



universität
wien

MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

„Einfluss von N^ε-Carboxymethyllysine auf die
Genregulation von SH-SY5Y Zellen“

verfasst von

Ann-Katrin Holik BSc (Hons)

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 066 863

Studienrichtung lt. Studienblatt: Masterstudium Biologische Chemie

Betreut von: Univ.-Prof. Mag. Dr. Veronika Somoza

Danksagung

Der praktische Teil dieser Masterarbeit wurde zwischen Juli 2011 und Juli 2012 am Institut für Ernährungsphysiologie und Physiologische Chemie, geleitet von Frau Univ.-Prof. Mag. Dr. Veronika Somoza, durchgeführt.

Ich möchte mich bei Frau Univ.-Prof. Mag. Dr. Veronika Somoza für die Bereitstellung des spannenden Themas sowie die Betreuung und wertvollen Ratschläge während dieser sehr lehrreichen Zeit bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Barbara Rohm bedanken. Danke, dass ich bei allen Fragen zu dir kommen konnte und du dir immer soviel Zeit für mich genommen hast. Durch deine tolle Betreuung konnte ich nicht nur sehr viel lernen, sondern hatte auch eine sehr schöne und lustige Masterarbeitszeit.

Weiterhin möchte ich Dr. Mark Somoza für die Einschulung in die Microarray-Methodik danken. Vielen Dank für die Möglichkeit in Ihrem Labor arbeiten zu können und für Ihre Hilfe bei den Microarrays.

Außerdem möchte ich allen meinen Kollegen in der Arbeitsgruppe für die schöne Zeit und die gute Zusammenarbeit danken. Danke, dass ihr euch immer für mich Zeit genommen habt. Ich freue mich auch weiterhin mit euch zusammenarbeiten zu können!

Abschließend ein großes "Dankeschön" an meine Familie und Freunde, die mich während meines Studiums und meiner Masterarbeit immer unterstützt haben. Danke, dass ich immer auf euch zählen kann und ihr immer für mich da seid.

Inhaltsverzeichnis

1. Theoretischer Hintergrund	1
1.1 Ablauf der Maillard-Reaktion	1
1.2 Maillard-Reaktionsprodukte und ihre biologische Relevanz	6
1.3 Regulation der Sättigung und Energiehomöostase	13
1.3.1 Serotonin	16
1.3.2 Vorkommen und Funktion	16
1.3.3 Serotonin in der Regulation von Nahrungsaufnahme und Sättigung	20
2. Problemstellung	23
3. Material und Methoden	24
3.1 Materialien	24
3.1.1 Geräte	24
3.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	24
3.2 Zellkultur	27
3.2.1 Auftauen von kryopreservierten Zellen	27
3.2.2 Kultivierung von SH-SY5Y Zellen	27
3.3 Methoden	28
3.3.1 Toxizitätstest mittels MTT-Assay	28
3.3.2 Genomweites Screening der Genregulation mittels DNA-Microarray	29
3.3.3 Untersuchung der Expression ausgewählter Gene mittels qRT-PCR	35
3.3.4 Messung der Serotonin-Ausschüttung mittels Serotonin-sensitivem ELISA	39
3.3.5 Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Mobilisierung	41
3.3.6 Statistische Auswertung der Experimente	41
4. Ergebnisse und Diskussion	44
4.1 Zytotoxizitätsbestimmung mittels MTT	44
4.2 DNA-Microarrays zur Ermittlung des Einflusses von CML auf die Genregulation	45
4.2.1 Bestimmung der RNA-Qualität	45
4.2.2 DNA-Microarray Analyse und Pathway-Analyse	46
4.3 Einfluss von CML auf Genexpression von HTR2A, HTR1A und HTR1B	53
4.4 Einfluss von CML auf die Serotonin-Ausschüttung	55

