NF-κB-Aktivierung in RAW/NF-κB/SEAPorter™-Zellen nach Stimulation mit dem Brotkrustenextrakt

Unter serumreduzierten Bedingungen wurden RAW/NF-κB/SEAPorter™-Zellen für 24 h mit den angegebenen Mengen an Brotkrustenextrakt (BCE) stimuliert. Als Positiv-Kontrolle wurde 20 ng/ml LPS verwendet. Mit Hilfe des SEAPorter™-Assay Kits erfolgte die Messung der SEAP-Konzentration im Zellkulturüberstand als Maß für die Aktivierung des NF-κB-Signalweges. Die statistische Signifikanz (MW ± SEM; n=5; * p<0,05 und **p<0,001) bezieht sich auf die unbehandelten Zellen (Kontrolle).

4.2.3.1 Einfluss des Brotkrustenextraktes auf die Phosphorylierung der ERK-2-MAPKinase

Der MAPKinasen-Signalweg wird als ein wichtiger *downstream pathway* der NF-κB-Aktivierung beschrieben. Die Aktivierung dieses Signalwegs in RAW/NF-κB/SEAPorter™-Zellen wurde anhand der Phosphorylierung der ERK-2-MAPKinase untersucht.

Es zeigte sich, dass der Brotkrustenextrakt konzentrationsabhängig zu einer signifikanten Steigerung der Phosphorylierung der ERK-2-MAPKinase führte (Abbildung 13). Die Stimulation der Zellen mit 300 μg/ml Brotkrustenextrakt wies dabei mit einer 3-fachen Phosphorylierung der ERK-2-MAPKinase den stärksten Effekt auf.

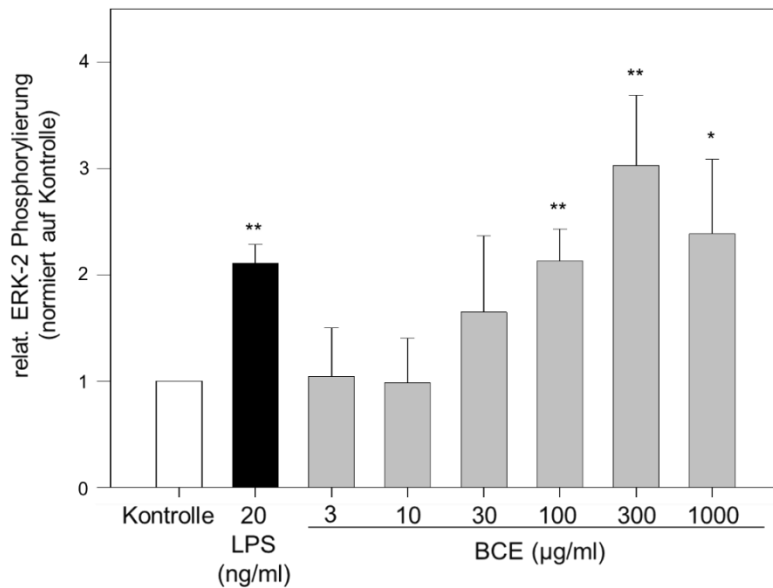


Abbildung 13: Einfluss des Brotkrustenextraktes auf die Phosphorylierung der ERK-2-MAPKinase

Unter serumreduzierten Bedingungen wurden RAW/NF- κ B/SEAPorterTM-Zellen für 10 min mit den angegebenen Mengen an Brotkrustenextrakt (BCE) stimuliert. Die Bestimmung der veränderten Kinasen-Aktivität erfolgte durch phospho-/aktivierungsspezifische Antikörper mittels Western Blot-Analyse, wobei die unbehandelten Zellen (Kontrolle) auf 1 normiert wurden (MW \pm SEM, n=3). Als Positivkontrolle diente 20 ng/ml LPS.

4.2.3.2 Einfluss des Brotkrustenextraktes auf die Phosphorylierung der p38-MAPKinase

Die Phosphorylierung der p38-MAPKinase in RAW/NF- κ B/SEAPorterTM-Zellen wird als ein weiterer wichtiger *downstream pathway* der NF- κ B-Aktivierung untersucht.

Es konnte eine tendenzielle Steigerung der Phosphorylierung der p38-MAPKinase durch den Brotkrustenextrakt in RAW/NF- κ B/SEAPorterTM-Zellen bestimmt werden (Abbildung 14). Als Positivkontrolle diente LPS. Die Stimulation der Zellen mit 500 ng/ml LPS führte zu einer 9-fachen Steigerung der p38-MAPKinasen-Phosphorylierung.

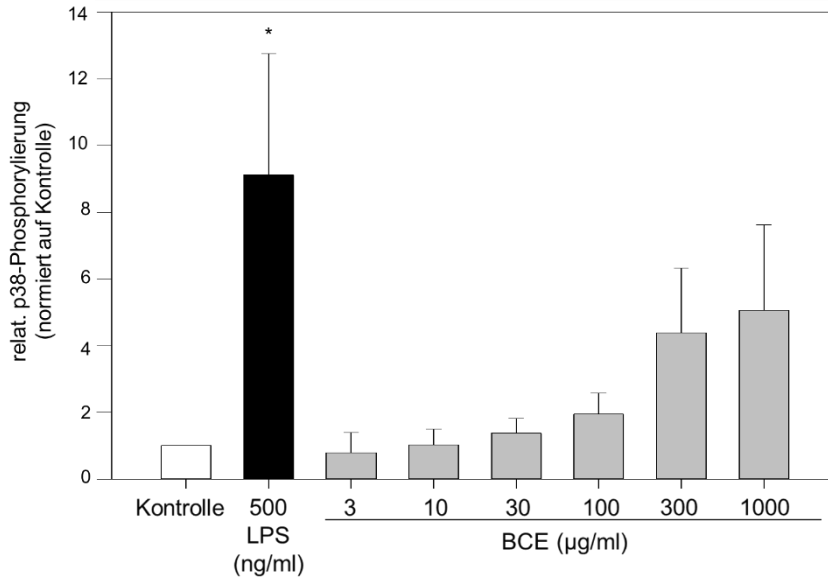


Abbildung 14: Einfluss des Brotkrustenextraktes auf die Phosphorylierung der p38-MAPKinase

Unter serumreduzierten Bedingungen wurden RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen für 10 min mit den angegebenen Mengen an Brotkrustenextrakt (BCE) stimuliert. Die Bestimmung der veränderten Kinasen-Aktivität erfolgte durch phospho-/aktivierungsspezifische Antikörper mittels Western Blot-Analyse, wobei die unbehandelten Zellen (Kontrolle) auf 1 normiert wurden (MW \pm SEM, n=3). Als Positivkontrolle diente 500 ng/ml LPS.

4.3 Chromatographische Auftrennung des löslichen Brotkrustenextraktes mittels RP-HPLC

4.3.1 Charakterisierung der chromatographisch aufgetrennten Brotkrustenextrakt-Fractionen

Zur Charakterisierung der Brotkruste und Isolierung der bioaktiven Komponente wurde der Brotkrustenextrakt hinsichtlich seiner Hydrophobizität chromatographisch aufgetrennt. Dazu wurden anhand der Absorptionmessung von 214 nm (charakteristisch für Peptidbindungen) spezifische Fraktionen der Brotkruste über die RP-HPLC gesammelt. Eine gleichzeitige Messung der spezifischen AGE-Fluoreszenz (Exc./Em. 360/440 nm) ermöglichte einen Nachweis von AGE-modifizierten Proteinen in den gesammelten Fraktionen.

Abbildung 15 zeigt ein repräsentatives RP-HPLC-DAD/FLD-Chromatogramm der 31 Fraktionen des Brotkrustenextraktes. Die Fraktionen #1 bis #9 zeigten ein deutliches Signal bei der Absorption von 214 nm, was auf einen hohen Proteingehalt hinweist. Bei den Fraktionen #17 bis #31 war kaum eine Absorption messbar. Die AGE-spezifische Fluoreszenz konnte in allen Fraktionen gemessen werden. Dabei zeigten die Fraktionen #1 bis #25 eine sehr hohe Fluoreszenzintensität, was auf einen hohen Gehalt an AGE-modifizierten Proteinen hinweist. Die Fraktionen #26 bis #31 zeigten eine geringe Fluoreszenzintensität.

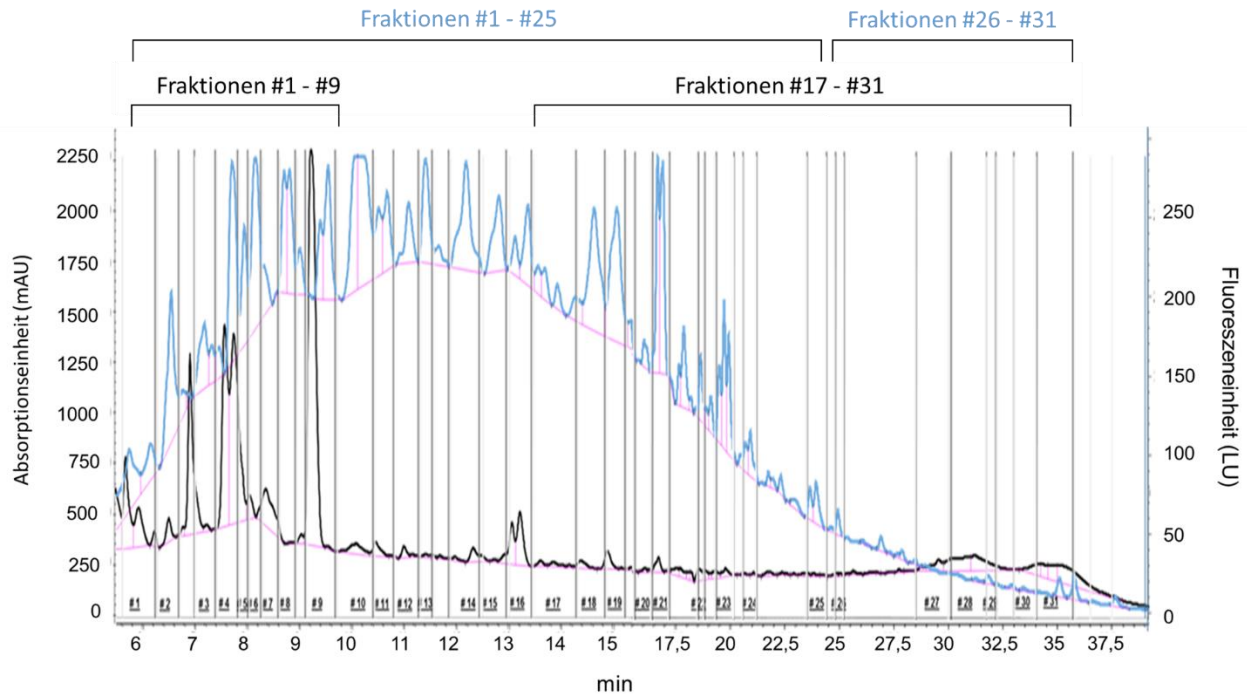


Abbildung 15: Proteinbestimmung und Fluoreszenzmessung der chromatographisch aufgetrennten Brotkrustenextrakt-Fraktionen

Der Brotkrustenextrakt wurde basierend auf die Absorption von 214 nm (charakteristisch für Peptidbindungen) chromatographisch mittels semipräparativer RP-HPLC aufgetrennt. Die Absorptionssignale sind schwarz gekennzeichnet (mAU = milli Absorptionseinheit). Die AGE-spezifische Fluoreszenz (Exc./Em. 360/440 nm) der Fraktionen wurde parallel gemessen und ist in blau dargestellt (LU = Fluoreszenzeinheit).

4.3.1.1 Nachweis von Gliadin in den aufkonzentrierten BCE-Fraktionen

Um eine analysierbare Menge an den chromatographisch aufgetrennten Brotkrustenextrakt-Fraktionen zu bekommen, wurden die einzelnen Fraktionen von zehn RP-HPLC-Läufen gesammelt und anschließend mittels Festphasenextraktion und Vakuum-Zentrifugation aufkonzentriert. Diese Fraktionen werden in den nachfolgenden Kapiteln als aufkonzentrierte BCE-Fraktionen bezeichnet.

Die RP-HPLC ermöglichte die Isolierung von 31 verschiedener Fraktionen der Brotkruste mit möglicher Bioaktivität. Da über die Aminosäurenanalyse und die Massenspektrometrie Gliadin in der löslichen Brotkruste nachgewiesen werden konnte, soll nun geprüft werden, ob in den aufkonzentrierten BCE-Fraktionen ebenfalls Gliadin nachzuweisen ist.

Mittels Spot-Blot-Methode erfolgte eine quantitative Bestimmung der relativen Gliadin-Gehalte in den aufkonzentrierten BCE-Fraktionen (Abbildung 16). In alle Fraktionen konnte ω 2- und ω 5-Gliadin nachgewiesen werden, wohingegen γ -Gliadin ausschließlich in den Fraktionen #11 bis #31 bestimmt werden konnte.

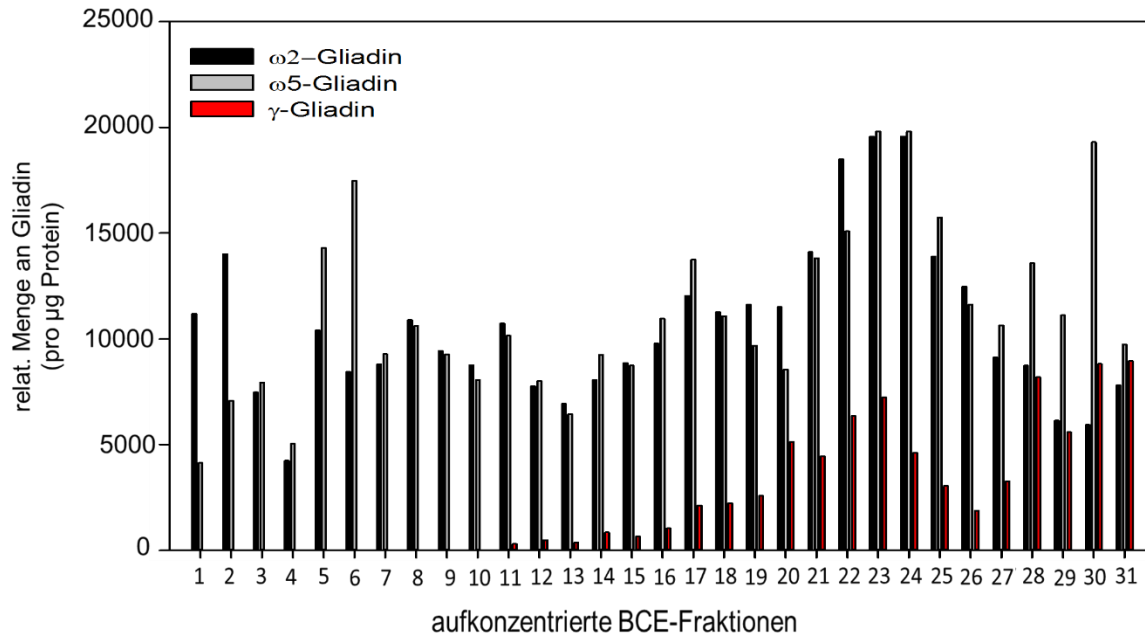


Abbildung 16: Bestimmung der relativen Menge an Gliadin in den aufkonzentrierten BCE-Fractionen

Die Bestimmung der relativen Menge an ω 2-, ω 5-, und γ -Gliadin in den aufkonzentrierten BCE-Fractionen erfolgte über die Spot-Blot-Methode. Der Gehalt an Gliadin wurde auf den entsprechenden Proteingehalt der Probe normiert.

4.3.1.2 Nachweis von AGE-Modifikationen in den aufkonzentrierten BCE-Fractionen

Um zu überprüfen ob AGE-Modifikationen in den aufkonzentrierten BCE-Fractionen vorliegen, erfolgte die Bestimmung der AGE-spezifischen Fluoreszenzen (Exc./Em. 330/405 nm und 360/440 nm) mittels Spektrophotometer. Aufgrund des unterschiedlichen Proteingehaltes der aufkonzentrierten BCE-Fractionen, wurden die Fluoreszenzwerte auf den Proteingehalt der Proben normiert.

Ähnlich zur Fluoreszenzmessung mittels RP-HPLC war über die gesamte Anzahl der aufkonzentrierten BCE-Fractionen eine Grund-Fluoreszenz beider Wellenlängenbereiche nachweisbar (Abbildung 17). Die Fractionen #3 bis #8, #11 bis #13 sowie Fraction #22 zeigten dabei die höchsten Fluoreszenzintensitäten.

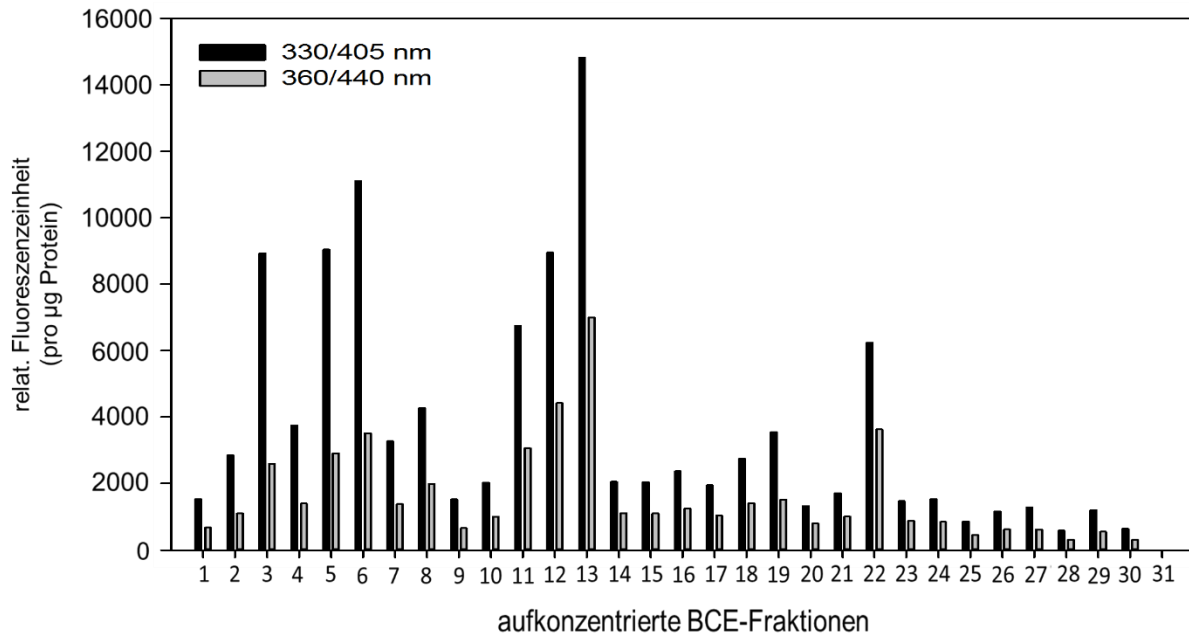


Abbildung 17: Fluoreszenzmessung der aufkonzentrierten BCE-Fractionen

Darstellung der AGE-spezifischen Fluoreszenzen (Exc./Em. 330/405 nm und 360/440 nm) der aufkonzentrierten BCE-Fractionen. Die Fluoreszenzwerte der einzelnen Fractionen wurden auf den jeweiligen Proteingehalt normiert.

Als weiterer Nachweis von AGE-Modifikationen in den aufkonzentrierten BCE-Fractionen diente die Immunodetektion. Es zeigte sich, dass die Fractionen #8 sowie #11 bis #30 Arg-Pyrimidin, CML und Pentosidin enthielten. Der größte Gehalt der genannten AGEs war in den Fractionen #17 bis #26 nachweisbar. Die Fractionen #8 und #30 enthielten CML als einzige AGE-Modifikation.

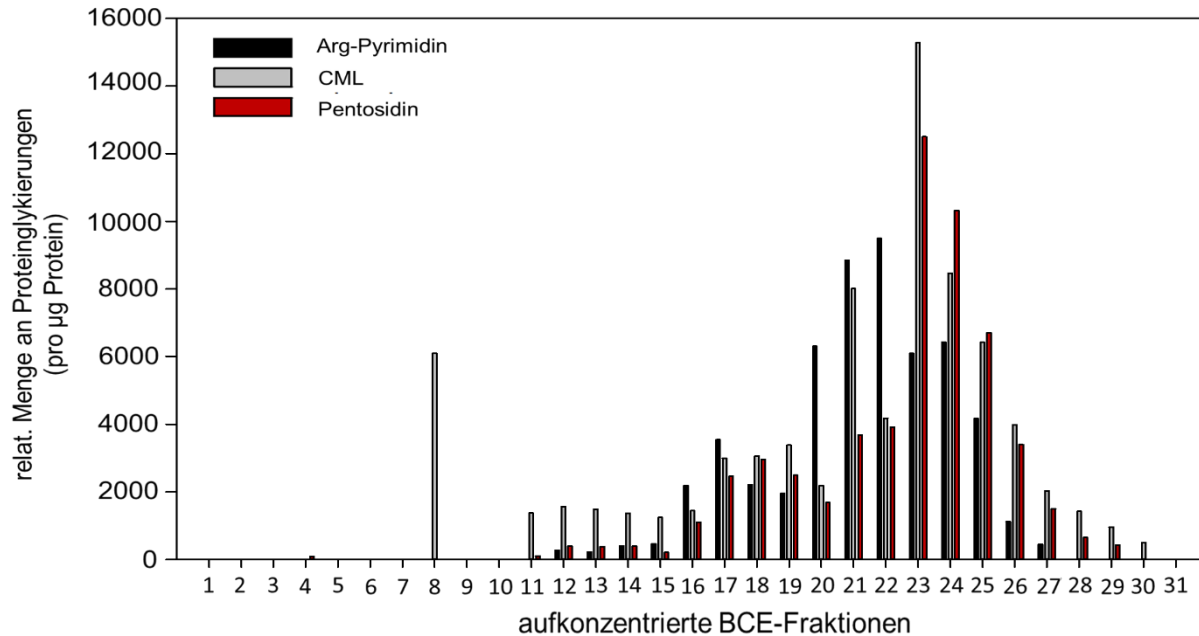


Abbildung 18: Bestimmung der relativen Menge an AGE-Modifikationen in den aufkonzentrierten BCE-Fractionen

Die Bestimmung der relativen Menge an Arg-Pyrimidin, CML und Pentosidin in den aufkonzentrierten BCE-Fractionen erfolgte über die Spot-Blot-Methode. Der Gehalt der AGE-Modifikationen (Proteinglykierung) wurde auf den entsprechenden Proteingehalt der Probe normiert.

4.3.2 Einfluss der aufkonzentrierten BCE-Fractionen auf die NF- κ B-Aktivierung in RAW/NF- κ B/SEAPorterTM-Zellen

Um zu klären, ob die aufkonzentrierten BCE-Fractionen in RAW/NF- κ B/SEAPorterTM-Zellen zu einer NF- κ B-Aktivierung führen, wurden die Zellen mit den BCE-Fractionen stimuliert und die Menge an SEAP am Spektrophotometer gemessen.

Verglichen zu den unbehandelten Zellen (Kontrolle) induzierten vereinzelte Fractionen die Freisetzung von SEAP in den Reporterzellen (Abbildung 19). Die Stimulation der Zellen mit den Fractionen #13, #14 und #16 führte zur höchsten SEAP-Menge im Zellkulturüberstand (Fraction #13: $2,44 \pm 0,41$; Fraction #14: $2,53 \pm 0,32$; Fraction: #16 $2,19 \pm 0,07$). Die Fractionen #19 und #24, welche einen hohen Gehalt an Arg-Pyrimidin, CML und Pentosidin aufwiesen, erhöhten ebenfalls signifikant den SEAP-Gehalt in den RAW/NF- κ B/SEAPorterTM-Zellen (Fraction #19: $1,57 \pm 0,19$; Fraction #24: $1,3 \pm 0,07$), jedoch in einem geringeren Ausmaß als Fractionen #13, #14 und #16. Die Stimulation der Zellen mit den vorderen Fractionen #3 sowie #5 bis #7 zeigte ebenfalls eine Anreicherung von SEAP im Zellkulturüberstand.

Durch die Messung der SEAP-Konzentration im Zellkulturüberstand der Zellen konnten somit direkte Rückschlüsse auf die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges gezogen werden. Demnach

induzieren 14 von 31 der aufkonzentrierten BCE-Fractionen die Zellkern-spezifische Translokation von NF- κ B in RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen.

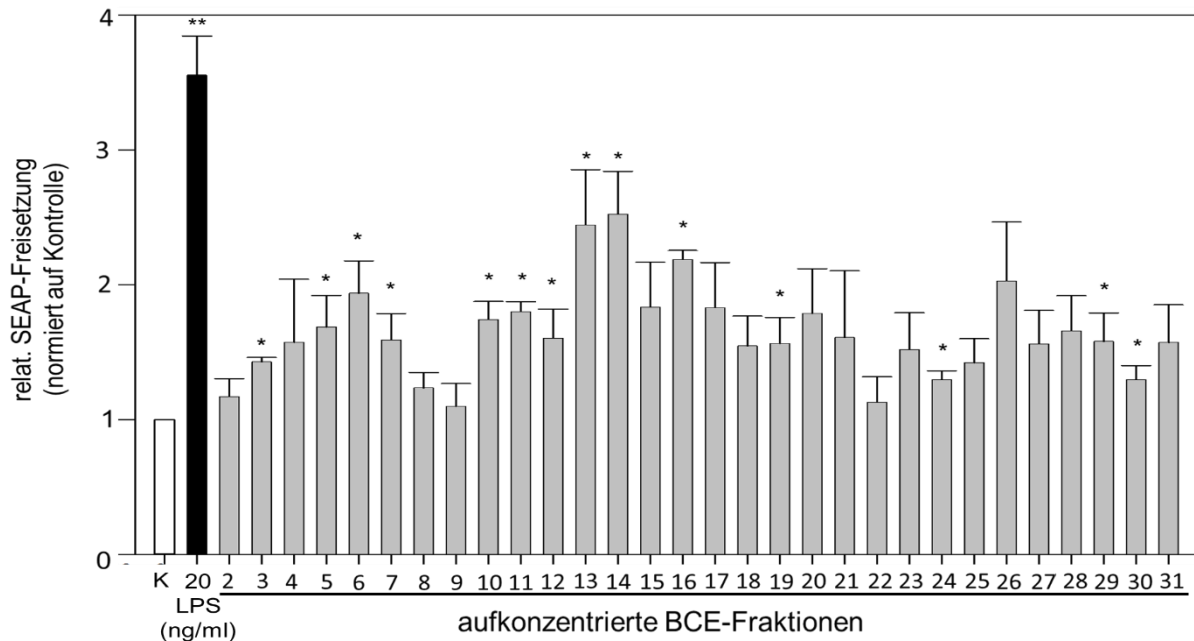


Abbildung 19: NF- κ B-Aktivierung in RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen nach Stimulation mit den aufkonzentrierten BCE-Fractionen

Unter serumreduzierten Bedingungen wurden RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen für 24 h einheitlich mit 5 % (v/v) der aufkonzentrierten BCE-Fractionen stimuliert. Als Positiv-Kontrolle wurde 20 ng/ml LPS verwendet. Mit Hilfe des SEAPorter™-Assay Kits erfolgte die Messung der SEAP-Konzentration im Zellkulturüberstand als Maß für die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges. Die statistische Signifikanz (MW \pm SEM; n=3; * p<0,05 und **p<0,001) bezieht sich auf die unbehandelten Zellen (K = Kontrolle).

4.4 Immunpräzipitation

4.4.1 Isolierung von Gliadin aus dem Brotkrustenextrakt

Anhand der LC-MS/MS-Analysen und der Immunodetektion konnte Gliadin als Komponente des Brotkrustenextraktes identifiziert werden. Um zu untersuchen, ob dieses Gliadin für die zellaktivierende Wirkung der Brotkruste in RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen verantwortlich ist, wurde Gliadin mittels Immunpräzipitation (IP) isoliert.

Die anschließende Immunodetektion der IP-Fractionen mit einem AGE-spezifischen Antikörper (anti-CML), zeigte im IP-Eluat der Positivkontrolle (Fruktose-Gliadin) markante Banden von CML-modifiziertem Gliadin mit einer molekularen Größe von 25 kDa bis 60 kDa (Abbildung 20). Aufgrund einer unzureichenden Bindung von Gliadin an den Gliadin-Antikörper während der IP waren diese Banden ebenfalls im IP-Überstand des Fruktose-Gliadins sichtbar. Verglichen zur Positivkontrolle zeigte das IP-Eluat des Brotkrustenextraktes einen Schmier von Banden im

gleichen Größenbereich. Die Negativkontrolle (ohne Antigen) wies, abgesehen von der Bande der schweren Kette des Gliadin-Antikörpers, im IP-Überstand keine charakteristischen Banden auf.

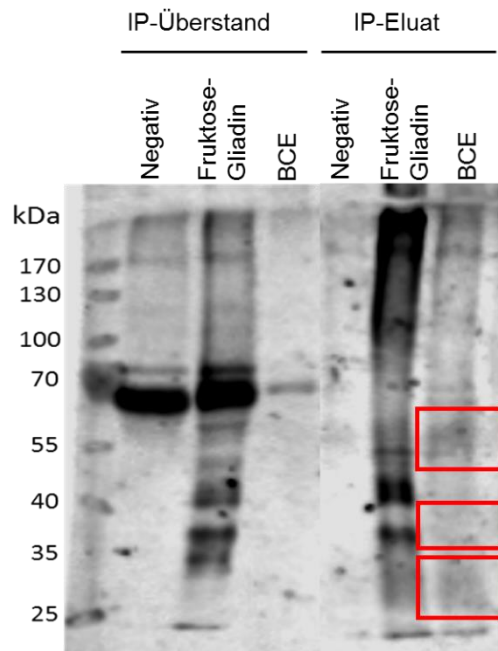


Abbildung 20: Nachweis von CML-Modifikationen in den IP-Fractionen

Durch die Immunopräzipitation (IP) erfolgte die Präzipitation von deam. γ -Gliadin aus dem Brotkrustenextrakt (BCE) und Fruktose-Gliadin. Die Immunodetektion der IP-Überstände (Gliadin-freie Fraktion) als auch der IP-Eluate (Gliadin-reiche Fraktion) ermöglichte den Nachweis von CML-Modifikationen in den Proben. Als Negativ-Kontrolle wurde eine Probe ohne Antigen verwendet. Die Kästchen markieren einen Schmier von CML-modifizierten Proteinen im IP-Eluat der Brotkruste.

4.4.2 Einfluss der Gliadin-freien BCE-Fraktion auf die NF- κ B-Aktivierung in RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen

Um zu überprüfen, ob die IP-Fractionen der Brotkruste zellaktivierend wirken, wurden RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen mit den IP-Fractionen stimuliert. Die Verwendung des IP-Eluats des Brotkrustenextraktes (Gliadin-reiche BCE-Fraktion) war aufgrund der Zytotoxizität des Elutionspuffers nicht möglich. Aus diesem Grund erfolgte die Stimulation der RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen mit dem IP-Überstand (Gliadin-freie BCE-Fraktion) im Sinne eines Gliadinausschlussverfahrens.

Die Messung der SEAP-Konzentration im Zellkulturmedium zeigte, dass der herkömmliche Brotkrustenextrakt zu einer signifikanten SEAP-Freisetzung in den RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen führte (Abbildung 21). Die Stimulation der Zellen mit der Gliadin-freien BCE-Fraktion führte zu keiner Erhöhung der SEAP-Konzentration im Zellkulturmedium. Die SEAP-Konzentration durch Stimulation mit der Gliadin-freien BCE-Fraktion unterschied sich signifikant zur Stimulation mit

dem herkömmlichen Brotkrustenextrakt ($p=0.04$). Dies zeigt, dass der NF- κ B-stimulierende Effekt der Brotkruste durch das Isolieren des CML-modifizierten Gliadins aus dem Brotkrustenextrakt gehemmt wird. Die Präzipitation der Positivkontrolle (Fruktose-Gliadin) führte zu einem ähnlichen Ergebnis. So induzierte Fruktose-Gliadin signifikant die Freisetzung von SEAP in das Zellkulturmedium. Der IP-Überstand des Fruktose-Gliadins zeigte hingegen keinen Einfluss auf die SEAP-Freisetzung in RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen.

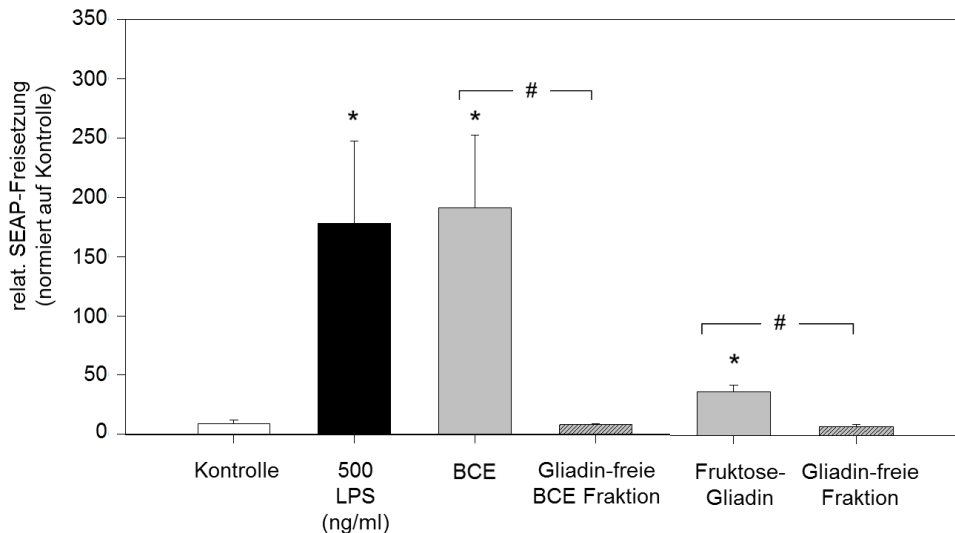


Abbildung 21: NF- κ B-Aktivierung in RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen nach Stimulation mit den IP-Überständen des Brotkrustenextraktes und des Fruktose-Gliadins

Unter serumreduzierten Bedingungen wurden RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen für 24 h mit den IP-Überständen des Brotkrustenextraktes (Gliadin-freie BCE-Fraktion) und des Fruktose-Gliadins (Gliadin-freie Fraktion) stimuliert. Als Positiv-Kontrolle wurde 500 ng/ml LPS verwendet. Mit Hilfe des SEAPorter™-Assay Kits erfolgte die Messung der SEAP-Konzentration im Zellkulturüberstand als Maß für die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges. Der Gehalt des freigesetzten SEAPs wurde auf die SEAP-Konzentration der unbehandelten Zellen (Kontrolle = 1) normiert (MW \pm SEM, n=3, * $p<0,05$, # signifikante Unterschied zwischen den angegebenen Proben mit $p<0,05$).

Um mögliche Verdünnungsfehler auszuschließen erfolgte die Charakterisierung beider Proben mittels Fluoreszenzdetektion (Abbildung 22). Verglichen zum Referenzprotein BSA zeigten der Brotkrustenextrakt als auch die Gliadin-freie BCE-Fraktion ähnliche AGE-spezifische Fluoreszenzsignale (Exc./Em. 330/405 nm und 360/440 nm). Somit sind beide Proben noch ähnlich stark AGE-modifiziert.

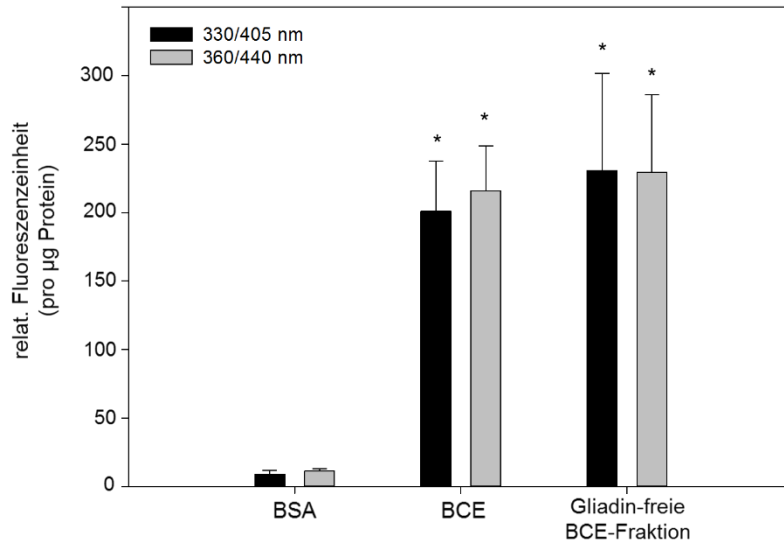


Abbildung 22: Fluoreszenzmessung des IP-Überstandes des Brotkrustenextraktes

Darstellung der AGE-spezifischen Fluoreszenzen (Exc./Em. 330/405 nm und 360/440 nm) des Brotkrustenextraktes (BCE) und des IP-Überstandes (Gliadin-freie BCE-Fraktion) verglichen zum Referenzprotein BSA. Die statistische Signifikanz bezieht sich auf das Referenzprotein BSA (MW \pm SEM, n=3, * p<0,05).

4.4.3 Einfluss der Gliadin-freien BCE-Fraktion auf die MnSOD-mRNA-Konzentration

In der Literatur konnte gezeigt werden, dass die Brotkruste die Expression von Phase-II-Enzymen, wie MnSOD und GST, bei gleichzeitiger Abnahme des Phase-I-Enzyms NADPH Cytochrome C-Reduktase induziert (Faist et al. 2002; Lindenmeier et al. 2002; Ruhs et al. 2010). Aus diesem Grund soll mittels RT-PCR untersucht werden, ob die Brotkruste und die Gliadin-freie BCE-Fraktion in RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen einen Einfluss auf die mRNA-Konzentration der Phase-II-Enzyme MnSOD, NQO-1, HO-1 und GSTM-1 zeigt.

Die Stimulation mit 2,5 % (v/v) und 5 % (v/v) Brotkrustenextrakt zeigte eine signifikante Steigerung der MnSOD-mRNA-Konzentration ($5,81 \pm 0,94$; p=0.002 und $6,09 \pm 1,27$; p=0.002), wohingegen die Gliadin-freie BCE-Fraktion zu keiner signifikant gesteigerten MnSOD-mRNA-Konzentration führte (Abbildung 23). Die Steigerung der MnSOD-mRNA-Konzentration durch Stimulation mit dem Brotkrustenextrakt unterschied sich signifikant zur Stimulation mit der Gliadin-freien BCE-Fraktion (p=0.004). Als Positivkontrolle diente 60 ng/ml LPS, welches zu einer signifikanten Erhöhung der MnSOD-mRNA-Konzentration in RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen führte.

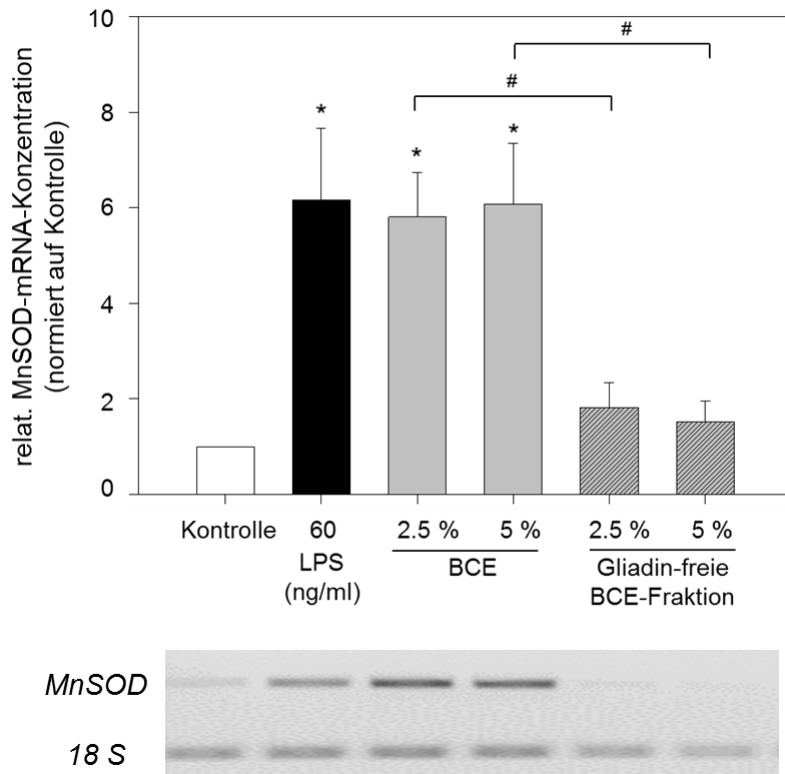


Abbildung 23: Einfluss des Brotkrustenextraktes und der Gliadin-freien BCE-Fraktion auf die MnSOD-mRNA-Konzentration

Unter serumreduzierten Bedingungen wurden RAW/NF- κ B/SEAPorterTM-Zellen für 24 h mit der Brotkruste und der Gliadin-freien BCE-Fraktion stimuliert. Die Bestimmung der MnSOD-mRNA-Konzentration erfolgte mittels RT-PCR. Als Positivkontrolle wurde 60 ng/ml LPS verwendet. Der Gehalt der MnSOD-mRNA der Proben wurde auf den MnSOD-mRNA-Gehalt der unbehandelten Zellen (Kontrolle = 1) normiert (MW \pm SEM, n=3, * p<0,05). Die statistische Signifikanz der Proben untereinander wird mit # (p<0,05) gekennzeichnet.

4.4.4 Einfluss der Gliadin-freien BCE-Fraktion auf die mRNA-Konzentration von NQO-1, GSTM-1 und HO-1

Des Weiteren soll überprüft werden, ob die Brotkruste und die Gliadin-freie BCE-Fraktion einen Einfluss auf die mRNA-Konzentration der weiteren Phase-II-Enzyme NQO-1, HO-1 und GSTM-1 in RAW/NF- κ B/SEAPorterTM-Zellen nehmen.

In Abbildung 24 konnte gezeigt werden, dass der Brotkrustenextrakte zu einer statistisch signifikanten Steigerung der NQO-1-mRNA-Konzentration führte, wobei eine Stimulation mit 2,5 % (v/v) Brotkrustenextrakt den stärksten Effekt bewirkte ($9,83 \pm 4,41$). Die Gliadin-freie BCE-Fraktion zeigte keine signifikante Steigerung der NQO-1-mRNA-Konzentration. Bezüglich der HO-1-mRNA-Konzentration bestand kein Unterschied zwischen dem Brotkrustenextrakt und der Gliadin-freien BCE-Fraktion. Beide Proben erhöhten, verglichen zu den unbehandelten Zellen (Kontrolle), statistisch signifikant die HO-1-mRNA-Konzentration, wobei eine Stimulation mit 5 % (v/v) Gliadin-freie BCE-Fraktion zur stärksten Steigerung der HO-1-mRNA-Konzentration

($3,12 \pm 1,22$) führte. Auf den GSTM-1-mRNA-Gehalt zeigten weder der Brotkrustenextrakt noch die Gliadin-freie BCE-Fraktion einen Effekt.

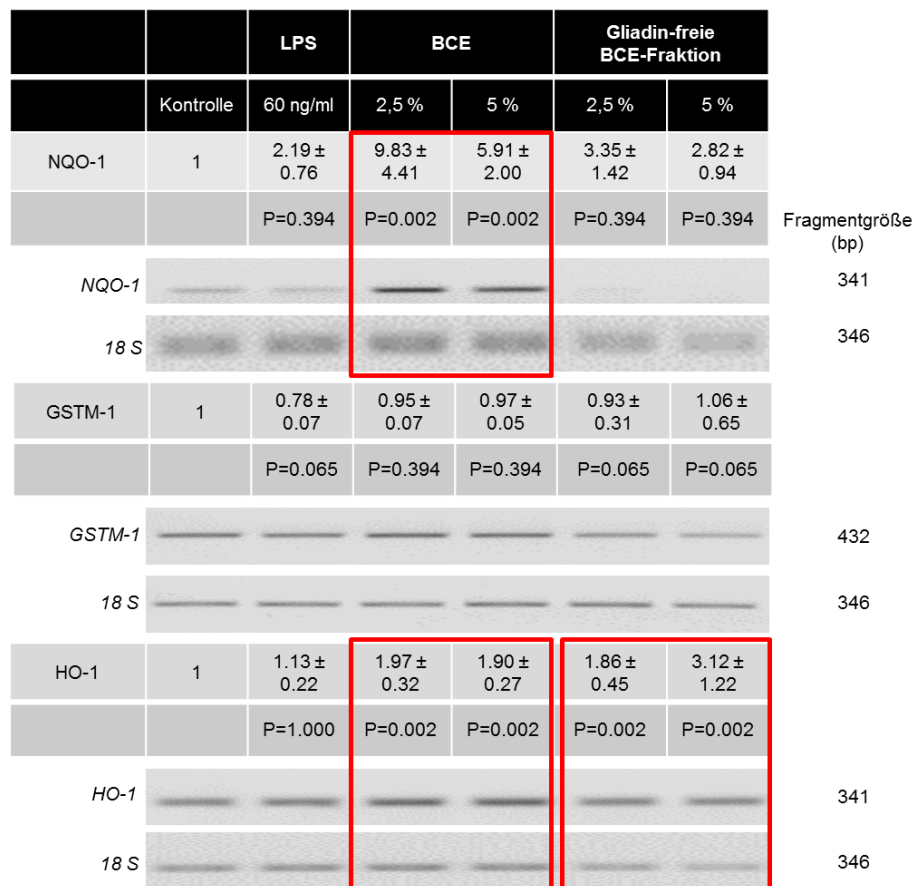


Abbildung 24: Einfluss des Brotkrustenextraktes und der Gliadin-freien BCE-Fraktion auf die mRNA-Konzentration von NQO-1, GSTM-1 und HO-1

Unter serumreduzierten Bedingungen wurden RAW/NF- κ B/SEAPorterTM-Zellen für 24 h mit der Brotkruste und der Gliadin-freien BCE-Fraktion stimuliert. Die mRNA-Konzentrationen von NQO-1, GSTM-1 und HO-1 wurden mittels RT-PCR bestimmt. Als Positivkontrolle diente 60 ng/ml LPS. Der Gehalt der spezifischen mRNAs wurde auf die mRNA-Konzentration der unbehandelten Zellen (Kontrolle = 1) normiert (MW \pm SEM, n=3). Die statistische Signifikanz (* p<0,05) wird durch rote Kästchen markiert.

4.4.5 Einfluss der Gliadin-freien BCE-Fraktion auf die mRNA-Konzentrationen von AGE-spezifischen Rezeptoren

Die Wirkung von AGEs kann über die Bindung an spezifische Rezeptoren vermittelt werden. Aus diesem Grund soll überprüft werden, ob der Brotkrustenextrakt und die Gliadin-freie BCE-Fraktion einen Einfluss auf die mRNA-Konzentrationen AGE-bindender Rezeptoren nehmen. Dazu wurden die mRNA-Konzentrationen von AGE-R1, AGE-R2, AGE-R3 und CD36 mittels RT-PCR bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass der Brotkrustenextrakt keinen Einfluss auf die mRNA-Konzentrationen von AGE-R1, AGE-R3 und CD36 nahm (Abbildung 25). Eine Stimulation der RAW/NF- κ B/SEAPorterTM-Zellen mit 5 % (v/v) Brotkrustenextrakt führte zu einer signifikanten

Verringerung der AGE-R2-mRNA-Konzentration (0.88 ± 0.04 ; $p=0.048$). Die Gliadin-freie BCE-Fraktion verminderte signifikant die AGE-R1-, AGE-R2- und CD36-mRNA-Konzentrationen. Die Verringerung der AGE-R2-mRNA-Konzentration durch Stimulation mit der Gliadin-freien BCE-Fraktion unterschied sich signifikant zur Stimulation mit dem Brotkrustenextrakt ($p=0.025$). Die AGE-R3-mRNA-Konzentration blieb nach Stimulation der RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen mit der Gliadin-freien BCE-Fraktion unverändert. Der Einfluss der Brotkruste und der Gliadin-freien BCE-Fraktion auf die RAGE-mRNA-Konzentration konnte in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden, da in der RT-PCR keine spezifischen RAGE-mRNA-Fragmente amplifizierbar waren.

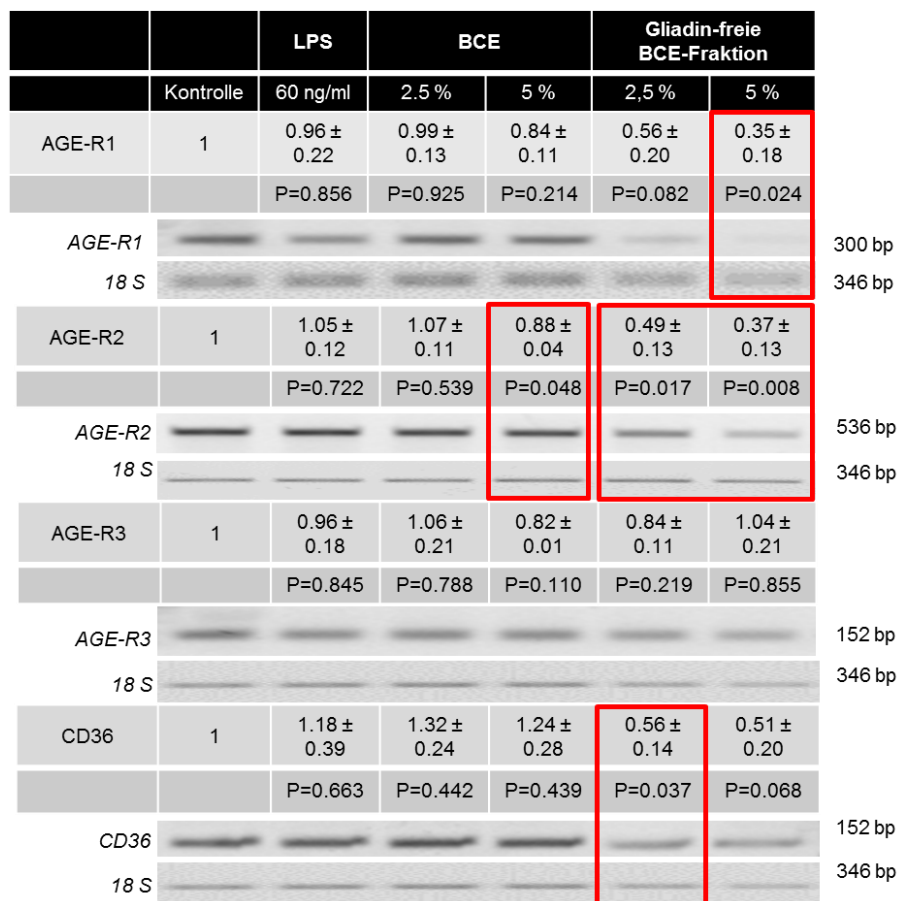


Abbildung 25: Einfluss des Brotkrustenextraktes und der Gliadin-freien BCE-Fraktion auf die mRNA-Konzentration von AGE-spezifischen Rezeptoren

Unter serumreduzierten Bedingungen wurden RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen für 24 h mit der Brotkruste und der Gliadin-freien BCE-Fraktion stimuliert. Die mRNA-Konzentrationen von AGE-R1, AGE-R2, AGE-R3 und CD36 wurden mittels RT-PCR bestimmt. Als Positivkontrolle diente 60 ng/ml LPS. Der Gehalt der spezifischen mRNAs wurde auf die mRNA-Konzentration der unbehandelten Zellen (Kontrolle = 1) normiert (MW \pm SEM, n=3). Die statistische Signifikanz (* $p<0,05$) wird durch rote Kästchen markiert.