4.5	Einfluss von CML auf die intrazelluläre Calcium-Mobilisierung	57
4.6	Einfluss von CML auf die Genexpression von RAGE	59
4.7	Einfluss des Ca^{2+} -Signalweg Inhibitors Neomycin auf die Genexpression	60
5.	Schlussbetrachtung	63
6.	Zusammenfassung	66
7.	Abstract	68
8.	Referenzen.....	70
9.	Anhang	A-1

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Zusammenfassung der drei Stadien der Maillard-Reaktion	2
Abbildung 2 Erster Schritt der Maillard-Reaktion.....	3
Abbildung 3 Zweiter Schritt der Maillard-Reaktion	4
Abbildung 4 Letzter Schritt der Maillard-Reaktion	6
Abbildung 5 Chemische Struktur von N ^ε -Carboxymethyllysine.....	7
Abbildung 6 Von Kasper und Schieberle postulierter Mechanismus der CML-Bildung...	9
Abbildung 7 Von Hayase postulierter Mechanismus der CML-Bildung	11
Abbildung 8 Schematische Darstellung in die Regulation der Sättigung involvierter Systeme	14
Abbildung 9 Schematische Darstellung der Biosynthese von Serotonin	18
Abbildung 10 Schematische Darstellung der 7 Serotonin-Rezeptorklassen und ihrer intrazellulären Effektoren.....	19
Abbildung 11 Postulierter Feedback-Mechanismus in der Kontrolle der Größe der konsumierten Mahlzeit für kohlenhydratreiche Mahlzeiten.....	20
Abbildung 12 Umsetzung des MTT-Reagenzes durch Dehydrogenasen zu unlöslichem Formazan	29
Abbildung 13 Schematische Darstellung der chemischen Vorgänge bei der Microarray-Synthese	30
Abbildung 14 Schematische Darstellung der Schritte einer PCR.	38
Abbildung 15 Schematische Darstellung des verwendeten ELISA.....	40
Abbildung 16 Graphische Darstellung der MTT-Ergebnisse	44
Abbildung 17 Auftrennung der isolierten RNA im Agarose-Gel	44
Abbildung 18 Scatterplot der log2 Fluoreszenzintensitäten nach Inkubation von SH-SY5Y Zellen (P11-P12 A; P18-P19 B) mit 50 µM CML für 3 h.....	47
Abbildung 19 Scatterplots für 50 µM und 500 µM CML.....	48
Abbildung 20 Heatmap einer Selektion an Genen	49

Abbildung 21 Durch Panther erstellte Aufteilung der durch CML differentiell exprimierten Probes auf verschiedene molekulare Funktionen.....	50
Abbildung 22 Auszug aus den von DAVID erstellten Annotation Clusters für die 413 einggegebenen durch Inkubation mit 500 µM CML für 3 h differentiell regulierten Microarray-Probes	52
Abbildung 23 Graphische Repräsentation der 19 Microarray-Probes für HTR2A nach Inkubation mit 500 µM CML für 3 h.....	53
Abbildung 24 Serotonin-Rezeptor Expression nach Inkubation mit 500 µM CML für 0,25 – 6 h	55
Abbildung 25 Serotonin-Ausschüttung nach fünfminütiger Stimulierung mit unterschiedlichen CML-Konzentrationen (0,05 – 500 µM).....	56
Abbildung 26 Intrazelluläre Ca ²⁺ -Mobilisierung nach Stimulierung mit unterschiedlichen Konzentrationen an CML (0,05 – 500 µM)	58
Abbildung 27 RAGE-Expression nach Behandlung mit 500 µM CML für 0,25 – 48 h	60
Abbildung 28 Expression von <i>RAGE</i> , <i>HTR2A</i> , <i>HTR1A</i> und <i>HTR1B</i> nach 15 min Inkubation mit CML, Neomycin oder Kombination beider	61
Abbildung 29 Microarray-Chips 306, 307, 313 und 314 für die Inkubation mit 50 µM CML (n=2) und Kontrolle (n=2)	A-2
Abbildung 30 Microarray-Chips 323, 324, 325 und 326 für die Inkubation mit 50 µM CML (n=2) und Kontrolle (n=2)	A-3
Abbildung 31 Microarray-Chips 328, 329, 330 und 331 für die Inkubation mit 50 µM CML (n=2) und Kontrolle (n=2)	A-4
Abbildung 32 Microarray-Chips 342, 343, 344 und 345 für die Inkubation mit 500 µM CML (n=2) und Kontrolle (n=2)	A-5
Abbildung 33 Microarray-Chips 350 und 351 für die Inkubation mit 500 µM CML (n=1) und Kontrolle (n=1).....	A-6
Abbildung 34 Agarose-Gel zur Kontrolle der RNA-Qualität.....	A-7