4.5 AGE-Gliadin als Referenzprotein

Anhand der LC-MS/MS-Analysen und der Immunodetektion konnte Gliadin als Komponente des Brotkrustenextraktes detektiert werden. Mithilfe der Immunodetektion konnte herausgefunden werden, dass CML-modifiziertes Gliadin für die NF- κ B-Aktivierung als auch für die Expression chemopräventiver Phase-II-Enzyme verantwortlich ist. Es stellt sich nun die Frage, ob die zellaktivierende Wirkung durch die Modifikation an sich vermittelt wird.

Um dies zu klären, wurde ein kommerzielles Gliadin *ex vivo* AGE-modifiziert. Zum Nachweis von AGE-Modifikationen am Protein wurden die AGE-spezifischen Fluoreszenzen (Exc./Em. 330/405 nm und 360/440 nm) verwendet (Abbildung 26). Es konnte gezeigt werden, dass MG/G-Gliadin und Fruktose-Gliadin eine tendenziell höhere AGE-Fluoreszenz aufweisen, als unmodifiziertes Gliadin (unmod. Gliadin). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Proben (unmod. Gliadin *versus* mod. Gliadin) war nicht nachweisbar.

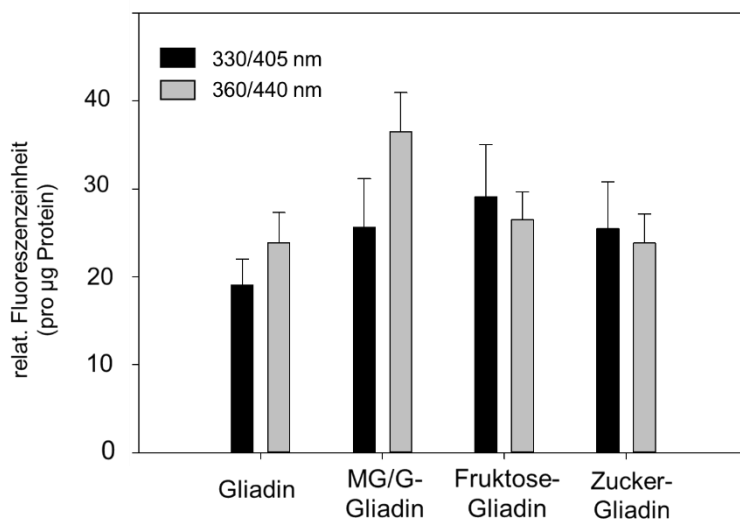


Abbildung 26: Fluoreszenzmessung von AGE-Gliadin

Darstellung der AGE-spezifischen Fluoreszenzen (Exc./Em. 330/405 nm und 360/440 nm) von MG/G-, Fruktose- und Zucker-Gliadin verglichen zum herkömmlichen Gliadin (MW \pm SEM, n=3).

Als weiterer Nachweis von AGE-Modifikationen am Gliadin erfolgte eine Immunodetektion (Abbildung 27). Anhand der Immunodetektion konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation mit Fruktose als auch mit verschiedenen Zuckern zu einer CML- und Arg-Pyrimidin-Modifikation an Gliadin führte. Die Inkubation mit MG/G und Pentosidin führte zu keiner sichtbaren CML- und Arg-Pyrimidin-Modifikation am Gliadin.

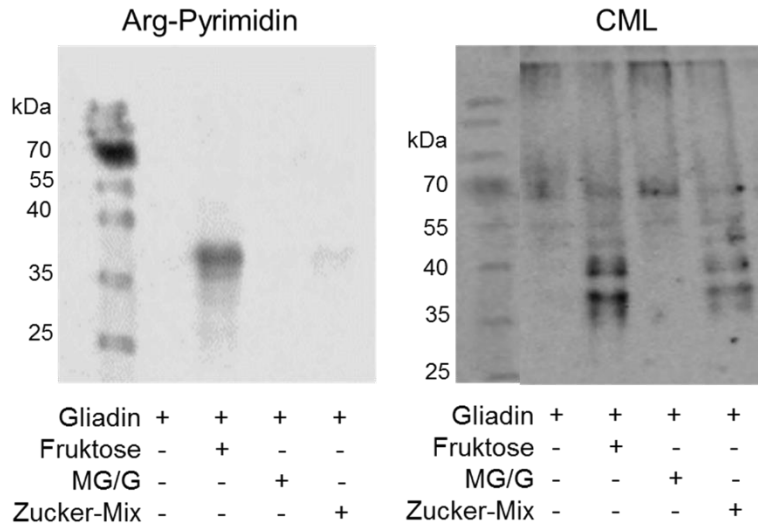


Abbildung 27: Nachweis von AGE-Modifikationen von AGE-Gliadin

Darstellung der elektrophoretischen Auftrennung von unmodifiziertem Gliadin (Gliadin), Fructose-, MG/G- und Zucker-Gliadin mittels SDS-PAGE und anschließende Immunodetektion mit AGE-spezifischen Antikörpern. Es werden jeweils repräsentative Western Blots dargestellt.

4.5.1 Einfluss von AGE-Gliadin auf die NF- κ B-Aktivierung in RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen

Um zu prüfen, ob die AGE-Modifikation für die NF- κ B-Aktivierung in RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen verantwortlich ist, wurde die Menge an SEAP nach einer 24-stündigen Stimulation der Zellen mit Gliadin und AGE-Gliadin über Spektrophotometrie gemessen.

Abbildung 28 zeigt eine signifikante Anreicherung von SEAP im Zellkulturmedium nach Stimulation der Zellen mit Gliadin und AGE-Gliadin. Gliadin induzierte ab einer Konzentration von 30 μ g/ml signifikant die Freisetzung von SEAP verglichen zu den unbehandelten Zellen (Kontrolle). Fructose-Gliadin erhöhte ab einer Konzentration von 100 μ g/ml signifikant die Menge an SEAP im Zellkulturmedium. Zucker-Gliadin wies ab einer Konzentration von 10 μ g/ml eine signifikante Anreicherung von SEAP im Zellkulturmedium auf. Die Steigerung der SEAP-Konzentration durch Stimulation der Zellen mit Gliadin unterschied sich nicht signifikant zur Stimulation mit AGE-Gliadin.

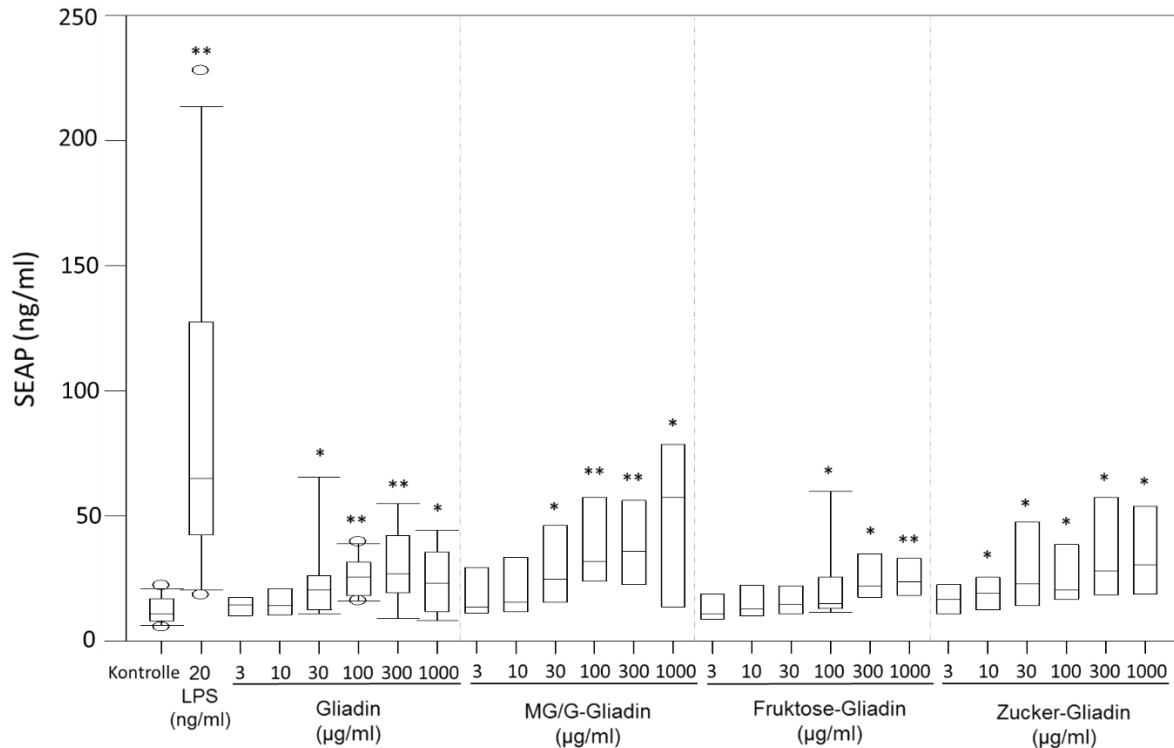


Abbildung 28: NF-κB-Aktivierung in RAW/NF-κB/SEAPorter™-Zellen nach Stimulation mit AGE-Gliadin

Verglichen zu den unbehandelten Zellen (Kontrolle) wurden die RAW/NF-κB/SEAPorter™-Zellen nach 24-stündigem Serumentzug weitere 24 h mit der angegebenen Mengen an Gliadin und AGE-Gliadin stimuliert. Als Positiv-Kontrolle wurde 20 ng/ml LPS verwendet. Die Messung der SEAP-Konzentration erfolgte mithilfe des SEAPorter™-Assay Kits und dient als Maß für die Aktivierung des NF-κB-Signalweges. Die statistische Signifikanz (n=5; * p<0,05 und **p<0,001) bezieht sich auf die unbehandelten Zellen.

4.5.1.1 Einfluss von AGE-Gliadin auf die Phosphorylierung der ERK-2-MAPKinase

Um zu untersuchen, ob die AGE-Modifikation der Brotkruste für die Phosphorylierung der ERK-2-MAPKinase verantwortlich ist, wurden die RAW/NF-κB/SEAPorter™-Zellen mit AGE-Gliadin für 24 h stimuliert.

In Abbildung 29 wird gezeigt, dass 30 µg/ml Gliadin zu einer statistisch signifikanten Verringerung der Phosphorylierung der ERK-2-MAPKinase führte ($0,85 \pm 0,04$ und $0,97 \pm 0,17$). Stimulationen der RAW/NF-κB/SEAPorter™-Zellen mit höheren Konzentrationen an Gliadin zeigten eine gesteigerte Phosphorylierung der ERK-2-MAPKinase. Aufgrund einer hohen Standardabweichung konnte jedoch keine Konzentrationsabhängigkeit nachgewiesen werden. Fruktose-Gliadin führte in einer Konzentration von 300 µg/ml zu einer signifikant gesteigerten ERK-2-MAPKinasen-Phosphorylierung.

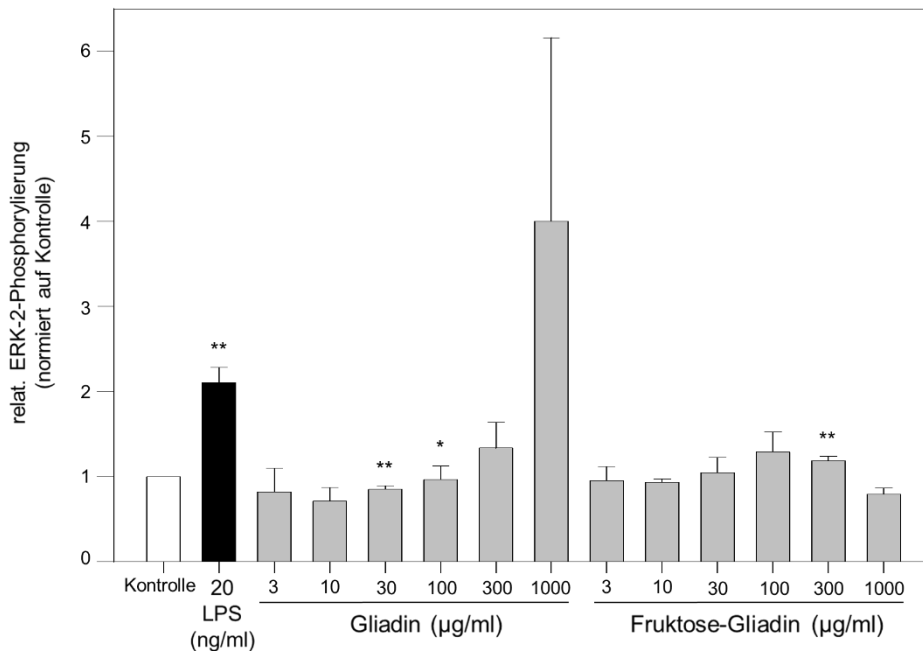


Abbildung 29: Einfluss von AGE-Gliadin auf die Phosphorylierung der ERK-2-MAPKinase

Unter serumreduzierten Bedingungen wurden RAW/NF- κ B/SEAPorterTM-Zellen für 10 min mit Gliadin und AGE-Gliadin stimuliert. Als Positivkontrolle diente 20 ng/ml LPS. Die Bestimmung der veränderten Kinasen-Aktivität erfolgte durch phospho-/aktivierungsspezifische Antikörper mittels Western Blot Analyse, wobei die unbehandelten Zellen (Kontrolle) auf 1 normiert wurden (MW \pm SEM, n=3, * p<0,05).

4.5.1.2 Einfluss von AGE-Gliadin auf die Phosphorylierung der p38-MAPKinase

Um zu untersuchen, ob die AGE-Modifikation der Brotkruste für die Phosphorylierung der p38-MAPKinase verantwortlich ist, wurden die RAW/NF- κ B/SEAPorterTM-Zellen mit AGE-Gliadin für 24 h stimuliert.

Die Stimulierung der Zellen mit 300 μ g/ml Gliadin führte zu einer 2-fachen Steigerung der Phosphorylierung der p38-MAPKinase (Abbildung 30). MG/G-Gliadin induzierte signifikant die Phosphorylierung der p38-MAPKinase, wobei 30 μ g/ml MG/G-Gliadin den stärksten Effekt aufwies (1,98 \pm 0,6). Fruktose-Gliadin führte zu keiner Beeinflussung der Phosphorylierung der p38-MAPKinase. Die gesteigerte Phosphorylierung der p38-MAPKinase durch Stimulation der Zellen mit Gliadin unterschied sich nicht signifikant zur Stimulation mit MG/G-Gliadin.

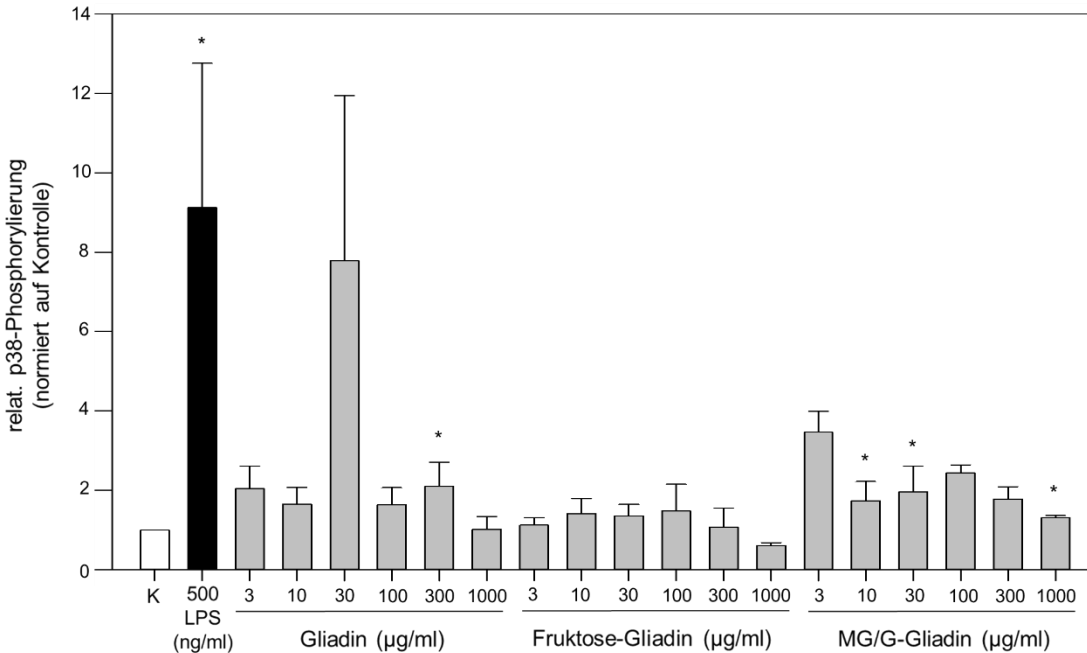


Abbildung 30: Einfluss von AGE-Gliadin auf die Phosphorylierung der p38-MAPKinase

Unter serumreduzierten Bedingungen wurden RAW/NF- κ B/SEAPorterTM-Zellen für 10 min mit Gliadin und AGE-Gliadin stimuliert. Als Positivkontrolle diente 500 ng/ml LPS. Die Bestimmung der veränderten Kinasen-Aktivität erfolgte durch phospho-/aktivierungsspezifische Antikörper mittels Western Blot Analyse, wobei die unbehandelten Zellen (Kontrolle = K) auf 1 normiert wurden (MW \pm SEM, n=3, * p<0,05).

4.5.2 Einfluss von AGE-Gliadin auf die MnSOD-mRNA-Konzentration

Da CML-modifiziertes Gliadin als potentiell bioaktive Komponente des Brotkrustenextraktes die MnSOD-mRNA-Konzentration in RAW/NF- κ B/SEAPorterTM-Zellen erhöhte, soll geklärt werden, ob die AGE-Modifikation am Protein für diesen Effekt verantwortlich ist. Aus diesem Grund erfolgte die Stimulierung der RAW/NF- κ B/SEAPorterTM-Zellen mit AGE-Gliadin und die Bestimmung der MnSOD-mRNA-Konzentration mittels RT-PCR.

Es konnte gezeigt werden, dass Gliadin zu einer signifikant erhöhten MnSOD-mRNA-Konzentration führte (Abbildung 31). Fruktose- und Zucker-Gliadin induzierten ebenfalls eine signifikante Steigerung der MnSOD-mRNA-Konzentration, wobei der Effekt des Fruktose-Gliadins geringer war. Die Steigerung der MnSOD-mRNA-Konzentration in RAW/NF- κ B/SEAPorterTM-Zellen durch Stimulation mit Gliadin unterschied sich nicht signifikant von der Stimulation mit AGE-Gliadin. Als Positivkontrolle diente 60 ng/ml LPS, welches zu einer 6-fachen Erhöhung des MnSOD-mRNA-Gehaltes führte.

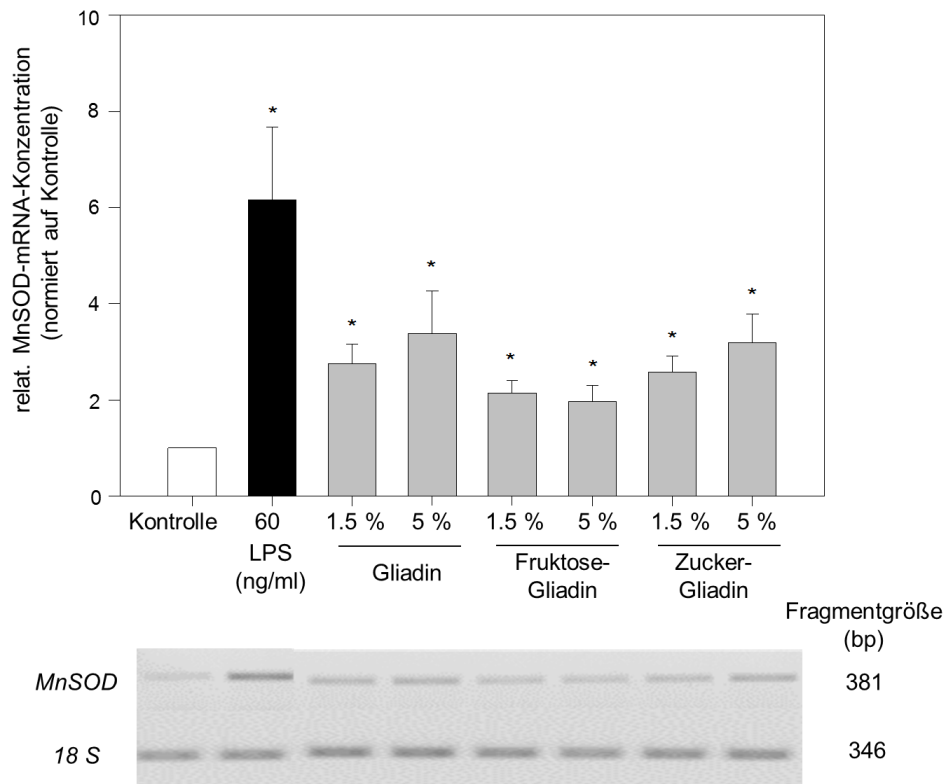


Abbildung 31: Einfluss von AGE-Gliadin auf die MnSOD-mRNA-Konzentration

Unter serumreduzierten Bedingungen wurden RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen für 24 h mit Gliadin und AGE-Gliadin stimuliert und die MnSOD-mRNA-Konzentration mittels RT-PCR bestimmt. Als Positivkontrolle wurde 60 ng/ml LPS verwendet. Der Gehalt der MnSOD-mRNA der Proben wurde auf die MnSOD-mRNA-Konzentration der unbehandelten Zellen (Kontrolle = 1) normiert (MW \pm SEM, n=3, * p<0,05).

4.5.3 Einfluss von AGE-Gliadin auf die mRNA-Konzentration von NQO-1, GSTM-1 und HO-1

Des Weiteren soll überprüft werden, ob die AGE-Modifikation des CML-modifizierten Gliadins der Brotkruste einen Einfluss auf die mRNA-Konzentration der weiteren Phase-II-Enzyme NQO-1, HO-1 und GSTM-1 in RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen nehmen.

Es konnte gezeigt werden, dass 1,5 % (v/v) und 5 % (v/v) Fruktose-Gliadin zu einer signifikanten Erhöhung der NQO-1-mRNA-Konzentration ($4,26 \pm 1,89$, p=0.002; $10,89 \pm 5,33$, p=0,010) führte (Abbildung 32). Die Stimulation der Zellen mit 5 % (v/v) Zucker-Gliadin erhöhte 6,7-fach die NQO-1-mRNA-Konzentration, wohingegen die Stimulation mit Gliadin keinen signifikanten Effekt aufwies. Eine Stimulation der Zellen mit Gliadin, Fruktose- und Zucker-Gliadin zeigte keinen Einfluss auf die mRNA-Konzentration von GSTM-1 und HO-1.

		LPS	Gliadin		Fruktose-Gliadin		Zucker-Gliadin		
	Kontrolle	60 ng/ml	1,5 %	5 %	1,5 %	5 %	1,5 %	5 %	
NQO-1	1	2.19 ± 0.76	2.79 ± 0.77	4.38 ± 2.04	4.26 ± 1.86	10.89 ± 5.33	3.96 ± 1.64	6.74 ± 2.90	Fragmentgröße (bp)
		P=0.394	P=0.394	P=1.000	P=0.002	P=0.010	P=0.257	P=0.010	
NQO-1									341
18 S									346
GSTM-1	1	0.78 ± 0.07	1.05 ± 0.14	1.07 ± 0.15	1.11 ± 0.18	1.15 ± 0.15	1.34 ± 0.17	0.96 ± 0.05	
		P=0.065	P=0.394	P=1.000	P=0.394	P=1.000	P=0.257	P=1.000	
GSTM-1									432
18 S									346
HO-1	1	1.13 ± 0.22	1.17 ± 0.17	1.21 ± 0.19	1.30 ± 0.15	1.28 ± 0.17	1.22 ± 0.24	1.08 ± 0.10	
		P=1.000	P=1.000	P=1.000	P=0.065	P=1.000	P=1.000	P=1.000	
HO-1									341
18 S									346

Abbildung 32: Einfluss von AGE-Gliadin auf die mRNA-Konzentration von NQO-1, GSTM-1 und HO-1

Unter serumreduzierten Bedingungen wurden RAW/NF-κB/SEAPorter™-Zellen für 24 h mit Gliadin und AGE-Gliadin stimuliert und die mRNA-Konzentration der Phase-II-Enzyme NQO-1, GST-M1 und HO-1 mittels RT-PCR bestimmt. Als Positivkontrolle wurde 60 ng/ml LPS verwendet. Der Gehalt der spezifischen mRNAs wurde auf die mRNA-Konzentration der unbehandelten Zellen (Kontrolle = 1) normiert (MW ± SEM). Die statistische Signifikanz (* p<0,05) wird durch rote Kästchen markiert.

4.5.4 Einfluss von AGE-Gliadin auf die mRNA-Konzentration von AGE-spezifischen Rezeptoren

Da das CML-modifizierte Gliadin der Brotkruste vermutlich über die Bindung an spezifische AGE-Rezeptoren die zellaktivierende Wirkung vermittelt, soll geklärt werden, ob die AGE-Modifikation des Proteins für diesen Effekt verantwortlich ist. Dafür wurden RAW/NF-κB/SEAPorter™-Zellen mit AGE-Gliadin für 24 h stimuliert und die mRNA-Konzentration der AGE-Rezeptoren AGE-R1, AGE-R2, AGE-R3 und CD36 mittels RT-PCR ermittelt.

Es konnte gezeigt werden, dass die AGE-R3-mRNA-Konzentration durch die Stimulation mit 5 % (v/v) Gliadin (0.74 ± 0.08 ; $p=0.024$) und 5 % (v/v) Zucker-Gliadin (0.89 ± 0.03 ; $p=0.021$) signifikant reduziert wurde (Abbildung 33). Fruktose-Gliadin verminderte signifikant den CD36-mRNA-Gehalt ($p=0.001$). Die Stimulation der Zellen mit Gliadin und AGE-Gliadin zeigte auf die mRNA-Konzentration von AGE-R1 und AGE-R2 keinen Einfluss.

	Kontrolle	LPS	Gliadin		Fruktose-Gliadin		Zucker-Gliadin		Fragmentgröße (bp)
		60 ng/ml	1,5 %	5 %	1,5 %	5 %	1,5 %	5 %	
AGE-R1	1	0.96 ± 0.22	0.85 ± 0.11	0.88 ± 0.22	0.82 ± 0.18	0.89 ± 0.09	1.01 ± 0.17	0.95 ± 0.13	300
		P=0.856	P=0.304	P=0.534	P=0.364	P=0.217	P=0.931	P=0.605	
AGE-R1									300
18 S									346
AGE-R2	1	1.05 ± 0.12	0.88 ± 0.10	0.88 ± 0.17	1.02 ± 0.15	0.96 ± 0.17	1.13 ± 0.20	1.04 ± 0.17	536
		P=0.722	P=0.297	P=0.430	P=0.926	P=0.771	P=0.454	P=0.758	
AGE-R2									536
18 S									346
AGE-R3	1	0.96 ± 0.18	0.84 ± 0.14	0.74 ± 0.08	0.91 ± 0.10	0.94 ± 0.04	0.89 ± 0.08	0.89 ± 0.03	152
		P=0.845	P=0.304	P=0.024	P=0.404	P=0.156	P=0.163	P=0.021	
AGE-R3									152
18 S									346
CD36	1	1.18 ± 0.39	0.72 ± 0.12	1.03 ± 0.03	1.01 ± 0.09	0.94 ± 0.01	1.06 ± 0.04	1.09 ± 0.13	341
		P=0.663	P=0.086	P=0.354	P=0.914	P=0.001	P=0.148	P=0.419	
CD36									341
18 S									346

Abbildung 33: Einfluss von AGE-Gliadin auf die mRNA-Konzentration von AGE-spezifischen Rezeptoren

Unter serumreduzierten Bedingungen wurden RAW/NF-κB/SEAPorter™-Zellen für 24 h mit Gliadin und AGE-Gliadin stimuliert und die mRNA-Konzentration von AGE-R1, AGE-R2, AGE-R3 und CD36 mittels RT-PCR bestimmt. Als Positivkontrolle wurde 60 ng/ml LPS verwendet. Die mRNA-Konzentration der spezifischen mRNAs wurde auf die mRNA-Konzentration der unbehandelten Zellen (Kontrolle =1) normiert (MW ± SEM, n=3). Die statistische Signifikanz (* p<0,05) wird durch rote Kästchen markiert.

5 Diskussion

Ein hoher Konsum an thermisch behandelten Produkten kann die Konzentration an AGEs im Körper erhöhen und die Bildung AGE-modifizierter Proteine zusätzlich verstärken. Über die generelle Wirkung AGE-modifizierter Proteine auf die Gesundheit ist man sich bis heute unschlüssig. So konnten viele Arbeitsgruppen zeigen, dass AGEs zu einer verstärkten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine führen, wodurch kardiovaskuläre Komplikationen alters-bedingter Erkrankungen, wie z.B. Diabetes mellitus, begünstigt werden (Brownlee 1984; Morales und Babbel 2002; Uribarri et al. 2007; Assar et al. 2009; Bastos und Monaro 2012; Sena et al. 2012). Auf der anderen Seite scheinen AGEs auch eine protektive Wirkung zu vermitteln. So konnte anhand der Brotkruste, als Modell für stark erhitze Lebensmittel, gezeigt werden, dass MRPs die antioxidative Kapazität in Zell- und Tierstudien erhöhen (Borrelli et al. 2002; Faist et al. 2002; Lindenmeier et al. 2002; Ruhs et al. 2010). Da viele Lebensmittel eine sehr komplexe Matrix aufweisen, konnten bisher nur vereinzelte bioaktive Substanzen in den Lebensmitteln identifiziert werden. Aus diesem Grund soll die vorliegende Arbeit dazu beitragen, bioaktive Komponenten in der Brotkruste zu identifizieren und zu isolieren. Des Weiteren soll geklärt werden, welche bioaktive Komponente für den zellaktivierenden Effekt der Brotkruste verantwortlich ist. Am Ende der Arbeit soll die Frage geklärt werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Ausbildung von AGE-Modifikationen (Maillard-Reaktion) und der Bioaktivität der Brotkruste besteht.

5.1 Charakterisierung der löslichen Brotkruste

Für die Identifizierung möglicher bioaktiver Komponenten in der Brotkruste wurde die Brotkruste im Vorfeld anhand verschiedener Methoden, wie Chromatographie, Spektrophotometrie und Immunodetektion charakterisiert. Die FTIR-Messung detektierte einen geringen Proteingehalt und einen relativ hohen Kohlenhydratgehalt in der Brotkruste. Laut Literatur enthält ein Roggenbrot ca. 44 % Wasser, 6 % Protein, 1 % Fett und 45 % Kohlenhydrate (Handbook of Breadmaking Technology, C. A. Stear), wobei sich der Großteil der Proteine in der Brotkruste, dem Inneren der Backware, befindet (Horszwald et al. 2009). Während des Backprozesses führt die Maillard-Reaktion zu einer Modifizierung der enthaltenen Proteine (Zill et al. 2001; Therdthai et al. 2002; Michalska et al. 2008; Assar et al. 2009; Vanin et al. 2009; Bastos und Monaro 2012). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. So zeigte die Fraktion der Boronsäuren-Affinitäts-Chromatographie, die AGE-modifizierte Proteine aus der Brotkruste enthält, ein ähnliches Proteinmuster wie die lösliche Brotkruste. Auch die Messung der Autofluoreszenz und Immunodetektion der löslichen Brotkruste bestätigte einen hohen Anteil an AGE-modifizierten Proteinen in der Brotkruste. Zur qualitativen Bestimmung der enthaltenen AGEs erfolgte eine

HPLC-MS/MS-Analyse. So konnten CML, CEL, die Amid-AGEs N ϵ -Lactoyllysine, N ϵ -Acetyllysine und N ϵ -Formyllysine, sowie CEA, THP, MG-H1, Pyrallin, Pentosidin und Arg-Pyrimidin in der löslichen Brotkruste detektiert werden. Auch andere Arbeitsgruppen charakterisierten die Brotkruste als MRP-reiches Lebensmittel. So bestimmten Henle et al. (1997) mittels H-NMR und UV-Spektroskopie in der Brotkruste etwa 0,4 - 2,6 mg Pentosidin/kg Protein, wohingegen die Brotkrume nachweislich kein Pentosidin enthielt. Die Kruste eines Vollkornbrottes wies ca. 329 mg CML/kg Protein (Assar et al. 2009) und bis zu 3700 mg Pyrallin/kg Protein auf (Henle 2003). Mittels UPLC-MS/MS konnte ein CEL-Gehalt von etwa 60 mg/kg Protein in Vollkornbrot nachgewiesen werden (Zhou et al. 2015).

5.1.1 Antioxidative und chemopräventive Wirkung der Brotkruste

Der am meist untersuchte Signaltransduktionsweg AGE-modifizierter Proteine stellt der NF- κ B-Weg dar. Dabei führt die Phosphorylierung der ERK-1/2-MAPKinase, als auch der p38-MAPKinase zu einer gesteigerten Translokation von NF- κ B in den Zellkern, wo NF- κ B an der Regulierung inflammatorischer Gene beteiligt ist. Maeng et al. (2006) konnten nachweisen, dass die ERK-1/2-MAPKinase an der Phosphorylierung des I κ B-Komplexes eine wichtige Rolle spielt. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Messung der NF- κ B-Translokation anhand stabil transfizierter Zellen. Es zeigte sich, dass in den humanen NF- κ B/Jurkat/GFP-LucTM-Zellen eine Inkubation mit der löslichen Brotkruste einen tendenziellen Anstieg der NF- κ B-Translokation zur Folge hatte. In der Makrophagen-Zelllinie erfolgte nach 24-stündiger Inkubation mit der Brotkruste eine signifikant gesteigerte Phosphorylierung der ERK-2-MAPKinase, sodass eine signifikante Anreicherung von NF- κ B im Zellkulturüberstand der RAW/NF- κ B/SEAPorterTM-Zellen spektrophotometrisch nachweisbar war. Bezüglich einer gesteigerten Phosphorylierung der p38-MAPKinase war ein Trend ersichtlich. Da die Niere ein wichtiges Organ zur Metabolisierung von AGEs darstellt, wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich eine transfizierte HEK-293-Zelllinie herangezogen. Hier zeigte sich, dass die lösliche Brotkruste konzentrationsabhängig zu einer signifikanten NF- κ B-Translokation führte. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die lösliche Brotkruste zellunabhängig einen Einfluss auf den NF- κ B-Signalweg nimmt, wobei das Ausmaß der Phosphorylierung spezifischer Kinasen bzw. der NF- κ B-Aktivierung vom jeweiligen Zelltyp abhängig ist (Sauer et al. 2011; Nass et al. 2014). So war der zellaktivierende Effekt der Brotkruste in humanen T-Zellen weniger stark ausgeprägt als in murinen Makrophagen und embryonalen Nierenzellen. Diese Ergebnisse stimmen mit den Befunden der Literatur überein und bestätigen eine NF- κ B-Aktivierung aufgrund gesteigerter MAPKinasen-Phosphorylierung. Es konnte gezeigt werden, dass die Brotkruste zu einer MAPKinasen- und NF- κ B-Aktivierung in CaCo2-Zellen, RAGE-transfizierten HEK-293-Zellen (Zill et al. 2003), murinen kardialen Fibroblastenzellen (Ruhs

et al. 2007; Ruhs et al. 2010) und in WI-38-Zellen (Nass et al. 2014) führte. Daneben konnten Fütterungsstudien zeigen, dass die Brotkruste eine gesteigerte Lipidperoxidation und nephrotoxische Effekte (erhöhte Proteinurie, erhöhte TGF- β 1 Konzentration) in Wistar Ratten hervorrief (Somoza et al. 2005a; Šebeková et al. 2005). In murinem Lungengewebe führte eine Brotkrustenreiche-Diät zu einem signifikanten Anstieg der HMGB1 Konzentration, wodurch proinflammatorische Zytokine vermehrt sezerniert wurden (Bartling et al. 2007).

Neben einer proinflammatorischen Signalkaskade wird in der Literatur auch ein antiinflammatorischer Wirkmechanismus beschrieben (Delgado-Andrade et al. 2005). Den ersten wissenschaftlichen Nachweis zur antioxidativen Wirkung von MRPs erbrachte Franzke and Iwainsky 1975. Seither gibt es eine Vielzahl an Arbeitsgruppen, die sowohl in Standardlösungen als auch in verschiedensten Lebensmittelkategorien spezifische MRPs isolierten und identifizierten. So besitzen Aminoreduktone (Dittrich et al. 2003) ein antioxidatives Potential, indem sie vor LDL-Oxidation schützen können. Als weitere Inhaltsstoffe mit antioxidativer Kapazität werden Pronyl-Lysin, Phenole, Ballaststoffe und Tocopherolderivate beschrieben (Lindenmeier et al. 2002; Pastoriza et al. 2014). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein antiinflammatorischer Wirkmechanismus über den Einfluss des löslichen Brotkrustenextraktes auf die Genexpression chemopräventiver Enzyme untersucht. Es zeigte sich, dass die Brotkruste in RAW/NF- κ B/SEAPorterTM-Zellen zu einer signifikant gesteigerten Konzentration der MnSOD-, NQO-1- und HO-1-mRNA nach 24-stündiger Inkubation führte. Der GSTM-1-mRNA Level blieb unverändert. Da diese Phase-II-Enzyme an der Aufrechterhaltung des antioxidativen Status beteiligt sind, konnte anhand der vorliegenden Arbeit ein chemopräventiver und antioxidativer Effekt der Brotkruste in Makrophagen nachgewiesen werden, welcher ebenso in Cardiofibroblasten (Ruhs et al. 2010), CaCo2-Zellen (Faist et al. 2002; Lindenmeier et al. 2002), als auch im Nierengewebe von Wistar-Ratten (Faist et al. 2002; Somoza et al. 2005b; Wang et al. 2011) über eine Steigerung der MnSOD- und GST-mRNA/Proteinkonzentration beobachtet wurde. Fütterungsstudien an Wistar-Ratten zeigten ebenfalls eine Steigerung der hepatischen Konzentration an Glutathion (Pastoriza et al. 2014).

5.1.2 Einfluss der Brotkruste auf die AGE-spezifischen Rezeptoren

Die zellaktivierende Wirkung der Brotkruste kann sowohl rezeptorunabhängig als auch rezeptorabhängig erfolgen. An RAGE-transfizierten HEK-293-Zellen wurde gezeigt, dass eine Inkubation der Zellen mit löslicher Brotkruste zu einer verstärkten Phosphorylierung der p38-MAPKinase führte, indem der Brotkrustenextrakt mit RAGE interagiert (Zill et al. 2001; Somoza et al. 2005a). Ähnliche Ergebnisse zeigten Inhibitionsstudien mit einem antagonistischen anti-RAGE-Antikörper in CaCo2-Zellen (Ruhs et al. 2010). Auch die Induktion der MnSOD wurde

RAGE-abhängig in Cardiofibroblasten und über Fütterungsstudien an C57/B6-NCrl-Mäusen nachgewiesen (Leuner et al. 2012).

In der vorliegenden Arbeit konnte keine Basalexpression von RAGE in RAW/NF- κ B/SEAPorterTM-Zellen detektiert werden. Dies lässt vermuten, dass die transfizierten Makrophagen kein RAGE exprimieren bzw. die Konzentration so gering ist, dass RAGE mittels PCR und Immunodetektion nicht nachweisbar war. In den RAW/NF- κ B/SEAPorterTM-Zellen konnte eine deutliche Basalexpression der Rezeptoren AGE-R1, AGE-R2, AGE-R3 und CD36 gemessen werden. Durch Inkubation der Zellen mit 5 % (v/v) Brotkrustenextrakt erfolgte eine signifikant gesteigerte Konzentration der AGE-R2-mRNA. In stabil transfizierten Makrophagen, humanen T-Zellen und embryonalen Nierenzellen konnte eine Basalexpression von AGE-R1, AGE-R2 und AGE-R3 nachgewiesen werden (Pötzsch et al. 2013). Verglichen zu den RAW/NF- κ B/SEAPorterTM-Zellen war die Basalexpression der AGE-R1 und AGE-R3 in den T- und Nieren-Zellen deutlich geringer. Des Weiteren war der Nachweis des AGE-R2 auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene in NF- κ B/Jurkat/GFP-LucTM-Zellen nicht möglich (Pötzsch et al. 2013). Dies lässt vermuten, dass der weniger stark ausgeprägte zellaktivierende Effekt der löslichen Brotkruste in den transfizierten NF- κ B/Jurkat/GFP-LucTM-Zellen auf das Rezeptorexpressionsprofil der Zellen zurückzuführen ist.

5.2 Identifizierung von Gliadin als bioaktive Komponente

Zur weiteren Strukturaufklärung der Brotkruste erfolgte die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung. Daraus wurde ersichtlich, dass die Brotkruste einen hohen Gehalt an Glutamin/Glutaminsäure und Prolin aufweist, der laut Literatur charakteristisch für Prolamine ist (Shan et al. 2002; Wieser 2007). Prolamine sind Speicherproteine der Getreideprodukte mit einem Molekulargewicht von 30 bis 80 kDa (Goesaert et al. 2005; Belitz et al. 2009; Ang et al. 2010; Ebermann und Elmadfa 2011). Die genaue Bezeichnung der Prolaminfraktion basiert auf den lateinischen Namen des Getreideproduktes. So werden die Prolamine des Weizens als Gliadin und die Prolamine des Roggens als Secalin bezeichnet (Shewry und Tatham 1990). Durch LC-MS/MS-Analysen konnte das Vorhandensein von Prolaminen im löslichen Brotkrustenextrakt bestätigt werden. So wurden im Brotkrustenextrakt γ -Gliadin Präkursor und HMW Glutenin-Untereinheiten als Hauptkomponenten nachgewiesen. Auch eine Immundetektion mit spezifischen Gliadin-Antikörpern bestätigte das Vorhandensein von Gliadin in der Brotkruste. Weizen besteht zu 33 % aus Prolamin (Kulp und Ponte 2000; Belitz et al. 2009). Roggen besitzt einen deutlich geringeren Gehalt an Prolaminen (21 % der Proteine). Die Aminosäurezusammensetzung der Prolamine ist in Weizen und Roggen gleich (Belitz et al. 2009). So weisen beide Getreidesorten einen hohen Anteil an Glutamin/Glutaminsäure und Prolin in ihrer Prolaminfraktion auf (Shewry 2007). Der hohe Gehalt an unpolaren Aminosäurenresten

(Prolin) und den polaren, aber nicht-ionisierbaren Glutamin-Resten, begünstigt eine Unlöslichkeit der Prolamine in wässriger Lösung (Iwami et al. 1987). Dies würde bedeuten, dass Prolamine aus der Brotkruste mittels PBS nicht extrahiert werden könnten. Eine Extraktion von Prolaminen aus der Brotkruste wäre demnach nicht möglich. Für die Herstellung des vorliegenden Roggenmischbrottes wurde ein Sauerteig verwendet, der in der Regel einen pH-Wert von vier aufweist (Brandt und Gänzle 2006). Durch diese sauren Bedingungen und den anschließend hohen Temperaturen während des Backprozesses kommt es zur Förderung der chemischen Deamidierung, wodurch die Aminogruppe von Glutamin gegen eine Hydroxylgruppe ausgetauscht wird (Brandt und Gänzle 2006). Dadurch wird die negative Ladung der Prolamine erhöht und eine gesteigerte Oberflächen-Hydrophobizität erreicht (Iwami et al. 1987). Aus diesem Grund steigt die Löslichkeit der Prolamine in wässrigen, salzhaltigen Lösungen und erklärt das Vorhandensein von Prolaminen in PBS-gelöstem Brotkrustenextrakt.

5.2.1 Antioxidative und chemopräventive Wirkung der Prolamine

Inwiefern das in der Brotkruste identifizierte Gliadin eine bioaktivierende Komponente darstellt, wurde mittels Immunopräzipitation und Zellkulturversuchen an Makrophagen (RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen) untersucht. Da die Verwendung des IP-Eluats (Gliadin-reiche BCE-Fraktion) aus der Immunopräzipitation aufgrund der Toxizität des Elutionspuffers in zellbasierten Versuchen nicht möglich war, erfolgte der Nachweis der Zellaktivierung mithilfe des IP-Überstandes (Gliadin-freie BCE-Fraktion). Verglichen zur herkömmlichen Brotkruste zeigte sich, dass die Gliadin-freie BCE-Fraktion zu keiner signifikanten NF- κ B-Aktivierung in RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen führte. Des Weiteren zeigte eine 24-stündige Stimulation der RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen mit der Gliadin-freien BCE-Fraktion keine signifikante Steigerung der MnSOD- und NQO-1-mRNA-Konzentration verglichen zum herkömmlichen Brotkrustenextrakt. Dies lässt schlussfolgern, dass die Präzipitation des Gliadins zu einem Verlust der zellaktivierenden Wirkung der Brotkruste führt. Aufgrund der Steigerung der NF- κ B-Aktivierung als auch der MnSOD- und NQO-1-mRNA-Konzentration durch das Gliadin kann ein antioxidativer und chemopräventiver Effekt über die Induktion der Phase-II-Enzyme vermittelt werden.

Da die Prolamine, vor allem ω 5-Gliadin und γ 70-Secalin, Lebensmittelallergene darstellen, richten viele wissenschaftliche Arbeiten ihren Fokus auf die Untersuchung von inflammatorischen Effekten (Palosuo et al. 2001). An PBMCs und Monozyten von Zöliakie-Patienten zeigte die Stimulation mit Gliadin eine deutliche Steigerung der IL-1 β und IL-1 α Konzentration (Palová-Jelínková et al. 2013). Des Weiteren führte die Aufnahme von Gliadin über eine Freisetzung von IL-15 zur Aktivierung von natürlichen Killerzellen, CD4- und Th1-Zellen, die wiederum über weitere

Signaltransduktionswege inflammatorische Zytokine, wie z.B. TNF- α und INF- γ , freisetzen (Re et al. 2013). In der Literatur gibt es bisher nur wenige Belege für einen chemopräventiven Effekt von Gliadin. Maiuri et al. (2003) untersuchten den Einfluss von Gliadin auf die iNOS-Proteinexpression in aktivierten Makrophagen. Sie stellten fest, dass Gliadin in Kombination mit TNF- α zu einem erhöhten Gehalt an Nitrit und iNOS führte (Maiuri et al. 2003; Stefano et al. 2006). Des Weiteren induzierte die Inkubation von Makrophagen mit Gliadin und TNF- α die zytosolische Degradation von I κ B α , sodass es zu einer verstärkten Translokation der p50- und p65-Untereinheiten in den Zellkern, gefolgt von einer Aktivierung des NF- κ Bs kam (Maiuri et al. 2003). Auch bei THP-1 Zellen konnte dieser Effekt nachgewiesen werden (Jelínková et al. 2004). Erfolgte eine Stimulierung der Makrophagen mit Gliadin ohne TNF- α , so blieb die Induzierung von iNOS und NF- κ B aus (Maiuri et al. 2003). Lammers et al. (2008) hingegen konnten keine Aktivierung des NF- κ B-Weges in CaCo2-Zellen feststellen. Dies lässt vermuten, dass die zellaktivierende Wirkung von Gliadin zelltypabhängig erfolgt. Lindemeier et al. (2002) konnten zeigen, dass eine Proteinfraction der Brotkruste mit einer molekularen Größe von 30 bis 100 kDa die höchste antioxidative Kapazität in Bezug auf die Hemmung der Linolensäurenperoxidation aufwies. Da das Molekulargewicht von Gliadin zwischen 30 und 80 kDa liegt (Goesaert et al. 2005; Ang et al. 2010), könnte die Proteinfraction aus der Studie von Lindemeier et al. (2002) Gliadin als bioaktive Komponente enthalten und so die antioxidative Wirkung erklären.

Zur Überprüfung, ob das Gliadin der Brotkruste für den zellaktivierenden Effekt verantwortlich ist, wurden daher RAW/NF- κ B/SEAPorterTM-Zellen mit herkömmlichen Gliadin stimuliert. Es zeigte sich, dass Gliadin ab einer Konzentration von 30 μ g/ml zu einer signifikanten Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs in dieser Zelllinie führte. Eine Stimulation der Zellen mit 1,5 % (v/v) als auch 5 % (v/v) erhöhte signifikant die MnSOD-mRNA-Konzentration. Verglichen zur Stimulation mit dem Brotkrustenextrakt waren diese Effekt des herkömmlichen Gliadins deutlich geringer. Dies lässt vermuten, dass zum einen neben Gliadin weitere Komponenten existieren, die eine Zellaktivierung vermitteln. Zum anderen scheinen sich herkömmliche Gliadine strukturell und funktionell von den präzipitierten Gliadinen der Brotkruste zu unterscheiden. So könnte die fortschreitende Maillard-Reaktion während des Backprozesses zu einer Modifikation des Gliadins führen, wodurch die zellaktivierende Wirkung beeinflusst wird.

5.2.2 Einfluss des Gliadins auf die AGE-spezifischen Rezeptoren

Die Effekte der Gliadine werden laut Literatur vor allem über die Bindung an den spezifischen CXCR-3 Rezeptor vermittelt (Re et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Gliadine auf die AGE-spezifischen Rezeptoren untersucht. In RAW/NF- κ B/SEAPorterTM-Zellen führte die Gliadin-freie BCE-Fraktion zu einer Verringerung der Menge der AGE-R1-, AGE-R2-

und CD36-mRNA verglichen zur herkömmlichen Brotkruste und den unbehandelten Zellen. Die Präzipitation des Gliadins aus der Brotkruste zeigte keinen Einfluss auf die Konzentration der AGE-R3-mRNA. Dies lässt schlussfolgern, dass Gliadin die zellaktivierenden Eigenschaften der Brotkruste über eine Steigerung der spezifischen AGE-R1-, AGE-R2- und CD36-mRNA vermittelt. In der Literatur sind bisher keine Studien beschrieben, die Gliadin in Zusammenhang mit AGE-spezifischen Rezeptoren untersuchen.