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Zusammenfassung der CML-Gehalte einiger Lebensmittel	7
Tabelle 2 Sequenzen der verwendeten Primer und Länge des jeweiligen Amplikons ..	27
Tabelle 3 Ansatz für die reverse Transkription laut Angaben des Herstellers	34
Tabelle 4 Reaktionsansatz für die Microarray-Hybridisierung	34
Tabelle 5 Zu pipettierende Volumina der verschiedenen Reaktionskomponenten für die reverse Transkription	37
Tabelle 6 Zusammensetzung des Master Mix und Konzentration der eingesetzten Primer	39
Tabelle 7 Rohdaten der DNA-Konzentrationsbestimmung für den Serotonin-ELISA P16 und P15	A-7
Tabelle 8 Zusammenfassung der DNA-Konzentrationsbestimmung für den Serotonin-ELISA P13	A-9
Tabelle 9 Zusammenfassung der DNA-Konzentrationsbestimmung für den Serotonin-ELISA P19	A-10
Tabelle 10 Rohwerte des Serotonin-ELISA nach dem Ausreißertest	A-11
Tabelle 11 Rohdaten der Calcium-Mobilisierung nach dem Ausreißertest	A-12
Tabelle 12 Rohdaten der qRT-PCR-Versuchs mit dem Calciumblocker Neomycin	A-13
Tabelle 13 Rohdaten der qRT-PCR für das Gen HTR2A	A-14
Tabelle 14 Rohdaten des qRT-Versuchs für das Gen HTR1A	A-15
Tabelle 15 Rohdaten des qRT-PCR Versuchs für das Gen HTR1B	A-16

Abkürzungsverzeichnis

5-HT	Serotonin
8-OH-DPAT	7-(Dipropylamino)-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-1-ol
AGE	Advanced Glycation Endproduct
AgRP	Agouti-related protein
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CamK	Calmodulin-abhängige Kinase
CCK	Cholecystokinin
cdNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CML	N ^ε -Carboxymethyllysin
DCC	Dopa-Decarboxylase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EC	Enterochromaffine Zellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FBS	Fetales Kälberserum
FWB	Finaler Waschpuffer
HBSS	Hank's balancierte Salzlösung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HTR	Abkürzung des für Serotonin-Rezeptoren codierenden Gens
IP ₃	Inositol-Triphosphat
Kont	Kontrolle
LDL	Lipoprotein niederer Dichte
MAO-A	Monoaminoxidase-A
MC4	Melanocortinrezeptor 4
MS	Massenspektrometer

msh	Melanozyten-stimulierendes Hormon
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NPY	Neuropeptid Y
NSWB	Nicht stringenter Waschpuffer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
POMC	Proopiomelanocortin
PS	Polystyrol
QC	Qualitätskontrolle
qRT-PCR	Quantitative Real Time Polymerase-Kettenreaktion
RAGE	Rezeptor für Advanced Glycation Endproducts
RMA	Robust multiarray analysis
RNA	Ribonukleinsäure
SERT	Serotonintransporter
SOD	Superoxiddismutase
SWB	Stringenter Waschpuffer
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TPH	Tryptophan-Hydrolase
UV	Ultraviolett
VGCC	spannungsgesteuerter Calcium-Ionenkanal