Der am meist untersuchteste Rezeptor bezogen auf Gliadin ist CXCR-3, ein 7-transmembran G-Protein-gekoppelter Rezeptor. Bei Zöliakiepatienten ist die Bindung der Prolamine an den CXCR-3 an der Zellaktivierung und Zellmigration in entzündlichen Geweben beteiligt (Lammers et al. 2008). Dabei wird über den MyD88-Weg Zonulin freigesetzt, sodass Gliadin in die Mucosa gelangt und dort eine inflammatorische Signalkaskade auslösen kann (Lammers et al. 2008; Re et al. 2013). Zöliakie beschreibt eine Autoimmun-Krankheit bei der Getreideproteine, vor allem Gliadine, nicht verdaut werden, sich im Zuge dessen in der Zirkulation vermehrt anhäufen und zu typischen Symptomen, wie Diarrhöe, führen.

Eine weitere Erklärung der NF- κ B-Aktivierung durch Prolamine ist die Bindung von Gliadin an den Toll-like Rezeptor 4 (TLR4). Studien zeigten, dass die TLR4-Genexpression bei Zöliakiepatienten stark erhöht war (Moossavi 2013). In Zellkulturstudien konnte gezeigt werden, dass Pepsin/Trypsin-verdautes Gliadin zu einer verstärkten Freisetzung von LPS führte und proinflammatorische Zytokine über den MyD88-Weg verstärkt induziert wurden (Moossavi 2013). Zum anderen nahmen die verdauten Gliadin-Fractionen einen Einfluss auf die Genexpression von TLR2 und TLR4 in murinen Makrophagen (Moossavi 2013). Es ist bekannt, dass alle TLR, bis auf TLR3, zu einer NF- κ B- als auch AP-1-Aktivierung führen, indem der MyD88 Weg induziert wird (Moossavi 2013). Aus diesem Grund stellt der TLR4 eine neue Möglichkeit zur Erklärung der NF- κ B-aktivierenden Wirkung von Gliadin in murinen Makrophagen dar.

5.3 Einfluss der Maillard Reaktion auf die Bioaktivität der Prolamine

Während des Backprozesses spielt die Maillard-Reaktion eine bedeutende Rolle, da sie zu einer strukturellen und funktionellen Veränderung der Proteine führt (Delgado-Andrade et al. 2005). Anhand der AGE-spezifischen Fluoreszenzmessung, der Immunodetektion und Boronsäuren-Affinitäts-Chromatographie konnte nachgewiesen werden, dass der Großteil der Proteine in der Brotkruste AGE-modifiziert vorliegen. Mittels HPLC-MS/MS, dem Goldstandard der AGE-Bestimmung, konnten verschiedene AGEs, wie z.B. CML, nachgewiesen werden.

Anhand der Immunopräzipitation der Brotkruste konnte Gliadin als eine mögliche bioaktive Komponente isoliert werden. Eine anschließende Immunodetektion bestätigte eine CML-Modifikation des enthaltenden Gliadins. Anhand der Laufbedingungen der Untereinheiten von

Gliadin lässt sich vermuten, dass im löslichen Brotkrustenextrakt CML-Modifikationen am ω -Gliadin (ca. 55 kDa), α/β -Gliadin (ca. 35 kDa) und γ -Gliadin (ca. 30 kDa) enthalten sind. Aus diesem Grund stellt sich die Frage, ob die AGE-Modifikation des CML-modifizierten Gliadins einen Einfluss auf die zellaktivierenden Eigenschaften der Brotkruste nimmt. Daraufhin wurde ein herkömmliches Gliadin mit MG/G und verschiedenen Zuckern modifiziert und in Zellkulturversuchen eingesetzt. Die Inkubation von herkömmlichen Gliadin mit MG/G, Fruktose und einem Zuckermix zeigte anhand der geringen AGE-Autofluoreszenz eine geringe Modifikation verglichen zum herkömmlichen Gliadin. Anhand der Immunodetektion konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation mit Fruktose zu einer deutlichen CML- und Arg-Pyrimidin-Bildung am Gliadin führte. Gliadine zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an Prolin und Glutamin/Glutaminsäure aus. Der Gehalt an den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin ist im Vergleich dazu sehr gering (Roggers 2011). Basierend auf den Grundlagen der Maillard-Reaktion lässt dies vermuten, dass eine AGE-Modifikation von Gliadin vorwiegend an der Aminosäure Prolin erfolgt.

5.3.1 Chemopräventive und antioxidative Wirkung von AGE-Gliadin

Nicoli et al. (1991) konnten zeigen, dass durch niedrige Temperaturen oder eine kurze Erhitzungsphase mit hohen Temperaturen prooxidative Komponenten bei der Lebensmittelherstellung entstehen können. Hohe Temperaturen und eine lange Erhitzungsperiode führen nachweislich zur Bildung neuer antioxidativ wirkender Komponenten, die aufgrund der Maillard-Reaktion im Lebensmittel gebildet wurden (Dittrich et al. 2009; Ktenioudaki et al. 2013). Des Weiteren war eine positive Korrelation zwischen Bräunungsgrad und antioxidativer Wirkung (Manzocco et al. 2000), sowie antiradikaler Aktivität sichtbar (Morales und Jiménez-Pérez 2001). Lindemeier et al. (2002) zeigten anhand des Trolox-Assays, dass die dunkle Kruste eines Roggenmischbrottes eine hohe antioxidative Kapazität im Vergleich zum Roggenmehl und der Krume des Brotes aufweist. Experimente mit Pizzateigen konnten dies ebenfalls bestätigen (Moore et al. 2009). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in Erdnüssen (Açar et al. 2009) und Kaffee (Daglia et al. 2004). Neben dem direkten antioxidativen Effekt zeigen AGEs auch eine indirekte antioxidative Wirkung, indem sie die Expression zytoprotektiver Proteine in den Zellen induzieren (Sauer et al. 2012). So sind AGEs in der Lage die Konzentration von intrazellulärem reduziertem Glutathion (GSH) zu erhöhen und die Zellen vor hohem oxidativem Stress zu schützen (Sauer et al. 2012). Die Synthese von GSH erfolgt über die γ -Glutamylcystein-Synthetase und der Glutathion-Synthetase, beides Enzyme, die über Nrf-2 reguliert werden (Sauer et al. 2012). In nicht aktivierten Zellen liegt Nrf-2 gebunden an dem Repressor *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1) vor. Durch eine Aktivierung des Komplexes kommt es zur Abspaltung vom Keap1, sodass Nrf-2 in den Zellkern transloziert, an *antioxidant response element*

(ARE)/*electrophile response element* (EpRE) spezifischen Genen bindet und so zu einer gezielten Genexpression führt (Sauer et al. 2012). Proteine, die durch solche Gene kodiert werden, sind für die zelluläre Detoxifizierung und für die Aufrechterhaltung des antioxidativen Status der Zelle verantwortlich (Sauer et al. 2012). Aus diesem Grund stellt sich die Frage, ob die AGE-Modifikation einen Einfluss auf die antioxidativen Eigenschaften der Lebensmittelextrakte nimmt. Um die Wirkung von AGEs auf den NF- κ B-Signalweg und auf die Phase-II-Enzyme zu untersuchen, wurde herkömmliches Gliadin mit verschiedenen Zuckern und MG/G inkubiert. Anhand der Immunodetektion konnte die Bildung von AGE-Gliadin durch Inkubation mit Fruktose nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass Fruktose-Gliadin zu einer signifikanten Aktivierung des NF- κ Bs als auch zur Phosphorylierung der ERK-2-MAPKinase in RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen führte. Auch eine signifikante Steigerung der MnSOD- und NQO-1-mRNA-Konzentration konnte nach Stimulation der Zellen mit AGE-Gliadin bestimmt werden. Ein signifikanter Unterschied zum unmodifizierten Gliadin konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, wobei Fruktose-Gliadin eine tendenziell stärkere Steigerung der NQO-1-mRNA-Konzentration als Gliadin aufwies. Dies lässt vermuten, dass eine Modifikation des Gliadins mit Fruktose für 7 Tage bei 70 °C zu keiner ausreichenden AGE-Modifikation am Protein führte. Aus diesem Grund wurde zusätzlich AGE-BSA in der vorliegenden Arbeit verwendet. Die Inkubation mit Glukose, MG/G oder Ribose zeigte CML-Modifikationen am BSA, wobei die Inkubation mit MG/G die Bildung von Arg-Pyrimidin an BSA förderte (Anhang 0). In RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen führte AGE-BSA zu einer signifikant gesteigerten NF- κ B-Translokation (Anhang 8.3), als auch zu einer vermehrten Phosphorylierung der p38- und ERK-2-MAPKinasen (Anhang 8.4). Ein signifikanter Unterschied zwischen BSA und AGE-BSA war nicht vorhanden. Lediglich das MG/G-BSA führte tendenziell zu einer höheren NF- κ B-Aktivierung verglichen zum BSA. Grund für den fehlenden statistischen Unterschied zwischen BSA und dem AGE-BSA könnte eine Verunreinigung des BSA mit Endotoxin sein, da diese u.a. die gleichen inflammatorischen Signale aktivieren (Xie et al. 1993; Dukic-Stefanovic et al. 2003; Andreakos et al. 2004). Ein weiterer Grund stellt die Methode zur AGE-Bildung dar. Je nach verwendeter Methode kann es zur Bildung ganz unterschiedlicher AGE-Modifikationen kommen, sodass die Wirkungen in den entsprechenden Zellkultursystemen beeinflusst und eine Vergleichbarkeit erschwert wird. Zusätzlich herrscht in der Literatur immer noch Unklarheit, ob vor allem stark modifizierte Proteine die Zellen aktivieren (Valencia et al. 2004; Thornalley 2007) oder Modifikationen im nanomolaren Bereich eine effiziente Signaltransduktion hervorrufen (Kislinger et al. 1999).

Die vorliegenden Versuche mit AGE-Gliadin konnten die zellaktivierenden Effekte der Brotkruste nicht nachbilden. Eine Immunopräzipitation des CML-modifizierten Gliadins aus der Brotkruste zeigte jedoch, dass das Entfernen des CML-modifizierten Gliadins zu einer deutliche Minderung

der Bioaktivität der Brotkruste führte. Dies lässt vermuten, dass andere, nicht vergleichbare Modifikationen während der Inkubation mit Zuckern am AGE-Gliadin entstanden sein können, die im vorliegenden Zellmodell andere Signaltransduktionswege aktivierten. Zudem war es nicht möglich anhand der Modifikation mit Zuckern die gleichen Modifikationen am AGE-Gliadin zu simulieren, wie sie im Backprozess entstehen. Aus diesem Grund ist es wichtig, ein geeignetes Modell zu entwickeln, mit dem annähernd die gleichen AGE-Modifikationen, wie in der Brotkruste, nachgestellt werden können, um detaillierte Hinweise zur chemopräventiven Wirkweise der enthaltenen bioaktiven Substanzen zu bekommen.

5.3.2 Einfluss von AGE-Gliadin auf die AGE-spezifischen Rezeptoren

Wie eingangs beschrieben gibt es eine Vielzahl an AGE-spezifischen Rezeptoren, die an der Aufnahme, Transport und Verarbeitung der AGEs beteiligt sind. Dabei vermittelt die Ligand-Rezeptor-Interaktion unterschiedlichste Zellaktivierungen. Der am meist untersuchte Rezeptor dabei ist RAGE. Über Bildung von oxidativem Stress durch Bindung von AGEs an RAGE erfolgt die Zellaktivierung anhand einer gesteigerten NF- κ B-Translokation (Kislinger et al. 1999; Vlassara 2001; Indurthi et al. 2012; Nagai et al. 2012). Durch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine nimmt diese Rezeptor-Interaktion einen funktionellen Einfluss auf die Entwicklung vaskulärer Komplikationen bei Diabetes mellitus (Nagai et al. 2012). Studien ergaben, dass vor allem CML-modifizierte Proteine an der zytoplasmatischen Region von RAGE binden und für die NF- κ B-induzierende Wirkung von AGEs verantwortlich sind (Vlassara 2001; Ye et al. 2001; Zill et al. 2001; Krantz 2010). Eine solche RAGE-abhängige Zellaktivierung konnte ebenfalls in THP-1-, CaCO-2-Zellen und Fibroblasten mittels CML-Casein (Ye et al. 2001), CML-HSA (Faist et al. 2002) und CML-Collagen (Alikhani et al. 2007) nachgewiesen werden. Muscat et al. (2007) zeigten, dass ein NF- κ B aktivierender Effekt von AGEs auch RAGE-unabhängig erfolgen kann. Dazu wurde ein Maillard-Reaktions-Modell verwendet, bei dem AGEs durch eine 24-stündige Erhitzung von Lysin mit Ribose bei einer Temperatur von 120 °C gebildet wurden. In RAGE-transfizierten HEK-293-Zellen als auch in nicht-transfizierten Zellen führten diese AGEs zu einer signifikanten Steigerung der NF- κ B-Translokation (Muscat et al. 2007). Demnach begünstigen AGEs eine RAGE-unabhängige Bildung von H₂O₂, sodass der daraus resultierende oxidative Stress die NF- κ B-Translokation in den Zellkern verstärkt ohne eine Bildung von proinflammatorischer Substanzen, wie IL-6 und NO (Muscat et al. 2007).

AGE-R1 wird in der Literatur als Gegenspieler zur RAGE-induzierten ROS-Produktion beschrieben (Lu et al. 2004; Vlassara 2005; Cai et al. 2006; Sourris und Forbes 2009). Hohe Konzentrationen an intrazellulärem ROS führten zu einer Verminderung der Expression des AGE-R1, wodurch die Phosphorylierung von p66shc begünstigt wird (Sourris und Forbes 2009).

Das p66^{shc} Stress-Adaptor-Protein stellt dabei einen wichtigen Regulator des mitochondrialen und zytoplasmatischen oxidativen Stress, sowie der Apoptose dar (Cai et al. 2008). Phosphorylierung des p66^{shc} induziert die Aktivierung des Transkriptionsfaktors FKHRL-1, auch bezeichnet als FOXO-3, sodass die Aktivität der MnSOD negativ beeinträchtigt wird (Cai et al. 2008). Die Gliadin-freie BCE-Fraktion verminderte in der vorliegenden Arbeit die MnSOD- und AGE-R1-mRNA-Konzentration in RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen. Aus diesem Grund lässt sich vermuten, dass die Brotkruste als MRP-reiches Lebensmittel über moderaten oxidativen Stress die Phosphorylierung des p66shc-Proteins als auch des FKHRL-1 verhindert und die Menge der AGE-R1- und MnSOD-mRNA erhöht. Die chemopräventive Wirkung des Brotkrustenextraktes erklärt sich somit über die Bindung der MRPs an AGE-R1.

Neben AGE-R1 gehören AGE-R2 und AGE-R3 zum „AGE-Rezeptor-Komplex“, der an der Signaltransduktion und Endozytose AGE-modifizierter Proteine beteiligt ist (Stitt et al. 1999; Pugliese et al. 2001; Vlassara 2001; Ott et al. 2014). Der AGE-R3 transloziert in Gegenwart von AGEs verstärkt an die Zelloberfläche, wo er eine hohe Bindungsaffinität zu modifizierten Proteinen aufweist (Stitt et al. 1999; Pricci et al. 2000; Vlassara 2001). Indurthi et al. (2012) demonstrierten, dass vorwiegend Ribose-modifizierte Proteine an den AGE-R3 binden. Modifikationen mit Glukose, Glyoxal und Glycolaldehyd zeigten eine deutlich schlechtere Bindungsaffinität. Der Brotkrustenextrakt, als auch die Gliadin-freie BCE-Fraktion, zeigten keinen Einfluss auf die AGE-R3-mRNA-Konzentration. Dennoch ergaben die Versuche mit Gliadin und AGE-Gliadin eine signifikante Verminderung der AGE-R3-mRNA-Konzentration in RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen. Dies lässt vermuten, dass im Brotkrustenextrakt weitere bioaktive Substanzen vorhanden sind, die an AGE-R3 binden und den AGE-R3-hemmenden Effekt der Gliadine entgegenwirken. Auch die mRNA-Konzentration des AGE-R2 war nach der Präzipitation von CML-modifiziertem Gliadin deutlich vermindert. Die genaue Funktion des AGE-R2 ist bisher noch nicht vollständig geklärt.

Als weiterer AGE-spezifische Rezeptor wurde in der vorliegenden Arbeit der Scavenger-Rezeptor CD36 untersucht. Es zeigte sich, dass die lösliche Brotkruste keinen Einfluss auf die Konzentration der CD36-mRNA hatte, wohingegen die Präzipitation des CML-modifizierten Gliadins zu einer signifikanten Reduzierung der CD36-mRNA-Konzentration in den Makrophagen führte. Bindungen von AGEs an CD36 induzierten in 3T3-L1-Zellen oxidativen Stress und eine NF- κ B-Aktivierung (Horiuchi et al. 2005). Genexpressionsversuche mit kommerziellem Gliadin konnten diesen Effekt jedoch nicht bestätigen. Miyazaki et al. (2002) zeigten, dass CML kein Ligand für CD36 darstellt, sondern vermutlich Glycolaldehyd-modifizierte Protein aktiv an CD36 binden (Nagai et al. 2000). Demnach könnte die Modifikationsrate AGE-modifizierter Proteine für eine Ligandenbindung an CD36 verantwortlich sein. Eine leichte Modifikationsrate (Inkubation von

BSA mit 50 mM Glucose für 24 Wochen bei 37 °C) führte verglichen zu stark modifiziertem BSA (Inkubation mit 1,6 M Glukose für 40 Wochen bei 37 °C) in CD36-überexprimierenden CHO-Zellen und Monozyten zu keiner Ligandenbindung (Nagai et al. 2007). Daher ist die Modifikation von herkömmlichen Gliadin mit verschiedenen Zuckern für 7 Tage bei 70 °C vermutlich nicht ausreichend, um eine Wirkung auf den CD36-Rezeptor auszuüben. Vermutlich entstehen auf diese Weise auch andere AGE-modifizierte Proteine mit unterschiedlichsten Wirkungen. Basierend auf den Ergebnissen aus der vorliegenden Studie und der Literatur lassen sich folgende Wirkungsmechanismen der enthaltenen AGE-modifizierten Proteine auf die Zellaktivierung ableiten (Abbildung 34).

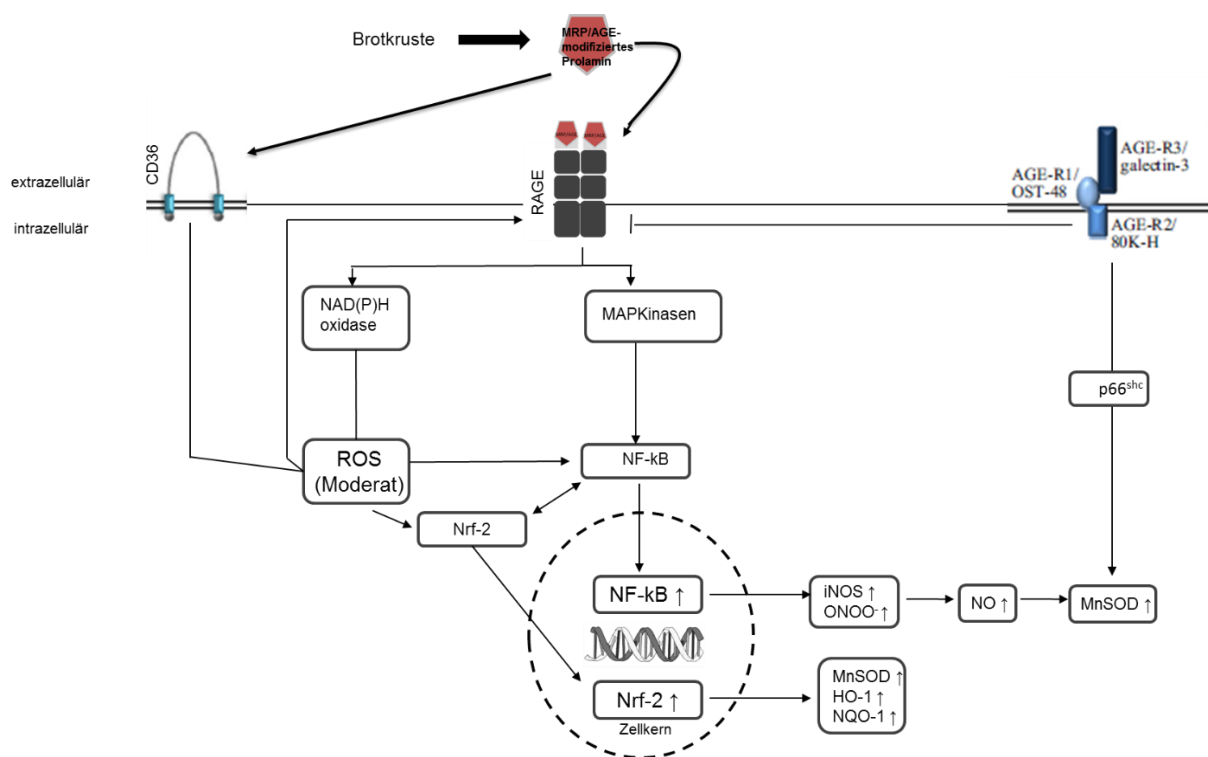


Abbildung 34: Schematische Darstellung des Signaltransduktionsweges von AGE-Gliadin durch Bindung an AGE-spezifische Rezeptoren (modifiziert nach Ott et al. (2014))

5.4 Gibt es Unterschiede zwischen den verschiedenen Brotsorten?

Die vorliegende Arbeit konnte AGE-modifiziertes Gliadin als bioaktive Komponente der Brotkruste nachweisen. Dabei wurde die Kruste eines Roggenmischbrottes benutzt und die bioaktive Substanz hinsichtlich ihrer Eigenschaft zur Zellaktivierung untersucht. Es stellt sich nun die Frage, ob die gleichen Effekte auch in reinen Weizen- und Roggenbrotten auftreten und ob unterschiedliche Getreidesorten bei der Brotherstellung einen Einfluss auf den Gehalt der Gliadine und dessen Wirkung nehmen können.

Gliadine gehören zu den Prolaminen und werden je nach verwendeter Getreidesorte unterschiedlich bezeichnet. In Weizenmehl ist der prozentuale Anteil der Gliadine bezogen auf das Aschegewicht ca. 32,6 %, wohingegen Roggenmehl etwa 20,9 % Secaline enthält (Belitz et al. 2009). Der höher prozentuale Anteil von Gliadin im Weizenmehl lässt vermuten, dass Weizenbrote aufgrund des Backprozesses tendenziell mehr AGE-Gliadine aufweisen als Roggenbrote. Bezogen auf die Ergebnisse dieser Arbeit hätten Weizenbrote eine deutlich chemopräventive und antioxidative Eigenschaft als Roggenbrote, da sie mehr bioaktive Gliadine besitzen. Serpen et al. (2008) zeigten jedoch, dass der Roggen eine höhere antioxidative Kapazität als der Weizen aufweist (Serpen et al. 2008). Da Roggenbrote eine erhöhte SOD-ähnliche Aktivität besitzen, sind sie in der Lage Radikale (Superoxid-Anionen) durch eine Disproportionierung in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff abzubauen und die Zellen vor oxidativen Stress zu schützen (Michalska et al. 2007). Welche genauen Inhaltsstoffe für die ähnlichen Aktivitäten verantwortlich sind, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Unter Berücksichtigung der vorliegenden Arbeit könnte die Prolaminfraktion ein möglicher Erklärungspunkt dafür sein. In wässriger Lösung sind Gliadine aufgrund ihres hohen Gehaltes unpolaren Aminosäuren-Resten (Glutamin, Prolin und Leucin) unlöslich (Iwami et al. 1987). Eine Deamidierung während der Sauerteigerstellung kommt es zu einer Umwandlung von Glutamin zu Glutaminsäure (Tranquet et al. 2012), sodass die Löslichkeit der Gliadine in wässrigen Lösungen verbessert werden kann (Iwami et al. 1987; Vermeulen et al. 2007; Wong et al. 2009). Ein Sauerteig wird vorwiegend bei der Roggenbrotherstellung verwendet. dass Secaline schon bei 0,04 M NaCl aus dem Roggenbrot extrahiert werden können (Lookhart et al. 1991). Aus diesem Grund enthalten Roggenbrote mehr lösliche Prolamine als klassische Weizenbrote, bei denen Sauerteig keine Anwendung fand. Betrachtet man andere Getreideprodukte (

Tabelle 11), so fällt auf, dass Reis einen Prolamingehalt von 2,2 % aufweist, wohingegen im Mais 47,9 % der Proteine Prolamine darstellen. Dies lässt vermuten, dass Brote auf Basis von Mais eine höhere antioxidative/chemopräventive Eigenschaft aufweisen können, als Roggenmischbrote. Brote, die aus Reismehl hergestellt werden, zeigen einen sehr geringen Prolaminanteil und weisen vermutlich die geringste Bioaktivität auf.

Tabelle 11: Proteinverteilung (%) auf die Osborne-Fractionen ausgewählter Getreideprodukte (Belitz)

	Weizen	Roggen	Gerste	Hafer	Reis	Hirse	Mais
Albumin	14,7	44,4	12,1	20,2	10,8	18,2	4,0
Globulin	7,0	10,2	8,4	11,9	9,7	6,1	2,8
Prolamin	32,6	20,9	25,0	14,0	2,2	33,9	47,9
Glutelin	45,7	24,5	54,5	53,9	77,3	41,8	45,3

Die vorliegende Arbeit lässt allerdings vermuten, dass neben AGE-modifizierten Proteine weitere bioaktive Substanzen vorhanden sind, die in Kombination mit den modifizierten Prolaminen, die antioxidativen/chemopräventiven Eigenschaften der Brotkruste vermitteln. Lindemeier et. al (2002) identifizierten Pronyl-lysin als eine weitere zellaktivierende Komponente der Brotkruste in einem Roggenmischbrot. Sie zeigten, dass die Stimulation von CaCo2-Zellen mit isoliertem/gereinigtem Pronyl-Lysin das Phase-II-Enzym GST signifikant erhöhte und eine Steigerung der GST in Niere und Leber von Wistar-Ratten durch Fütterungen mit Pronyl-Lysin die antioxidative Kapazität dieser Tiere deutlich steigerte (Lindemeier et. al 2002). Der Nachweis von Pronyl-Lysin in verschiedenen hocherhitzten Lebensmitteln schwankt jedoch deutlich (Somoza et al. 2005b). So enthält die Kruste eines Weizenbrotes etwa 6,6 mg Pronyl-Lysin/kg Brot, wohingegen ein Roggenmischbrot ca. 63 mg Pronyl-Lysin/kg Brot in der Kruste aufweist. Eine weitere mögliche Komponente im Brot stellen die Phenole dar (Michalska et al. 2008). Lösliche Phenole werden durch den Backprozess vermehrt freigesetzt, die neben den gebildeten MRPs für die antioxidative Wirkung verantwortlich sein können (Moore et al. 2009; Ktenioudaki et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde der Phenolgehalt der Brotkruste nicht bestimmt. Der Literatur ist jedoch zu entnehmen, dass der Gesamtphenolgehalt in der Brotkruste deutlich höher ist als in der Krume und die lösliche Brotkruste eine gesteigerte antioxidative Kapazität aufweist (Yu und Beta 2015). Des Weiteren wird in der Literatur diskutiert, dass Polyphenole, MRPs und unverdauliche Kohlenhydrate einen Ballaststoff-ähnlichen Komplex bilden, auch bezeichnet als „*maillardized dietary fibre*“, der u.a. für die positiven gesundheitsfördernden Eigenschaften der Brotkruste und Kaffee verantwortlich ist (Silván et al. 2010; Pérez-Jiménez et al. 2014; Helou et al. 2016).

Hinzukommt, dass hitzebehandelte Lebensmittel eine höhere antioxidative Kapazität aufweisen, als weniger hitzebehandelte Lebensmittel (Dittrich et al. 2009). So enthält die Brotkrume, dessen Temperatur während des Backprozesses nie mehr als 100 °C beträgt, eine deutlich niedrigere antioxidative Kapazität als die Kruste, bei der bis zu 205 °C während des Backprozesses gemessen werden konnten (Dittrich et al. 2009; Helou et al. 2016). Die Konzentration an MRPs in

der Kruste steigt mit fortschreitendem Backprozess, wohingegen die MRP-Konzentration in der Krume unverändert bleibt (Helou et al. 2016). Die Temperatur des Backprozesses ist damit ein entscheidender Faktor für die Bildung antioxidativ wirkender Substanzen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Gehalte an AGE-modifizierten Prolaminen vor allem von der verwendeten Getreideart, als auch von den Backbedingungen (Temperatur und Dauer des Backens) abhängig sind.

5.5 Klinische Relevanz einer möglichen Brotkrustendiät

Die endogene Bildung von AGEs findet in allen Geweben und Körperflüssigkeiten unter physiologischen Bedingungen statt. Dabei unterliegen vor allem langlebige Proteine einer nicht-enzymatischen Reaktion, sodass Proteine strukturell und funktionell modifiziert werden. Bei altersbedingten Erkrankungen, wie z.B. Diabetes Mellitus, treten erhöhte Blutglukosespiegel auf, die die AGE-Bildung fördern. Da der Mensch vermehrt stark-hitzebehandelte Lebensmittel, wie z.B. Brot oder Kaffee verzehrt, steigt zusätzlich die Anreicherung mit exogen-gebildeten MRPs. Abhängig vom Gesundheitszustand der Menschen werden etwa 30 % der absorbierten MRPs über den Urin wieder ausgeschieden (Faist und Erbersdobler 2001; Tuohy et al. 2006; Morales et al. 2012). Die restlichen MRPs akkumulieren im Gewebe und erhöhen den allgemeinen AGE-Pool des Körpers (Charissou et al. 2007; Roncero-Ramos et al. 2014).

Es gibt eine Vielzahl an Humanstudien, die den Einfluss der Maillard-Reaktion bzw. AGE-modifizierter Proteine auf die Entstehung altersbedingter Komplikationen untersuchten. Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lassen sich antioxidative und chemopräventive Eigenschaften für AGE-modifizierter Proteine ableiten. Es konnte nachgewiesen werden, dass CML-modifiziertes Gliadin neben einer gesteigerten NF- κ B-Translokation zu einer signifikanten Steigerung der MnSOD- und NQO-1-mRNA-Konzentration führte. Ein Entfernen des Gliadins aus der löslichen Brotkruste führte zu einer drastischen Verringerung der AGE-R1- und AGE-R2-mRNA-Konzentration. Somit stellt sich die Frage, ob AGE-modifiziertes Gliadin zur Prävention koronarer Herzerkrankungen und verschiedener Krebsarten eingesetzt werden kann. Diese Fragestellung wird besonders bei älteren Personen wichtig. Da bei älteren Personen das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen aufgrund von gesteigertem Stress steigt. Daher ist es wichtig, besonders bei älteren Personen den antioxidativen Status zu stärken. Aufgrund von Kau-, Schluckbeschwerden und einem verringertem Speichelfluss verzichten jedoch viele Senioren auf den Verzehr von harten Speisen, wie z.B. Brotkruste (Fuckerer et al. 2015). In einer Studie mit 41 Senioren gaben 42 % der Probanden an, dass sie an Kauproblemen leiden (Fuckerer et al. 2015). Der gleiche Anteil an Senioren bevorzugte krustenloses Brot, auch wenn über 80 % der Senioren die Brotkruste als wichtiges Kriterium für ein gutes Brot hielten (Fuckerer et al. 2015). In diesem

Fall wäre es ratsam, AGE-modifiziertes Gliadin aus der Brotkruste zu isolieren und z.B. in Keksen anzureichern oder als Nahrungsergänzungsmitteln auf den Markt zu bringen. Bezogen auf die Präinkubationsversuche von Ruhs et al. (2012) könnte die Brotkruste als präventive Therapie vor einem operativen Eingriff eingesetzt werden. Zellkulturstudien mit Cardiofibroblasten zeigten, dass eine Präinkubation mit der löslichen Brotkruste zu einer etwa 50 % reduzierten Zelltod-Rate führte und die präinkubierten Zellen vor Ischämie/Reperfusion induziertem oxidativen Stress deutlich geschützt waren (Ruhs et al. 2010). Eine Glyoxal-Behandlung des Trabeculae carneaе (Herzmuskelfaserstränge der Herzscheidewand) führte zu einer deutlichen AGE-Modifikation, wodurch das Gewebe gegenüber Ischämie/Reperfusion geschützt war (Simm et al. 2015). Auch bei Lungenkrebs-Patienten (NSCLC) besaßen Patienten mit einem hohen Plasmagehalten an AGEs eine höhere Überlebensrate als Patienten mit niedrigeren AGE-Gehalten (Bartling et al. 2011). Nacktmäuse, die mit einem löslichen Brotkrustenextrakt gefüttert wurden, zeigten eine deutlich geringere Bildung an Lungentumoren als Mäuse (Bartling et al. 2011).

6 Zusammenfassung

Die Maillard-Reaktion stellt eine nicht-enzymatische Reaktion zwischen Carbonylverbindungen und Aminogruppen dar (Bastos und Monaro 2012). Neben der endogenen Bildung von *Advanced glycation end products* (AGEs), führt die Maillard-Reaktion während der Lebensmittelherstellung zur Bildung von Maillard-Reaktionsprodukten (MRPs). Generell kann davon ausgegangen werden, dass Lebensmittel mit hohen Ausgangsgehalten an Proteinen, freien Aminosäuren, Lipiden und Monosacchariden einen hohen Gehalt an MRPs aufweisen (Maslo 2006). Über die klassische Westerntät, einer Zucker- und Fett-reichen Ernährung, werden somit 10 g MRPs pro Tag aufgenommen (Morales et al. 2012). Ernährungsstudien mit Brotkrusten-reicher Nahrung zeigten, dass stark erhitzte Lebensmittel protektive Komponenten besitzen, die die Expression chemopräventiver Gene fördern und so das antioxidative System des Organismus unterstützen. Es wird diskutiert, ob diese Wirkung AGE-vermittelt ist. Bisher konnten nur einige wenige AGEs aus der Brotkruste isoliert und identifiziert werden, die für die bioaktive Wirkung verantwortlich sind.

Aus diesem Grund beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Identifizierung weiterer bioaktiver Stoffe in der Brotkruste. Anhand der Boronsäuren-Affinitäts-Chromatographie, als auch der Autofluoreszenz und Immunodetektion konnte ein hoher Anteil an AGE-modifizierter Proteine in der löslichen Brotkruste bestimmt werden, die aufgrund des Backprozesses und der fortschreitenden Maillard-Reaktion im Lebensmittelextrakt gebildet wurden. Mittels LC-MS/MS-Analysen erfolgte ein qualitativer Nachweis von CML, CEL und weiteren AGEs in der Brotkruste. Eine 24-stündige Inkubation transfizierter RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen mit der Brotkruste führte zu einer signifikanten Steigerung der Phosphorylierung der ERK-2-MAPKinase gefolgt von einer signifikanten Anreicherung von NF- κ B im Zellkulturmedium. Des Weiteren konnte eine signifikant gesteigerte mRNA-Konzentration der Phase-II-Enzyme MnSOD, NQO-1 und HO-1 in Makrophagen nach Stimulation mit der löslichen Brotkruste nachgewiesen werden. Somit vermittelt die Brotkruste einen chemopräventiven Effekt über Induzierung von oxidativen Stress in den Makrophagen.

Zur weiteren Strukturaufklärung der Brotkruste erfolgte die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung. In der Brotkruste konnte ein hoher Gehalt an Glutamin und Prolin identifiziert werden. Diese Zusammensetzung ist charakteristisch für Gliadine und lässt vermuten, dass die lösliche Brotkruste vorwiegend Prolamine enthält. Diese Vermutung konnte über LC-MS/MS und Immunodetektion mit spezifischen Gliadin-Antikörpern bestätigt werden. Zur Überprüfung der Hypothese, inwiefern Gliadine eine bioaktive Komponente der Brotkruste darstellen, wurden Immunopräzipitationsversuche herangezogen. Es zeigte sich, dass durch die Isolierung von Gliadin aus der Brotkruste die eigentliche NF- κ B-Aktivierung und die Steigerung

der MnSOD-mRNA-Konzentration in RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen verloren ging. Die Gliadin-freie BCE-Fraktion induzierte die mRNA-Konzentration von NQO-1, jedoch verglichen zur Brotkruste konnte eine ähnliche Steigerung der NQO-1-mRNA-Konzentration nicht erreicht werden. Da die Brotkruste einen komplexen Lebensmittelextrakt darstellt, wurden diese Versuche mit isoliertem/gereinigtem Gliadin wiederholt. Gereinigtes Gliadin induzierte den NF- κ B-Signaltransduktionsweg und steigerte die MnSOD-mRNA-Konzentration in den Makrophagen. Dies bestätigt, dass Gliadin eine bioaktive Substanz der Brotkruste darstellt und für die zellaktivierenden Effekte in den RAW/NF- κ B/SEAPorter™ Zellen verantwortlich ist.

Da die Maillard-Reaktion während des Backprozesses verstärkt in der Kruste abläuft, ist zu klären, ob die Gliadine in der Brotkruste modifiziert vorlagen. Eine Immunopräzipitation der Brotkruste mit anschließender Immunodetektion ergab eine CML-Modifikation des enthaltenen Gliadins. Da die Gliadin-freie BCE-Fraktion zu einem Verlust der zellaktivierenden Eigenschaften der Brotkruste führte, wurde untersucht, ob die AGE-Modifikation an sich für die Bioaktivität der Brotkruste verantwortlich war. Dazu erfolgte eine Inkubation des gereinigten Gliadins mit Fruktose, die zu einer CML- und Arg-Pyrimidin-Modifikation führte. Eine Stimulation der RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen mit Fruktose-Gliadin zeigte eine signifikante Phosphorylierung der ERK-2-MAPKinase, als auch eine NF- κ B-Aktivierung. Ein signifikanter Unterschied zur unmodifizierten Form konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Anhand der Ergebnisse kann nicht eindeutig bestätigt werden, dass die AGE-Modifikation an sich für die protektive Eigenschaften der Brotkruste verantwortlich ist.

Festzuhalten ist, dass der lösliche Brotkrustenextrakt CML-modifizierte Gliadine aufweist, die für die NF- κ B-Aktivierung und für die gesteigerte mRNA-Konzentration von MnSOD und NQO-1 verantwortlich waren. Somit wurde im Rahmen dieser Arbeit eine weitere bioaktive Komponente der Brotkruste identifiziert. Versuche mit herkömmlichen Gliadin bzw. AGE-Gliadin konnten die Ergebnisse der Brotkruste nicht eindeutig nachbilden. Die *ex vivo*-Modifikation des Gliadins mit verschiedenen Zuckern stellt kein vergleichbares Modell zur Nachbildung des Backprozesses dar. Aus diesem Grund konnte nicht abschließend geklärt werden, ob die AGE-Modifikation an sich für den antioxidativen und chemopräventiven Effekt der Brotkruste verantwortlich ist.

7 Literaturverzeichnis

- Açar, Ö.; Gökmen, V.; Pellegrini, N.; Fogliano, V.** (2009): Direct evaluation of the total antioxidant capacity of raw and roasted pulses, nuts and seeds. In: *European Food Research and Technology* 229 (6), S. 961–969.
- Ahmed, N.** (2005): Advanced glycation endproducts—role in pathology of diabetic complications. In: *Diabetes Research and Clinical Practice* 67 (1), S. 3–21.
- Ahmed, N.; Argirov, O.; Minhas, H.; Cordeiro, C.; Thornalley, P.** (2002): Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to N-carboxymethyl-lysine and N-(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin. In: *Biochemical Journal* 364 (1), S. 1–14.
- Ahmed, N.; Thornalley, P.** (2007): Advanced glycation endproducts: what is their relevance to diabetic complications? In: *Diabetes, Obesity and Metabolism* 9 (3), S. 233–245.
- Alikhani, M.; Maclellan, C.; Raptis, M.; Vora, S.; Trackman, P.; Graves, D.** (2007): Advanced glycation end products induce apoptosis in fibroblasts through activation of ROS, MAP kinases, and the FOXO1 transcription factor. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 292 (2), S. C850-6.
- Ames, J.; Wynne, A.; Hofmann, A.; Plos, S.; Gibson, G.** (1999): The effect of a model melanoidin mixture on faecal bacterial populations in vitro. In: *British Journal of Nutrition* 82 (6), S. 489–495.
- Andreakos, E.; Sacre, S.; Smith, C.; Lundberg, A.; Kiriakidis, S.; Stonehouse, T. et al.** (2004): Distinct pathways of LPS-induced NF-kappa B activation and cytokine production in human myeloid and nonmyeloid cells defined by selective utilization of MyD88 and Mal/TIRAP. In: *Blood* 103 (6), S. 2229–2237.
- Ang, S.; Kogulanathan, J.; Morris, G.; Kök, M.; Shewry, P.; Tatham, A. et al.** (2010): Structure and heterogeneity of gliadin: a hydrodynamic evaluation. In: *European biophysics journal : EBJ* 39 (2), S. 255–261.
- Assar, S.; Moloney, C.; Lima, M.; Magee, R.; Ames, J.** (2009): Determination of Nepsilon-(carboxymethyl)lysine in food systems by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. In: *Amino Acids* 36 (2), S. 317–326.
- Bartling, B.; Fuchs, C.; Somoza, V.; Niemann, B.; Silber, R.-E.; Simm, A.** (2007): Lung level of HMBG1 is elevated in response to advanced glycation end product-enriched food in vivo. In: *Molecular nutrition & food research* 51 (4), S. 479–487.
- Bartling, B.; Hofmann, H.-S.; Sohst, A.; Hatzky, Y.; Somoza, V.; Silber, R.-E.; Simm, A.** (2011): Prognostic potential and tumor growth-inhibiting effect of plasma advanced glycation end products in non-small cell lung carcinoma. In: *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 17 (9-10), S. 980–989.
- Bastos, D.; Monaro, E.** (2012): Food Industrial Processes - Methods and Equipment. Maillard reaction products in processed food: Pros and Cons. In: *InTech* 1 (1), S. 281–300.
- Beisswenger, P.; Howell, S.; Mackenzie, T.; Corstjens, H.; Muizzuddin, N.; Matsui, M.** (2012): Two Fluorescent Wavelengths, 440 ex /520 em nm and 370 ex /440 em nm, Reflect Advanced Glycation and Oxidation End Products in Human Skin Without Diabetes. In: *Diabetes Technology & Therapeutics* 14 (3), S. 285–292.
- Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P.** (2009): Food Chemistry. 4th rev. and extended ed. Berlin: Springer-Verlag.

- Bierhaus, A.; Hofmann, M.; Ziegler, R.; Nawroth, P.** (1998): AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. The AGE concept. In: *Cardiovascular Research* 37 (3), S. 586–600.
- Blank, I.; Devaud, S.; Matthey-Doret, W.; Pollien, P.; Robert, F.; Yeretizian, C.** (2003): Flavour Research at the Dawn of the Twenty-first Century. Formation of odour-active compounds in Maillard model systems based on proline: Lavoisier/Intercept.
- Borrelli, R.; Fogliano, V.** (2005): Bread crust melanoidins as potential prebiotic ingredients. In: *Mol Nutr Food Res* 49 (7), S. 673–678.
- Borrelli, R.; Visconti, A.; Mennella, C.; Anese, M.; Fogliano, V.** (2002): Chemical Characterization and Antioxidant Properties of Coffee Melanoidins. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (22), S. 6527–6533.
- Bowie, A.; O'Neill, L.** (2000): Oxidative stress and nuclear factor-kB activation: A reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. In: *Biochemical Pharmacology* 59 (1), S. 13–23.
- Brandt, M. J.; Gänzle, M. G.** (2006): Handbuch Sauerteig. 6. Auflage. Hamburg: Behr's Verlag DE.
- Brownlee, M.** (1984): Nonenzymatic Glycosylation and the Pathogenesis of Diabetic Complications. In: *Annals of Internal Medicine* 101 (4), S. 527.
- Cai, W.; He, J.; Lu, C.; VLASSARA, H.** (2006): Advanced glycation end product (AGE) receptor 1 suppresses cell oxidant stress and activation signaling via EGF receptor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (37), S. 13801–13806.
- Cai, W.; He, J.; Zhu, L.; Chen, X.; Striker, G.; VLASSARA, H.** (2008): AGE-receptor-1 counteracts cellular oxidant stress induced by AGEs via negative regulation of p66shc-dependent FKHRL1 phosphorylation. In: *AJP: Cell Physiology* 294 (1), S. 145–152.
- Carter, A.; Knudtson, K.; Monick, M.; Hunninghake, G.** (1999): The p38 mitogen-activated protein kinase is required for NF-kB-dependent gene expression. In: *Journal of biological chemistry* 274 (43), S. 30858–30863.
- Charissou, A.; Ait-Ameur, L.; Birlouez-Aragon, I.** (2007): Evaluation of a gas chromatography/mass spectrometry method for the quantification of carboxymethyllysine in food samples. In: *Journal of Chromatography A* 1140 (1-2), S. 189–194.
- Daglia, M.; Racchi, M.; Papetti, A.; Lanni, C.; Govoni, S.; Gazzani, G.** (2004): In Vitro and ex Vivo Antihydroxyl Radical Activity of Green and Roasted Coffee. In: *Journal of Agricultural and food chemistry* 52 (6), S. 1700–1704.
- Daoud, S.; Schinzel, R.; Neumann, A.; Loske, C.; Fraccarollo, D.; Diez, C.; Simm, A.** (2001): Advanced glycation endproducts: activators of cardiac remodeling in primary fibroblasts from adult rat hearts. In: *Molecular Medicine* 7 (8), S. 543–551.
- Delgado-Andrade, C.; Rufián-Henares, J.; Morales, F.** (2005): Assessing the Antioxidant Activity of Melanoidins from Coffee Brews by Different Antioxidant Methods. In: *Journal of Agricultural and food chemistry* 53 (20), S. 7832–7836.
- Dittrich, R.; Dragonas, C.; Kannenkeril, D.; Hoffmann, I.; Mueller, A.; Beckmann, M.; Pischetsrieder, M.** (2009): A diet rich in Maillard reaction products protects LDL against copper induced oxidation ex vivo, a human intervention trial. In: *Food Research International* 42 (9), S. 1315–1322.
- Dittrich, R.; El-massry, F.; Kunz, K.; Rinaldi, F.; Peich, C.; Beckmann, M.; Pischetsrieder, M.** (2003): Maillard Reaction Products Inhibit Oxidation of Human Low-Density Lipoproteins in Vitro. In: *Journal of Agricultural and food chemistry* 51 (13), S. 3900–3904.

- Dukic-Stefanovic, S.; Gasic-Milenkovic, J.; Deuther-Conrad, W.; Münch, G.** (2003): Signal transduction pathways in mouse microglia N-11 cells activated by advanced glycation endproducts (AGEs). In: *Journal of Neurochemistry* 87 (1), S. 44–55.
- Ebermann, R.; Elmadfa, I.** (2011): Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung. 2. Auflage. Wien: Springer-Verlag.
- Faist, V.; Erbersdobler, H.** (2001): Metabolic transit and in vivo effects of melanoidins and precursor compounds deriving from the Maillard Reaction. In: *Annals of Nutrition and Metabolism* 45 (1), S. 1–12.
- Faist, V.; Hofmann, T.; Zill, H.; Baynes, J.; Thorpe, S.; Sebekova, K. et al.** (2002): Effects of dietary N-carboxymethyllysine on expression of the biotransformation enzyme, glutathione-S-transferase, in the rat. In: *International Congress Series* 1245, S. 313–320.
- Finkel, T.; Holbrook, N.** (2000): Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. In: *nature* 408 (6809), S. 239–247.
- Frolov, A.; Hoffmann, R.** (2008): Analysis of Amadori Peptides Enriched by Boronic Acid Affinity Chromatography. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1126 (1), S. 253–256.
- Fuckerer, K.; Hensel, O.; Schmitt, J.** (2015): Evaluation of crustless bread by elderly persons and students. In: *Ernährungs-Umschau* 62 (10), S. 167–169.
- Gerrard, J.** (2002): Protein–protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. In: *Trends in Food Science & Technology* 13 (12), S. 391–399.
- Goesaert, H.; Brijs, K.; Veraverbeke, W.; Courtin, C.; Gebruers, K.; Delcour, J.** (2005): Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. In: *Trends in Food Science & Technology* 16 (1-3), S. 12–30.
- Grillo, M.; Colombatto, S.** (2008): Advanced glycation end-products (AGEs): involvement in aging and in neurodegenerative diseases. In: *Amino Acids* 35 (1), S. 29–36.
- Hayden, M.** (2004): Signaling to NF- B. In: *Genes & Development* 18 (18), S. 2195–2224.
- Hayden, M.; Ghosh, S.** (2008): Shared principles in NF-kappaB signaling. In: *Cell* 132 (3), S. 344–362.
- He, M.; Siow, R.; Sugden, D.; Gao, L.; Cheng, X.; Mann, G.** (2010): Induction of HO-1 and redox signaling in endothelial cells by advanced glycation end products: A role for Nrf2 in vascular protection in diabetes. In: *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 21 (4), S. 277–285.
- Heiss, R.** (2013): Lebensmitteltechnologie: Biotechnologische, chemische, mechanische und thermische Verfahren der Lebensmittelverarbeitung. 6. Auflage: Springer Berlin Heidelberg.
- Hellwig, M.; Henle, T.** (2014): Baking, Ageing, Diabetes: A Short History of the Maillard Reaction. In: *Angewandte Chemie International Edition* 53 (39), S. 10316–10329.
- Helou, C.; Jacolot, P.; Niquet-Léridon, C.; Gadonna-Widehem, P.; Tessier, F.** (2016): Maillard reaction products in bread: A novel semi-quantitative method for evaluating melanoidins in bread. In: *Food Chemistry* 190, S. 904–911.
- Henle, T.** (2003): AGEs in foods: Do they play a role in uremia? In: *Kidney International* 63 (84), S. 145–147.
- Henle, T.** (2005): Protein-bound advanced glycation endproducts (AGEs) as bioactive amino acid derivatives in foods. In: *Amino Acids* 29 (4), S. 313–322.