1. Theoretischer Hintergrund

1.1 Ablauf der Maillard-Reaktion

Die Hitzebehandlung von Lebensmitteln resultiert in der Bildung von Aromastoffen, die das Lebensmittel geschmacklich verbessern [1, 2]. Einige dieser Verbindungen werden in Folge der Maillard-Reaktion, benannt nach dem französischen Naturwissenschaftler Louis Camille Maillard, gebildet. Die Maillard-Reaktion stellt eine nicht-enzymatische Bräunungsreaktion dar, bei der Aminogruppen, zum Beispiel die ϵ -NH₂-Gruppe der Aminosäure Lysin, unter Hitzeeinwirkung mit reduzierenden Verbindungen, beispielsweise Glukose, chemisch reagieren. Im Gegensatz zu den meisten Namensreaktionen in der organischen Chemie umfasst die Maillard-Reaktion eine Vielzahl an chemischen Reaktionen. John Hodge hat die Maillard-Reaktion 1953 in drei Phasen unterteilt [3]:

- die Anfangsphase, in der sich Amadori-Produkte bilden,
- die Zwischenphase, die die Bildung von Maillard-Reaktionsprodukten wie Hydroxymethylfurfural oder Pyrazinen mit sich bringt
- und die Endphase, in der Melanoidine gebildet werden.

Abbildung 1 zeigt eine Zusammenfassung der chemischen Reaktionen, die mit der jeweiligen Phase assoziiert werden und die physikochemikalischen Eigenschaften der gebildeten Produkte.

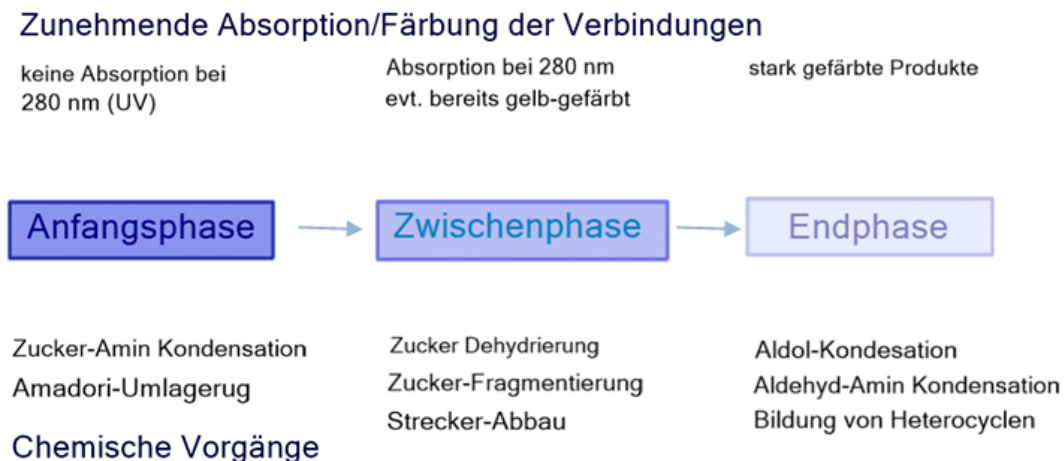


Abbildung 1 Zusammenfassung der drei Stadien der Maillard-Reaktion und assoziierte chemische Vorgänge [4].

Der erste Reaktionsschritt der Maillard-Reaktion ist die Kondensation von Amino-Gruppe und reduzierendem Zucker [4]. Das freie Elektronenpaar des Stickstoffs der Aminogruppe wirkt dabei als Nukleophil und greift den elektrophilen Kohlenstoff der Carboxylgruppe des Zuckers an. Der im tetraedischen Zwischenzustand negative geladene Sauerstoff wird protoniert und es kommt unter Wasserabspaltung zur Bildung einer Schiff'schen Base, die sich unter Bildung eines Glykosylamins umlagert [4]. Abbildung 2 zeigt die entsprechenden Reaktionsgleichungen dieser reversiblen Reaktionsschritte. Glykosylamine, die durch Reaktion mit heterozyklischen oder aromatischen Aminen erhalten werden, zeigen eine relative hohe Stabilität während Glykosylamine aus aliphatischen Aminen oder Aminosäuren schnell weiterreagieren bzw. sich umlagern und nur in vernachlässigbaren Mengen in Reaktionsmischungen vorzufinden sind [5]. In biologischen Proben sind häufig heterozyklische Amine wie die Purinbasen oder Verbindungen, die diese enthalten, beispielsweise Adenosintriphosphat, anzutreffen [5]. Weiters können auch Proteine als Stickstoffquelle in die Reaktion eintreten. Insulin, ein wichtiges in den β -Zellen der

Bauchspeicheldrüse gebildetes Hormon, reagiert bereits bei Raumtemperatur mit Glukose [4].

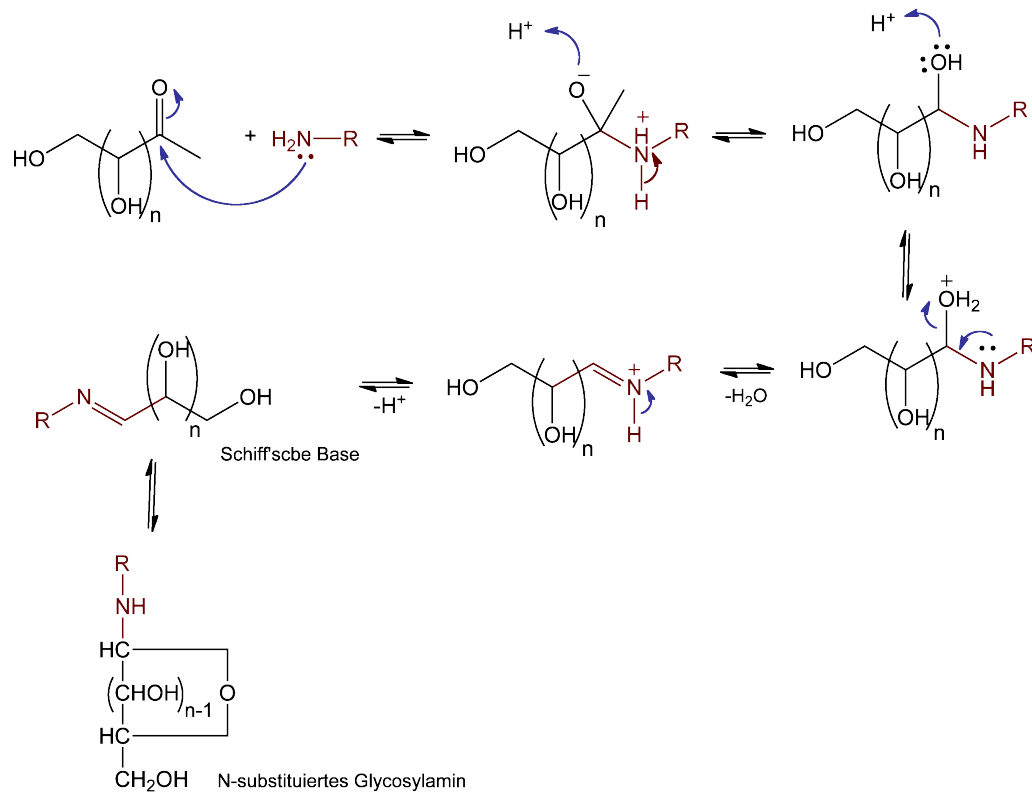


Abbildung 2 Erster Schritt der Maillard-Reaktion. Schematische Darstellung des möglichen Mechanismus zur Bildung eines Glycosylamins. Modifiziert nach [4].