- Horiuchi, S.; Unno, Y.; Usui, H.; Shikata, K.; Takaki, K.; Koito, W. et al.** (2005): Pathological roles of advanced glycation end product receptors SR-A and CD36. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1043, S. 671–675.
- Horszwald, A.; Troszynska, A.; del Castillo, M.; Zielinski, H.** (2009): Protein profile and sensorial properties of rye breads. In: *European Food Research and Technology* 229 (6), S. 875–886.
- Hui, Y. H.** (2006): Handbook of Food Science, Technology, and Engineering: Taylor & Francis (Bd. 4).
- Hui, Y. H.; Corke, H.; Leyn, I. de** (2008): Bakery Products. Science and Technology. Hoboken: John Wiley & Sons.
- Indurthi, V.; Leclerc, E.; Vetter, S.** (2012): Interaction between glycated serum albumin and AGE-receptors depends on structural changes and the glycation reagent. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 528 (2), S. 185–196.
- Iwami, K.; Hattori, M.; Ibuki, F.** (1987): Prominent antioxidant effect of wheat gliadin on linoleate peroxidation in powder model systems at high water activity. In: *Journal of Agricultural and food chemistry* 35 (4), S. 628–631.
- Jelínková, L.; Tučková, L.; Cinová, J.; Flegelová, Z.; Tlaskalová-Hogenová, H.** (2004): Gliadin stimulates human monocytes to production of IL-8 and TNF- α through a mechanism involving NF- κ B. In: *FEBS Letters* 571 (1-3), S. 81–85.
- Kawase, S.; Matsumura, Y.; Murakami, H.; Mari, T.** (1998): Comparison of Antioxidative Activity Among Three Types of Prolamin Subunits. In: *Journal of Cereal Science* (28), S. 33–41.
- Kierdorf, K.; Fritz, G.** (2013): RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. In: *Journal of Leukocyte Biology* 94 (1), S. 55–68.
- Kislinger, T.; Fu, c.; Hubert, B.; Qu, W.; Taguchi, A.; Yan, S. et al.** (1999): N-(Carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. In: *Journal of biological chemistry* 274 (44), S. 31740–31749.
- Klingler, P.** (2010): Grundlagen der Getreidetechnologie: Behr's Verlag DE.
- Krantz, S.** (2010): Janusgesicht Glucose. Die Bedeutung der Maillard-Reaktion für das Altern, diabetischer Folgeerkrankungen sowie degenerative und entzündliche Krankheitsprozesse. 1. Auflage. Deutschland: tredition.
- Ktenioudaki, A.; Alvarez-Jubete, L.; Gallagher, E.** (2013): A review of the process-induced changes in the phytochemical content of cereal grains: The breadmaking process. In: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55 (5), S. 611–619.
- Kulp, K.; Ponte, J.** (2000): Handbook of Cereal Science and Technology: Marcel Dekker.
- Laemmli, U.** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *nature* (227), S. 680–685.
- Lammers, K.; Lu, R.; Brownley, J.; Lu, B.; Gerard, C.; Thomas, K. et al.** (2008): Gliadin Induces an Increase in Intestinal Permeability and Zonulin Release by Binding to the Chemokine Receptor CXCR3. In: *Gastroenterology* 135 (1), S. 194–204.e3.
- Lander, H.; Tauras, J.; Ogiste, J.; Hori, O.; Moss, R.; Schmidt, A.** (1997): Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21ras-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. In: *Journal of biological chemistry* 272 (28), S. 17810–17814.

- Leuner, B.; Ruhs, S.; Brömme, H.-J.; Bierhaus, A.; Sel, S.; Silber, R.-E. et al.** (2012): RAGE-dependent activation of gene expression of superoxide dismutase and vanins by AGE-rich extracts in mice cardiac tissue and murine cardiac fibroblasts. In: *Food & function* 3 (10), S. 1091–1098.
- Li, N.; Karin, M.** (1999): Is NF- κ B the sensor of oxidative stress? In: *FASEB* 13, S. 1137–1143.
- Lindenmeier, M.; Faist, V.; Hofmann, T.** (2002): 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. In: *Journal of Agricultural and food chemistry* 50 (24), S. 6997–7006.
- Lookhart, G.; Graybosch, R.; Peterson, J.; Lukaszewski, A.** (1991): Identification of wheat lines containing the 1BL/1RS translocation by high-performance liquid chromatography. In: *Cereal Chemistry* (68), S. 312–316.
- Lu, C.; He, J.; Cai, W.; Liu, H.; Zhu, L.; VLASSARA, H.** (2004): Advanced glycation endproduct (AGE) receptor 1 is a negative regulator of the inflammatory response to AGE in mesangial cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (32), S. 11767–11772.
- Maeng, Y.-S.; Min, J.-K.; Kim, J.; Yamagishi, A.; Mochizuki, N.; Kwon, J.-Y. et al.** (2006): ERK is an anti-inflammatory signal that suppresses expression of NF- κ B-dependent inflammatory genes by inhibiting IKK activity in endothelial cells. In: *Cellular Signaling* 18, S. 994–1005.
- Maiuri, M.; Stefano, D. de; Mele, G.; Iovine, B.; Bevilacqua, M.; Greco, L. et al.** (2003): Gliadin increases iNOS gene expression in interferon- γ -stimulated RAW 264.7 cells through a mechanism involving NF- κ B - Springer. In: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* (368), S. 63–71.
- Manzocco, L.; Calligaris, S.; Mastrocola, D.; Nicoli, M.; Lerici, C.** (2000): Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. In: *Trends in Food Science & Technology* 11 (9-10), S. 340–346.
- Martindale, J.; Holbrook, N.** (2002): Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. In: *Journal of cellular physiology* 192, S. 1–15.
- Maslo, R.** (2006): Maillard-Reaktionsprodukte in Lebensmitteln: Mögliche gesundheitliche Bedeutung. In: *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 1 (2), S. 125–134.
- Michalska, A.; Amigo-Benavent, M.; Zielinski, H.; del Castillo, M.** (2008): Effect of bread making on formation of Maillard reaction products contributing to the overall antioxidant activity of rye bread. In: *Journal of Cereal Science* 48 (1), S. 123–132.
- Michalska, A.; Ceglinska, A.; Amarowicz, R.; Piskula, M.; Szawara-Nowak, D.; Zielinski, H.** (2007): Antioxidant Contents and Antioxidative Properties of Traditional Rye Breads. In: *Journal of Agricultural and food chemistry* 55 (3), S. 734–740.
- Mondal, A.; Datta, A.** (2008): Bread baking – A review. In: *Journal of Food Engineering* 86 (4), S. 465–474.
- Moore, J.; Luther, M.; Cheng, Z.; Yu, L.** (2009): Effects of baking conditions, dough fermentation, and bran particle size on antioxidant properties of whole-wheat pizza crusts. In: *Journal of Agricultural and food chemistry* 57 (3), S. 832–839.
- Moossavi, S.** (2013): Gliadin is an uncatalogued Toll-like receptor ligand. In: *Journal of Medical Hypotheses and Ideas* 8 (1), S. 44–47.
- Morales, F.; Babbal, M.-B.** (2002): Melanoidins exert a weak antiradical activity in watery fluids. In: *Journal of Agricultural and food chemistry* 50 (16), S. 4657–4661.
- Morales, F.; Jiménez-Pérez, S.** (2001): Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. In: *Food Chemistry* 72 (1), S. 119–125.

- Morales, F.; Somoza, V.; Fogliano, V.** (2012): Physiological relevance of dietary melanoidins. In: *Amino Acids* 42 (4), S. 1097–1109.
- Münch, G.; Schicktanz, D.; Behme, A.; Gerlach, M.; Riederer, P.; Palm, D.; Schinzel, R.** (1999): Amino acid specificity of glycation and protein-AGE crosslinking reactivities determined with a dipeptide SPOT library. In: *Nature biotechnology* 17 (10), S. 1006–1010.
- Muscat, S.; Pelka, J.; Hegele, J.; Weigle, B.; Munch, G.; Pischetsrieder, M.** (2007): Coffee and Maillard products activate NF-kappaB in macrophages via H2O2 production. In: *Molecular nutrition & food research* 51 (5), S. 525–535.
- Nagai, R.; Jinno, M.; Ichihashi, M.; Koyama, H.; Yamamoto, Y.; Yonei, Y.** (2012): Advanced glycation end products and their receptors as risk factors for aging. In: *Anti-Aging Medicine* 4, S. 108–113.
- Nagai, R.; Matsumoto, K.; Ling, X.; Suzuki, H.; Araki, T.; Horiuchi, S.** (2000): Glycolaldehyde, a reactive intermediate for advanced glycation end products, plays an important role in the generation of an active ligand for the macrophage scavenger receptor. In: *Diabetes* 49, S. 1714–1723.
- Nagai, R.; Mera, K.; Nakajou, K.; Fujiwara, Y.; Iwao, Y.; Imai, H. et al.** (2007): The ligand activity of AGE-proteins to scavenger receptors is dependent on their rate of modification by AGEs. In: *Biochimica et biophysica acta* 1772 (11-12), S. 1192–1198.
- Nass, N.; Weissenberg, K.; Somoza, V.; Ruhs, S.; Silber, R.-E.; Simm, A.** (2014): Cell culture condition-dependent impact of AGE-rich food extracts on kinase activation and cell survival on human fibroblasts. In: *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 65 (2), S. 219–225.
- Nicoli, M.; Anese, M.; Parpinel, M.** (1999): Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. In: *Trends in Food Science & Technology* 10 (3), S. 94–100.
- Ott, C.; Jacobs, K.; Haucke, E.; Navarrete Santos, A.; Grune, T.; Simm, A.** (2014): Role of advanced glycation end products in cellular signaling. In: *Redox Biology* 2, S. 411–429.
- Palosuo, K.; Alenius, H.; Varjonen, E.; Kalkkinen, N.; Reunala, T.** (2001): Rye γ -70 and γ -35 secalins and barley γ -3 hordein cross-react with ω -5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent, exercise-induced anaphylaxis. In: *Clinical and Experimental Allergy* 31, S. 466–473.
- Palová-Jelínková, L.; Dáňová, K.; Drašarová, H.; Dvořák, M.; Funda, D.; Fundová, P. et al.** (2013): Pepsin Digest of Wheat Gliadin Fraction Increases Production of IL-1 β via TLR4/MyD88/TRIF/MAPK/NF- κ B Signaling Pathway and an NLRP3 Inflammasome Activation. In: *PLoS ONE* 8 (4), S. e62426.
- Pastoriza, S.; Roncero-Ramos, I.; Rufián-Henares, J.; Delgado-Andrade, C.** (2014): Antioxidant balance after long-term consumption of standard diets including bread crust glycated compounds by adult rats. In: *Food Research International* 64, S. 106–113.
- Pérez-Jiménez, J.; Díaz-Rubio, M.; Mesías, M.; Morales, F.; Saura-Calixto, F.** (2014): Evidence for the formation of maillardized insoluble dietary fiber in bread: A specific kind of dietary fiber in thermally processed food. In: *Food Research International* 55, S. 391–396.
- Pöttsch, S.; Blankenhorn, A.; Navarrete Santos, A.; Silber, R.-E.; Somoza, V.; Simm, A.** (2013): The effect of an AGE-rich dietary extract on the activation of NF- κ B depends on the cell model used. In: *Food & Function* 4 (7), S. 1023.
- Poulsen, M.; Bak, M.; Andersen, J.; Monošík, R.; Giraudi-Futin, A.; Holst, J. et al.** (2014): Effect of dietary advanced glycation end products on postprandial appetite, inflammation, and endothelial activation in healthy overweight individuals. In: *European Journal of Nutrition* 53 (2), S. 661–672.

- Poulsen, M.; Hedegaard, R.; Andersen, J.; Courten, B. de; Bügel, S.; Nielsen, J. et al.** (2013): Advanced glycation endproducts in food and their effects on health. In: *Food and Chemical Toxicology* 60, S. 10–37.
- Pricci, F.; Leto, G.; Amadio, L.; Iacobini, C.; Romeo, G.; Cordone, S. et al.** (2000): Role of galectin-3 as a receptor for advanced glycosylation end products. In: *Kidney International* 58 (77), S. 31–39.
- Pugliese, G.; Pricci, F.; Iacobini, C.; Leto, G.; Amadio, L.; Barsotti, P. et al.** (2001): Accelerated diabetic glomerulopathy in galectin-3/AGE receptor 3 knockout mice. In: *FASEB* 15, S. 2471–2479.
- Re, V. de; Caggiari, L.; Tabuso, M.; Cannizzaro, R.** (2013): The versatile role of gliadin peptides in celiac disease. In: *Clinical Biochemistry* 46 (6), S. 552–560.
- Rérat, A.; Calmes, R.; Vaissade, P.; Finot, P.-A.** (2002): Nutritional and metabolic consequences of the early Maillard reaction of heat treated milk in the pig. In: *European Journal of Nutrition* 41 (1), S. 1–11.
- Rimbach, G.; Möhring, J.; Erbersdobler, H. F.** (2010): *Lebensmittel-Warenkunde für Einsteiger*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Roggers, K.** (2011): *The components of Life: From nucleic acids to carbohydrates*. New York: Britannica Educational Publishing.
- Roncero-Ramos, I.; Delgado-Andrade, C.; Alonso-Olalla, R.; Navarro, M.** (2012): Influence of bread crust-derived Maillard reaction products on phosphorus balance in rats. In: *European Journal of Nutrition* 51 (7), S. 871–879.
- Roncero-Ramos, I.; Delgado-Andrade, C.; Tessier, F.; Niquet-Léridon, C.; Strauch, C.; Monnier, V.; Navarro, M.** (2013): Metabolic transit of N(ϵ)-carboxymethyl-lysine after consumption of AGEs from bread crust. In: *Food & function* 4 (7), S. 1032–1039.
- Roncero-Ramos, I.; Niquet-Léridon, C.; Strauch, C.; Monnier, V.; Tessier, F.; Navarro, M.; Delgado-Andrade, C.** (2014): An Advanced Glycation End Product (AGE)-Rich Diet Promotes N ϵ -Carboxymethyl-lysine Accumulation in the Cardiac Tissue and Tendons of Rats. In: *Journal of Agricultural and food chemistry* 62 (25), S. 6001–6006.
- Ruhs, S.; Nass, N.; Bartling, B.; Bromme, H.; Leuner, B.; Somoza, V. et al.** (2010): Preconditioning with Maillard reaction products improves antioxidant defence leading to increased stress tolerance in cardiac cells. In: *Experimental Gerontology* 45 (10), S. 752–762.
- Ruhs, S.; Nass, N.; Somoza, V.; Friess, U.; Schinzel, R.; Silber, R.; Simm, A.** (2007): Maillard reaction products enriched food extract reduce the expression of myofibroblast phenotype markers. In: *Molecular nutrition & food research* 51 (4), S. 488–495.
- Rutherford, S.; Torbatinejad, N.; Moughan, P.** (2006): Available (ileal digestible reactive) lysine in selected cereal-based food products. In: *Journal of Agricultural and food chemistry* 54 (25), S. 9453–9457.
- Sauer, T.; Raithel, M.; Kressel, J.; Münch, G.; Pischetsrieder, M.** (2012): Activation of the transcription factor Nrf2 in macrophages, Caco-2 cells and intact human gut tissue by Maillard reaction products and coffee. In: *Amino Acids* 44 (6), S. 1427–1439.
- Sauer, T.; Raithel, M.; Kressel, J.; Muscat, S.; Münch, G.; Pischetsrieder, M.** (2011): Nuclear translocation of NF- κ B in intact human gut tissue upon stimulation with coffee and roasting products. In: *Food & function* 2 (9), S. 529.
- Schieberle, P.; Grosch, W.** (1991): Potent odorants of the wheat bread crumb Differences to the crust and effect of a longer dough fermentation. In: *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 192, S. 130–135.

- Šebeková, K.; Hofmann, T.; BOOR, P.; ULICNÁ, O.; Erbersdobler, H.; Baynes, J. et al.** (2005): Renal Effects of Oral Maillard Reaction Product Load in the Form of Bread Crusts in Healthy and Subtotally Nephrectomized Rats. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1043 (1), S. 482–491.
- Seiquer, I.; Ruiz-Roca, B.; Mesías, M.; Muñoz-Hoyos, A.; Galdó, G.; Ochoa, J.; Navarro, M.** (2008): The antioxidant effect of a diet rich in Maillard reaction products is attenuated after consumption by healthy male adolescents. In vitro and in vivo comparative study. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88 (7), S. 1245–1252.
- Sell, D.** (1997): Ageing promotes the increase of early glycation Amadori product as assessed by ϵ -N-(2-furoylmethyl)-l-lysine (furosine) levels in rodent skin collagen. In: *Mechanisms of Ageing and Development* 95 (1-2), S. 81–99.
- Sena, C.; Matafome, P.; Crisóstomo, J.; Rodrigues, L.; Fernandes, R.; Pereira, P.; Seica, R.** (2012): Methylglyoxal promotes oxidative stress and endothelial dysfunction. In: *Pharmacological Research* 65 (5), S. 497–506.
- Serpen, A.; Gökmen, V.; Pellegrini, N.; Fogliano, V.** (2008): Direct measurement of the total antioxidant capacity of cereal products. In: *Journal of Cereal Science* 48 (3), S. 816–820.
- Shan, L.; Molberg, O.; Parrot, I.; Hausch, F.; Fiiz, F.; Gray, G. et al.** (2002): Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. In: *Science* 297, S. 2275–2279.
- Shewry, P.** (2007): Improving the Protein Content and Quality of Temperate Cereals: Wheat, Barley and Rye. In: *Journal of Cereal Science* 46, S. 239–250.
- Shewry, P.; Tatham, A.** (1990): The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. In: *Biochemical Journal* 267, S. 1–12.
- Silván, J.; Morales, F.; Saura-Calixto, F.** (2010): Conceptual study on maillardized dietary fiber in coffee. In: *Journal of Agricultural and food chemistry* 58 (23), S. 12244–12249.
- Simm, A.; Müller, B.; Nass, N.; Hofmann, B.; Bushnaq, H.; Silber, R.-E.; Bartling, B.** (2015): Protein glycation - Between tissue aging and protection. In: *Experimental Gerontology* 68, S. 71–75.
- Singh, S.; Gamlath, S.; Wakeling, L.** (2007): Nutritional aspects of food extrusion: a review. In: *International Journal of Food Science & Technology* 42 (8), S. 916–929.
- Somoza, V.; Lindenmeier, M.; Hofmann, T.; Frank, O.; Erbersdobler, H.; Baynes, J. et al.** (2005a): 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 subtotally nephrectomized rats. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1043, S. 492–500.
- Somoza, V.; Wenzel, E.; Lindenmeier, M.; Grothe, D.; Erbersdobler, H.; Hofmann, T.** (2005b): Influence of feeding malt, bread crust, and a pronylated protein on the activity of chemopreventive enzymes and antioxidative defense parameters in vivo. In: *Journal of Agricultural and food chemistry* 53 (21), S. 8176–8182.
- Sourris, K.; Forbes, J.** (2009): Interactions between advanced glycation end-products (AGE) and their receptors in the development and progression of diabetic nephropathy - are these receptors valid therapeutic targets. In: *Current Drug Targets* 10, S. 42–50.
- Stefano, D.; Maiuri, M.; Iovine, B.; Ialenti, A.; Bevilacqua, M.; Carnuccio, R.** (2006): The role of NF- κ B, IRF-1, and STAT-1 α transcription factors in the iNOS gene induction by gliadin and IFN- γ in RAW 264.7 macrophages. In: *Journal of Molecular Medicine* 84 (1), S. 65–74.
- Stitt, A.; He, C.; VLASSARA, H.** (1999): Characterization of the Advanced Glycation End-Product Receptor Complex in Human Vascular Endothelial Cells. In: *Biochem Biophys Res Commun* 256, S. 549–558.

- Sumi, D.; Ignarro, L.** (2004): Regulation of inducible nitric oxide synthase expression in advanced glycation end product-stimulated RAW 264.7 cells. In: *Diabetes* 53, S. 1841–1850.
- Summa, C.; Raposo, F.; McCourt, J.; Lo Scalzo, R.; Wagner, K.-H.; Elmadfa, I.; Anklam, E.** (2006): Effect of roasting on the radical scavenging activity of cocoa beans. In: *European Food Research and Technology* 222 (3-4), S. 368–375.
- Takátsy, A.; Böddi, K.; Nagy, L.; Nagy, G.; Szabó, S.; Markó, L. et al.** (2009): Enrichment of Amadori products derived from the nonenzymatic glycation of proteins using microscale boronate affinity chromatography. In: *Analytical biochemistry* 393 (1), S. 8–22.
- Tatham, A.; Shewry, P.** (2012): The S-poor prolamins of wheat, barley and rye: Revisited. In: *Journal of Cereal Science* 55 (2), S. 79–99.
- Therdthai, N.; Zhou, W.; Adamczak, T.** (2002): Optimisation of the temperature profile in bread baking. In: *Journal of Food Engineering* 55 (1), S. 41–48.
- Thornalley, P.** (2007): Dietary AGEs and ALEs and risk to human health by their interaction with the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) – an introduction. In: *Molecular Nutrition & Food Research* 51 (9), S. 1107–1110.
- Thornalley, P.; Langborg, A.; Minhas, H.** (1999): Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglycosone in the glycation of proteins by glucose. In: *Biochemical Journal* (344), S. 109–116.
- Tranquet, O.; Larré, C.; Denery-Papini, S.** (2012): Selection of a monoclonal antibody for detection of gliadins and glutenins: A step towards reliable gluten quantification. In: *Journal of Cereal Science* 56 (3), S. 760–763.
- Tuohy, K.; Hinton, D.; Davies, S.; Crabbe, M.; Gibson, G.; Ames, J.** (2006): Metabolism of Maillard reaction products by the human gut microbiota – implications for health. In: *Molecular Nutrition & Food Research* 50 (9), S. 847–857.
- Uribarri, J.; Cai, W.; Peppas, M.; Goodman, S.; Ferrucci, L.; Striker, G.; VLASSARA, H.** (2007): Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation endproducts: Two links to inflammatory response, oxidative stress and aging. In: *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 62 (4), S. 427–433.
- Uribarri, J.; Woodruff, S.; Goodman, S.; Cai, W.; Chen, X.; Pyzik, R. et al.** (2010): Advanced Glycation End Products in Foods and a Practical Guide to Their Reduction in the Diet. In: *Journal of the American Dietetic Association* 110 (6), S. 911–916.e12.
- Valencia, J.; Weldon, S.; Quinn, D.; Kiers, G.; DeGroot, J.; TeKoppele, J.; Hughes, T.** (2004): Advanced glycation end product ligands for the receptor for advanced glycation end products: biochemical characterization and formation kinetics. In: *Analytical biochemistry* 324 (1), S. 68–78.
- Vanin, F.; Lucas, T.; Trystram, G.** (2009): Crust formation and its role during bread baking. In: *Trends in Food Science & Technology* 20 (8), S. 333–343.
- Vlassara, H.** (2001): The AGE-receptor in the pathogenesis of diabetic complications. In: *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 17 (6), S. 436–443.
- Vlassara, H.** (2005): Advanced Glycation in Health and Disease: Role of the Modern Environment. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1043 (1), S. 452–460.
- Vlassara, H.; Li, Y.; Imani, F.; Wojciechowicz, D.; Yang, Z.; Liu, F.-T.; Cerami, A.** (1995): Identification of galectin-3 as a high-affinity binding protein for advanced glycation end products (AGE): a new member of the AGE-receptor complex. In: *Molecular Medicine* 1 (6), S. 634–646.
- Wang, H.-Y.; Qian, H.; Yao, W.-R.** (2011): Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. In: *Food Chemistry* 128 (3), S. 573–584.

- Wieser, H.** (2007): Chemistry of gluten proteins (2), zuletzt geprüft am 07.05.2013.
- Wong, B.; Day, L.; McNaughton, D.; Augustin, M.** (2009): The Effect of Maillard Conjugation of Deamidated Wheat Proteins with Low Molecular Weight Carbohydrates on the Secondary Structure of the Protein. In: *Food Biophysics* 4 (1), S. 1–12.
- Xie, Q.-W.; Whisnant, R.; Nathan, C.** (1993): Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. In: *J. Exp. Med.* 177, S. 1779–1784.
- Ye, C.-H.; Sturgis, L.; Haidacher, J.; Zhang, X.-N.; Sherwood, S.; Bjercke, R. et al.** (2001): Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor- κ B transcriptional activation and cytokine secretion. In: *Diabetes* 50, S. 1495–1504.
- Yu, L.; Beta, T.** (2015): Identification and Antioxidant Properties of Phenolic Compounds during Production of Bread from Purple Wheat Grains. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 20 (9), S. 15525–15549.
- Zhou, Y.; Lin, Q.; Jing, C.; Cheng, L.; Zheng, X.; Dai, M.; Zhang, Y.** (2015): Simultaneous analysis of N-(Carboxymethyl)lysine and N-(Carboxyethyl)lysine in foods by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry with derivatization by 9-fluorenylmethyl chloroformate. In: *Journal of Food Science* 80 (2), S. 207–217.
- Žilić, S.; Barać, M.; Pešić, M.; Dodig, D.; Ignjatović-Micić, D.** (2011): Characterization of Proteins from Grain of Different Bread and Durum Wheat Genotypes. In: *International Journal of Molecular Sciences* 12 (12), S. 5878–5894.
- Zill, H.; Bek, S.; Hofmann, T.; Huber, J.; Frank, O.; Lindenmeier, M. et al.** (2003): RAGE-mediated MAPK activation by food-derived AGE and non-AGE products. In: *Biochem Biophys Res Commun* 300 (2), S. 311–315.
- Zill, H.; Günther, R.; Erbersdobler, H.; Fölsch, U.; Faist, V.** (2001): RAGE Expression and AGE-Induced MAP Kinase Activation in Caco-2 Cells. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 288 (5), S. 1108–1111.