Im nächsten Schritt der Maillard-Reaktion lagert sich das zuvor entstandene Glycosylamin um. Dieser Reaktionsschritt verläuft säurekatalysiert [4]. Die Reaktion von protonierter Schiff'scher Base zu N-substituierter 1-Amino-2-deoxy-2-ketose ist irreversibel und findet bereits bei 25°C spontan statt [4]. Das Keto-Amadori-Produkt steht im Gleichgewicht mit der Enol-Form [4]. Abbildung 3 zeigt die Reaktionsschritte von Glycosylamin zu Amadori-Produkt. Die dargestellte Umlagerung ist nicht möglich, wenn die Hydroxy-Gruppe an C-2 sterisch blockiert ist [4]. Versuche von Hodge und Rist zur Umlagerung N-substituierter Glykosylamine haben gezeigt, dass kristalline N-substituierte Verbindungen, deren C-2 Hydroxy-Gruppe nicht substituiert ist, bei der Lagerung langsam zu dunklen, braunen teerartigen Massen umgesetzt werden [6, 7].

Aus den teerartigen Mischungen konnten Amadori-Produkte in 30-50% Ausbeute isoliert werden. In weiterer Folge wurde gezeigt, dass, sobald die C-2 Hydroxy-Gruppe substituiert vorlag, wie beispielsweise in 2-O-Methyl-D-Glykosylpiperidin, die Verbindung bei zweijähriger Lagerung bei 25°C stabil und kristallin bleibt. Ähnlich kann 2-Deoxyglukose keine Amadori-Produkte bilden, da die Verbindung nicht über eine C-2 Hydroxy-Gruppe verfügt [8, 9].

Amadori-Produkte können in einer Vielzahl an Lebensmitteln nachgewiesen werden. Beispielsweise, wurden Amadori-Produkte in sterilisierter Milch, dehydratisierten Karotten, gefriergetrockneten Aprikosen, Sojasauce und Tee detektiert [4].

Ähnlich zur Amadori-Umlagerung werden Ketosen in der Heyns-Umlagerung zu 2-Amino-2-deoxyaldosen umgesetzt [4].