8 Anhang

8.1 Genspezifische Primersequenzen für die RT-PCR

Tabelle A12: Genspezifische Primersequenzen mit spezifischer Annealing-Temperatur (TA) und Zyklenzahl

Name	Genbank-Nummer	Spezie	5`-3`Sequenz	Fragment-größe (bp)	TA (°C)	Zyklen
MnSOD (SOD2)	NM_013671.3	M	se: CCG AGG AGA AGT ACC ACG AG	381	55	25
			as: GAA GGT AGT AAG CGT GCT CC			
NQO-1	NM_008706.5	M	se: GGT AGC GGC TCC ATG TAC TC	341	47	40
			as: ATG GAC TTG CCC AGG TGA TG			
GSTM1	NM_010358.5	M	se: GAG ATA CAC CAT GGG TGA CG	432	55	35
			as: AGG CAC TTG GGC TCA AAC			
Hmox1 (HO-1)	NM_010442.2	M	se: CAG GGT GAC AGA AGA GGC TAA	341	56	30
			as: CCT TAC AGA AGA GAA GGC CAC A			
Dost (AGE-R1)	NM_007838.2	M	se: TGT TCA AGG AGG AGG GTG TC	300	58	28
			as: AGC CTA GCC GGT TGT AAT CC			
Prkcsh (AGE-R2)	NM_008925.1	M	se: ACA GAC GAG TAC AAC AGC GGCA	536	61	30
			as: GCG GTA CTT GTC CCT GAT GGC			
Lgals3 (AGE-R3)	NM_010705.3	M	se: TGA TGT TGC CTT CCA CTT TAA	152	55	29
			as: CCA GGA CTT GTA TTT TGA ATG			
CD36	NM_001159558.1	M	se: ACA GAG GAT GAC AAC TTC ACA	361	55	30
			as: CTG TAC CAT TAA TCA TGT CG			
RAGE	NM_001271424.1	M	se: CTG AAC TCA CAG CCA GTG TCC C	297	55	43
			as: CCC TGA CTC GGA GTT GGA TAG			
18 S	M_10098	M	se: GTT GGT GGA GCG ATT TGT GTG G	346	60	12
			as: AGG GCA GGG ACT TAA TCA ACG C			

8.2 Nachweis von AGE-Modifikationen in AGE-BSA

In der vorliegenden Arbeit wurde BSA als Referenzprotein gewählt, welches mit verschiedenen Zuckern und MG/G modifiziert wurde (siehe 3.1.2). Zur Überprüfung der AGE-Modifikationen erfolgte eine Fluoreszenzmessung (Exc./Em. 330/405 nm und 360/440 nm).

Die Inkubation von BSA mit Glukose, MG/G und Ribose führte jeweils zu einer signifikanten Erhöhung der AGE-spezifischen Fluoreszenz und bestätigt damit das Vorhandensein von AGE-Modifikationen am Referenzprotein BSA (Abbildung 35).

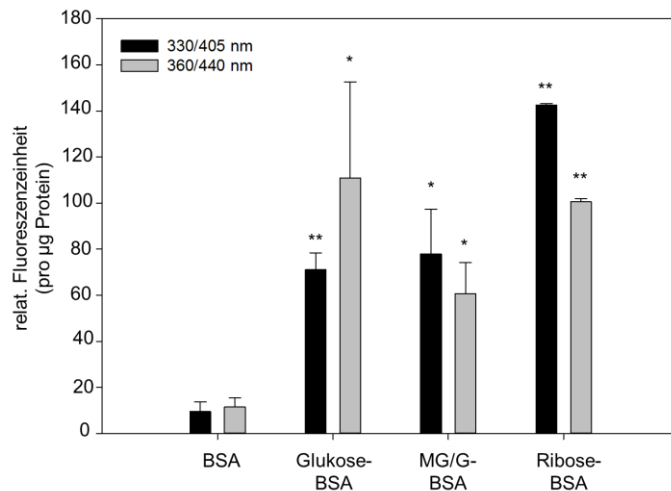


Abbildung 35: Fluoreszenzmessung von AGE-BSA

Darstellung der AGE-spezifischen Fluoreszenzen (Exc./Em. 330/405 nm und 360/440 nm) von BSA und AGE-BSA (MW \pm SEM, n=3). Die statistische Signifikanz bezieht sich auf BSA (* p<0,05 und ** p<0,001).

Zur weiteren Charakterisierung von AGE-BSA erfolgte die Immunodetektion mit spezifischen AGE-Antikörpern. Es konnte gezeigt werden, dass die Inkubation mit Glukose, MG/G und Ribose zu einer Bildung von CML-modifiziertem BSA führte (Abbildung 36). Glukose- und MG/G-BSA wiesen eine Arg-Pyrimidin-Modifikation auf.

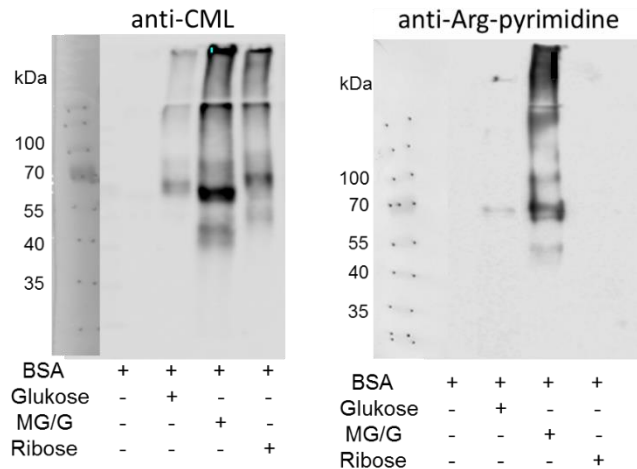


Abbildung 36: Nachweis von AGE-Modifikationen von AGE-BSA mittels Immunodetektion

Die Immunodetektion demonstriert den Nachweis von AGE-Modifikationen an Glukose-, MG/G- und Ribose-BSA verglichen zu BSA. Dargestellt sind repräsentative Western Blots.

8.3 Einfluss von AGE-BSA auf die NF- κ B-Aktivierung in RAW/NF- κ B/SEAPorterTM-Zellen

Über Stimulationsversuche konnte gezeigt werden, dass CML-modifiziertes Gliadin für den zellaktivierenden Effekt der Brotkruste verantwortlich ist. Da eine Modifizierung von Gliadin zu keiner ausreichenden Bildung von AGE-Modifikationen führte, wurde AGE-BSA verwendet, um den Einfluss der AGE-Modifikation der bioaktiven Komponente auf die protektive Wirkung der Brotkruste zu untersuchen.

Eine 24-stündige Stimulation der RAW/NF- κ B/SEAPorterTM-Zellen zeigte, dass BSA als auch AGE-BSA zu einer signifikanten Anreicherung von SEAP im Zellkulturüberstand führte (Abbildung 37). BSA induzierte die SEAP-Freisetzung konzentrationsabhängig. Die Steigerung der SEAP-Konzentration im Zellkulturmedium nach Stimulation der Zellen mit BSA unterschied sich nicht signifikant von der Stimulation mit AGE-BSA. Jedoch konnte das MG/G-BSA eine tendenziell höhere Freisetzung der SEAP-Konzentration hervorrufen.

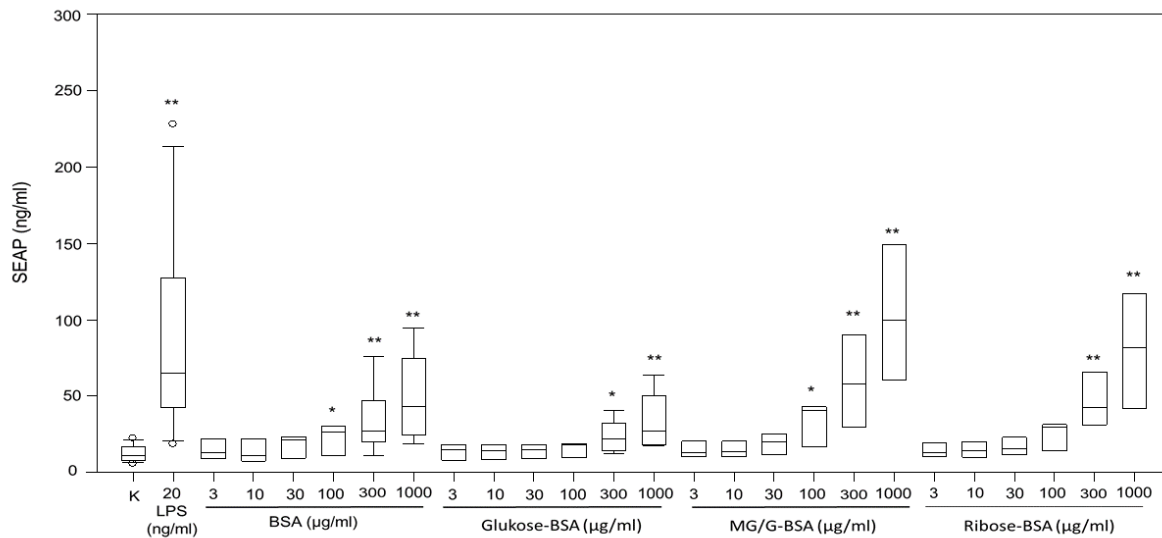


Abbildung 37: NF-κB-Aktivierung in RAW/NF-κB/SEAPorter™-Zellen nach Stimulation mit AGE-BSA

Unter serumreduzierten Bedingungen wurden RAW/NF-κB/SEAPorter™-Zellen für 24 h mit BSA und AGE-BSA stimuliert. Als Positiv-Kontrolle wurde 20 ng/ml LPS verwendet. Mit Hilfe des SEAPorter™-Assay Kits erfolgte die Messung der SEAP-Konzentration im Zellkulturüberstand als Maß für die Aktivierung des NF-κB-Signalweges (MW ± SEM, n=3, * p<0,05, ** p<0,001. Die statistische Signifikanz bezieht sich auf die unbehandelten Zellen (Kontrolle).

8.4 Einfluss von AGE-BSA auf die Phosphorylierung der ERK-2- und p38-MAPKinase

Um zu untersuchen, ob die AGE-Modifikation der Brotkruste für die Phosphorylierung der ERK-2- und p38-MAPKinase verantwortlich ist, wurden die RAW/NF-κB/SEAPorter™-Zellen mit AGE-BSA für 24 h stimuliert.

Es konnte gezeigt werden, dass BSA als auch Glukose-BSA zu einer signifikanten Induktion der Phosphorylierung der ERK-2- und p38-MAPKinase führte (Abbildung 38). Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte zwischen BSA und Glukose-BSA nicht nachgewiesen werden. Die Stimulation der RAW/NF-κB/SEAPorter™ Zellen mit MG/G-BSA zeigten jedoch eine tendenziell höhere Phosphorylierungsrate der ERK-2-MAPKinase. Bezüglich der Phosphorylierung der p38-MAPKinase ergab sich ein ähnliches Bild. BSA als auch Glukose-BSA führten zu einer signifikant gesteigerten Phosphorylierung der p38-MAPKinase. Dabei zeigte die Stimulation der Zellen mit 1000 µg/ml BSA eine sechs-fach gesteigerte Phosphorylierung der p38-MAPKinase als MG/G-BSA.

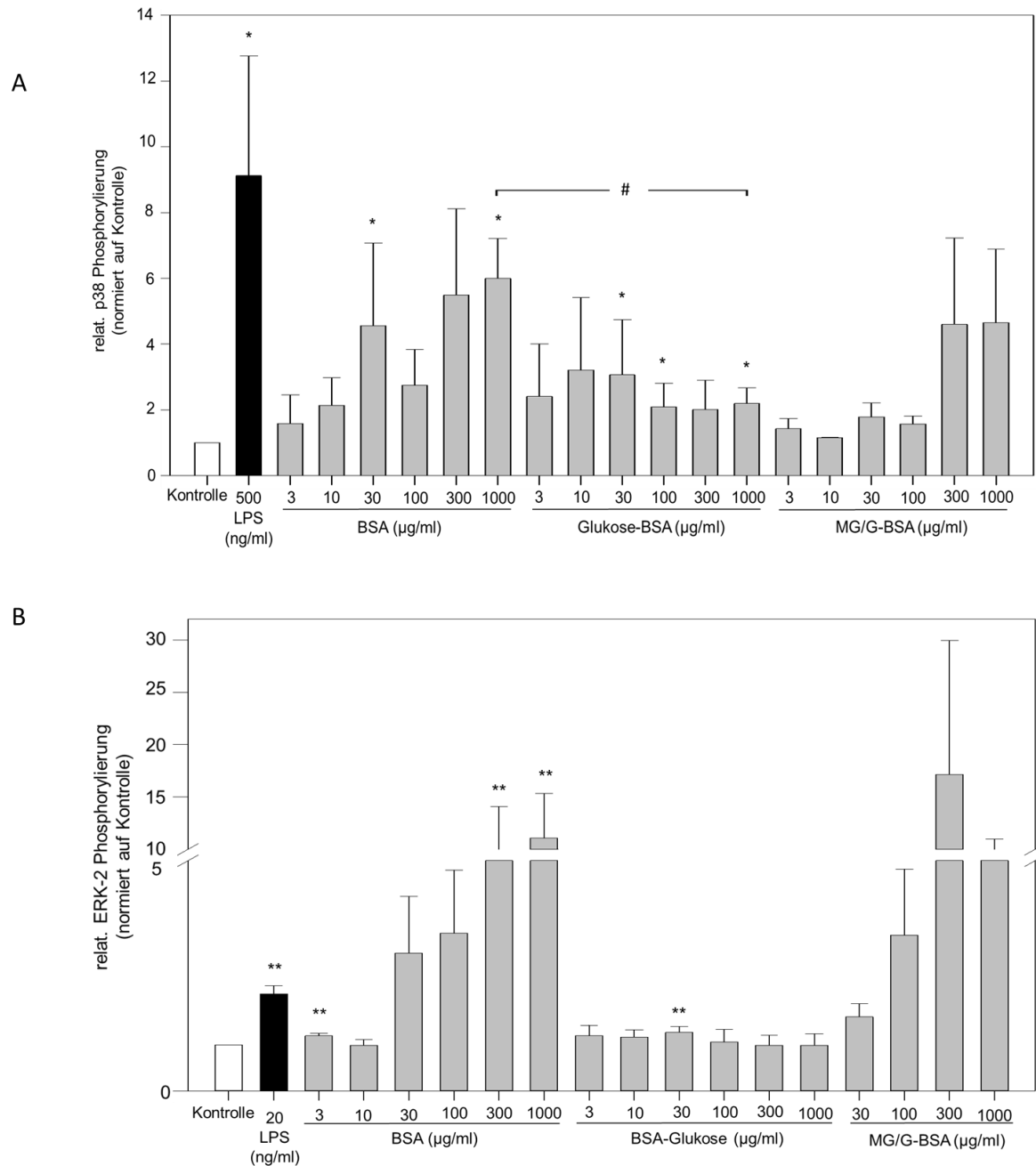


Abbildung 38: Einfluss von AGE-BSA auf die Phosphorylierung der ERK-2 und p38-MAPKinasen

Unter serumreduzierten Bedingungen wurden RAW/NF- κ B/SEAPorter™-Zellen für 10 min mit BSA und AGE-BSA stimuliert. Als Positivkontrolle diente 20 ng/ml LPS und 500 ng/ml LPS. Die Bestimmung der veränderten Kinasen-Aktivität erfolgte durch phospho-/aktivierungsspezifische Antikörper mittels Western Blot Analyse, wobei die unbehandelten Zellen (Kontrolle) auf 1 normiert wurden (MW \pm SEM, n=3, * p<0,05).

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn **Professor Dr. Andreas Simm**, unter dessen Anleitung ich die Doktorarbeit durchgeführt habe, möchte ich für die Überlassung dieses interessanten und ausfüllenden Themas und die fachliche Betreuung danken.

Herrn **Professor Dr. Rolf-Edgar Silber** danke ich für die finanzielle Unterstützung während meiner Doktorandenzeit.

Bei Frau **Professor Dr. Veronika Somoza** möchte ich mich für die Bereitstellung des Nahrungsmittlextraktes Brotkruste bedanken.

Ein besonderer Dank geht an Herrn **Dr. Alexander Navarrete Santos**. Für seine kompetente wissenschaftliche Betreuung und für die stete Anteilnahme an fachlichen wie auch privaten Freuden und Sorgen möchte ich ihm ganz besonders danken.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Arbeitskollegen **Kathleen Jacobs, Bettina Weber, Karolin Szymala, Dr. Paulina Rolewska, Nicole Glaubitz** und **Carolin Richter** aus der Herz-Thorax-Chirurgie für die entspannten Mittagspausen und die überaus tolle Arbeitsatmosphäre bedanken. Ihr standet mir immer mit Rat und Tat zur Seite.

Besonders danken möchte ich an dieser Stelle auch Frau **Dr. Elisa Haucke** für ihr stetes Interesse an der Arbeit und den vielen Diskussionen und Hilfestellungen während unseren Weinabenden. Für ihr kritisches Korrekturlesen dieser Dissertation und die konstruktive Kritik bin ich ihr überaus dankbar.

Für die tollen Kooperationen, die im Rahmen dieser Arbeit entstanden sind, danke ich auch ganz herzlich **Bénédicte Bakan, Michèle Dalgalarondo, Didier Marion, Chantal Houée-Levin, Dr. Mareen Smuda** und **Prof. Marcus A. Glomb**.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, meinem Bruder, sowie meinem Freund. Ihr habt mich während der gesamten Promotionszeit begleitet, unterstützt und meine Arbeit stets mit Interesse verfolgt.

Vielen Dank!

Eidesstattliche Erklärung / Declaration under Oath

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

I declare under penalty of perjury that this thesis is my own work entirely and has been written without any help from other people. I used only the sources mentioned and included all the citations correctly both in word or content.

Datum/ Date

Unterschrift des Antragstellers / *Signature of the applicant*

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Geburtsdatum	28. Februar 1985
Geburtsort	Lutherstadt Wittenberg
Anschrift	Otto-Siege Str. 19 22926 Ahrensburg
Familienstand	verheiratet

Akademische Ausbildung

- | | |
|-------------------|--|
| 03.2011 – 04.2014 | Promotionsstudium der Ernährungswissenschaft
Martin-Luther Universität Halle/Saale
Forschungsbereich: Herz- und Thoraxchirurgie des
Universitätsklinikum Halle/Saale <ul style="list-style-type: none">• Thema der Dissertation: <i>„Identifizierung einer bioaktiven Komponente in der Brotkruste“</i> |
| 04.2008 – 03.2010 | Masterstudium der Ökotoxikologie
Christian – Albrechts – Universität zu Kiel <ul style="list-style-type: none">• Schwerpunkt: Ernährungswissenschaften• Thema der Masterarbeit: <i>„Effect of sulforaphane, allyl-isothiocyanate and 3,3 diindolyl- methane on UV induced photoaging in mouse fibroblasts in culture“</i> |
| 09.2007 – 02.2008 | Auslandsstudium
University of Life Science, Wageningen, Niederlande <ul style="list-style-type: none">• Schwerpunkt Food Science |
| 10.2004 – 08.2007 | Bachelorstudium der Ökotoxikologie
Christian - Albrechts – Universität zu Kiel <ul style="list-style-type: none">• Schwerpunkt: Ernährungswissenschaften• Thema der Bachelorarbeit: <i>„Die Bedeutung der beta Sekretase in der Pathogenese des Morbus Alzheimer“</i> |
| 08.1995 - 03.2004 | Heidegymnasium Pretzsch <ul style="list-style-type: none">• Abschluss: Allgemeine Hochschulreife |

Berufliche Erfahrung

- Seit 05.2015 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter**
LEFO-Institut für Lebensmittel und Umwelt GmbH,
Ahrensburg
- Aufgaben: lebensmittelrechtliche Beratung, Forschung und Entwicklung im Bereich Allergennachweis
- 04.2014 – 02.2015 **Wissenschaftliche Hilfskraft**
Medizinische Fakultät der Martin-Luther Universität
Halle(Saale)
- Aufgaben: Pflege der Versuchstiere (Umsetzen und Fütterung der Tiere), Organisation der Spülküche
- 10.2012 – 12.2012 **COST Forschungsaufenthalt, Frankreich**
Universität Süd, Paris und
Nationales Institut für Agronomieforschung (INRA), Nantes
- Schwerpunkt: Massenspektrometrie, FTIR, Chromatographie
- 06.2009 – 09.2011 **Werkstudent**
Paul Heyck Radbruch Nachfolger, Kiel
- Aufgaben: Verkauf, Unterstützung der betriebswirtschaftlichen Abläufe, Einarbeitung von Mitarbeitern, Mitarbeit bei der Kaffeeröstung und Aromatisierung von Kaffee und Tee,
- 08.2006 – 09.2006 **Praktikum**
Wellfigura, Hamburg
- Aufgaben: Vorbereitung und Durchführung von Ernährungsberatungen, Empfang, Durchführung, betriebswirtschaftlicher Abläufe
- 08.2005 – 09.2005 **Praktikum**
Reha-Zentrum Bad Düben
- Aufgaben: Ernährungsberatung, Vorbereitung verschiedener Kostformen, Vorbereitung und Durchführung von Kochstunden

Ahrensburg, 12.02.2017

Publikationsverzeichnis

Manuskripte:

Pöttsch, S.; Blankenhorn, A.; Navarrete Santos, A.; Silber, R. E.; Somoza, V.; Simm A. (2013): The effect of an AGE-rich dietary extract on the activation of NF- κ B depends on the cell model used; *Food Function*, **4**, S. 1023-1031

Vorträge:

Pöttsch, S.; Dalgalarrrondo, M.; Bakan, B.; Marion, D.; Somoza, V.; Stangl, G.; Silber, R. E.; Simm, A.; Navarrete Santos, A.: Identification of gliadin as an advanced glycation end product-modified compound in bread crust extract and the effect on mouse macrophage activation. 2. *Doktorandenkongress der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 13th – 14th December 2013, Halle (Saale), Germany.*

Pöttsch, S.; Dalgalarrrondo, M.; Bakan, B.; Marion, D.; Somoza, V.; Silber, R. E.; Simm, A.; Navarrete Santos, A.: Identification of gliadin as an advanced glycation end product-modified compound in bread crust extract and their effect on mouse macrophage activation. *SFRR-Europe Conference: Free radicals: insights in signaling and adaptative homeostasis. 5th – 7th September 2014, Paris, France*

Pöttsch, S.; Dalgalarrrondo, M.; Bakan, B.; Marion, D.; Somoza, V.; Silber, R. E.; Simm, A.; Navarrete Santos, A.: Identification of gliadin as an advanced glycation end product-modified compound in bread crust extract. *Stress and Ageing: from Molecular Biology to Clinical Perspectives – 10 years ageing meeting in Halle, 6th – 8th September 2013, Halle (Saale), Germany.*

Posterpräsentationen:

Pöttsch, S.; Dalgalarrrondo, M.; Bakan, B.; Marion, D.; Somoza, V.; Stangl, G.; Silber, R. E.; Simm, A.; Navarrete Santos, A.: Identification of gliadin as an advanced glycation end product-modified compound in bread crust extract and the effect on mouse macrophage activation. 51. *Wissenschaftlicher Kongress der DGE: Ernährung in der Informationsgesellschaft, 12th – 14th March 2014, Paderborn, Germany*

Pöttsch, S.; Dalgalarrrondo, M.; Bakan, B.; Marion, D.; Somoza, V.; Silber, R. E.; Simm, A.; Navarrete Santos, A.: Identification of gliadin as an advanced glycation end product-modified compound in bread crust extract and their effect on mouse macrophage activation. *SFRR-Europe Conference: The new era of -omics in Free Radicals in Biology and Medicine, 23rd – 25th September 2013, Athens, Greece*

Pöttsch, S.; Dalgalarrrondo, M.; Bakan, B.; Marion, D.; Somoza, V.; Silber, R. E.; Simm, A.; Navarrete Santos, A.: Identification of gliadin as an advanced glycation end product-modified compound in bread crust extract. *Stress and Ageing: from Molecular Biology to Clinical*

Perspectives – 10 years ageing meeting in Halle, 6th – 8th September 2013, Halle (Saale), Germany.

Pöttsch, S.; Dalgalarrrondo, M.; Bakan, B.; Marion, D.; Somoza, V.; Silber, R. E.; Simm, A.; Navarrete Santos, A.: Identification of gliadin as an advanced glycation end product-modified compound in bread crust extract. *25. Bilaterales Symposium: Perspektiven und Herausforderungen der Medizin, 13th – 15th September 2013, Poznan, Poland*

Pöttsch, S.; Blankenhorn, A.; Navarrete Santos, A.; Nass, N.; Somoza, V.; Silber, R. E.; Simm, A.: Identification of active advanced glycation endproducts in bread crust extract. *11th International Symposium on the Maillard Reaction at the ENSAIA School, 16th – 20th September 2012, Nancy, France*

Pöttsch, S.; Blankenhorn, A.; Navarrete Santos, A.; Nass, N.; Somoza, V.; Silber, R. E.; Simm, A.: Identification of active advanced glycation endproducts in bread crust extract. *Mark-age Summer School – Biomarkers of ageing, Neurobiology and Neuroendocrinology of ageing, 29th July – 3th August 2012, Bregenz, Austria*

Pöttsch, S.; Blankenhorn, A.; Somoza, V.; Silber, R. E.; Simm, A.: Identification of active advanced glycation endproducts in bread crust extract. *Symposium: Prevention and Intervention: From Molecular Biology to Clinical Perspectives, 16th – 18th September 2011, Halle/Saale, Germany*

Besondere Auszeichnung:

SFRR-Europe Conference: The new era of -omics in Free Radicals in Biology and Medicine, 23rd – 25th September 2013, Athens, Greece

Auszeichnung: **Young Investigator Award 2013**