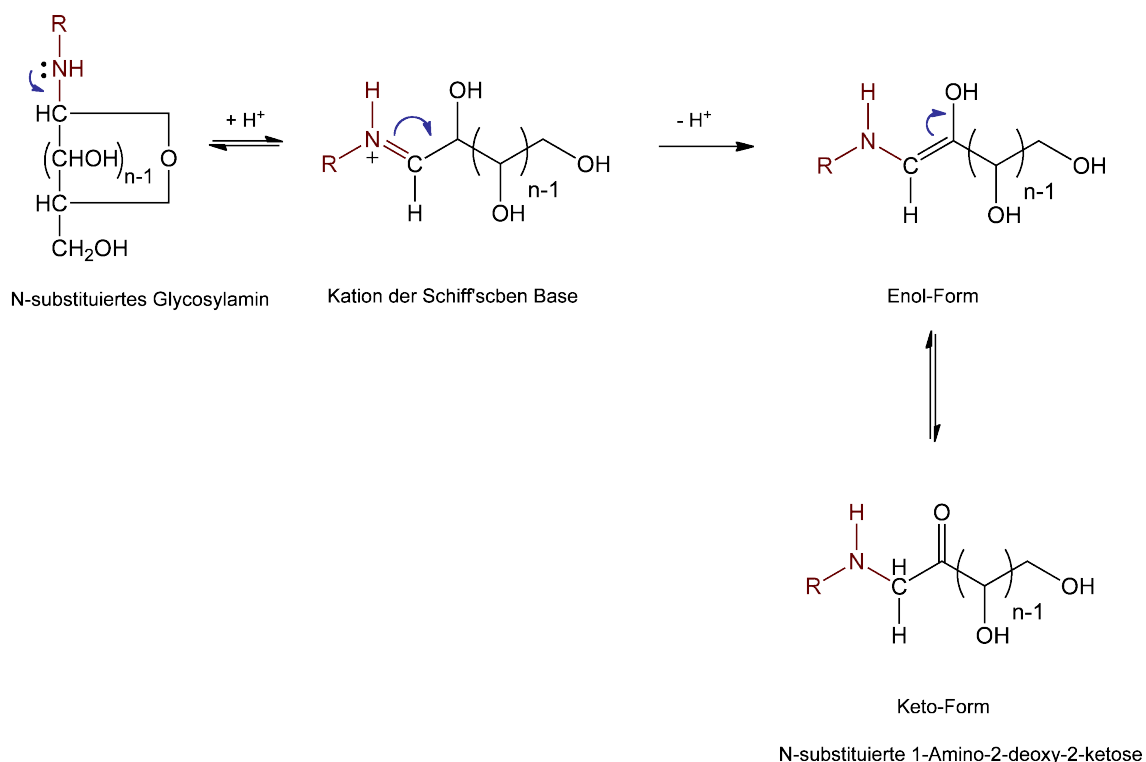
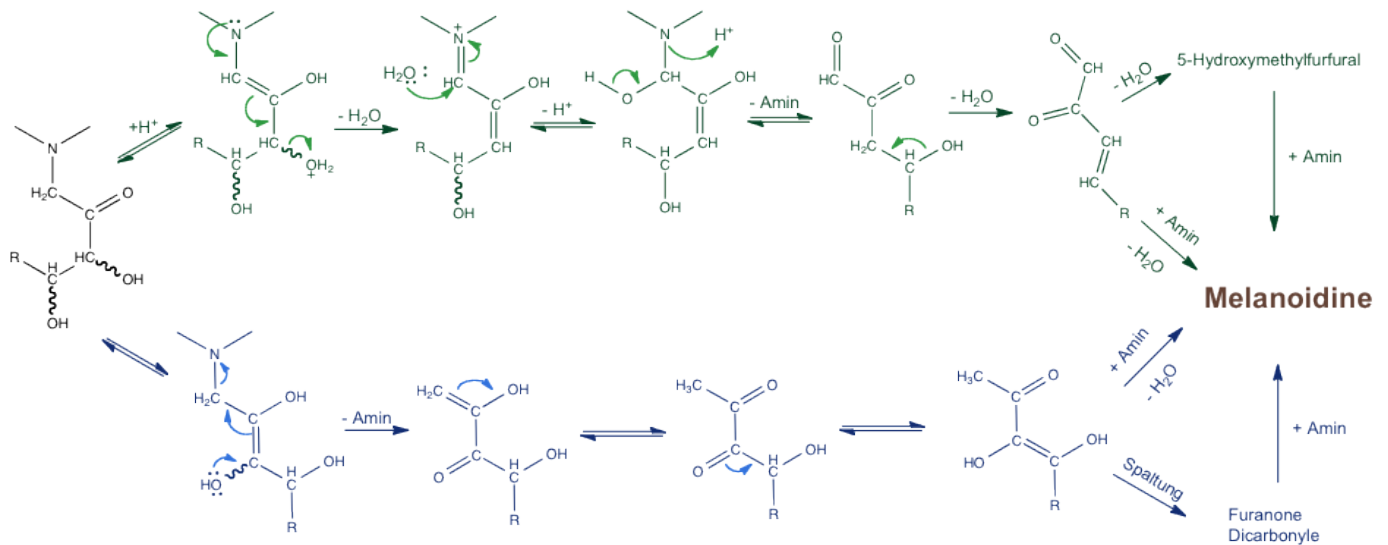


Abbildung 3 Zweiter Schritt der Maillard-Reaktion. Schematische Darstellung der Bildung eines Amadori-Produkts [4].

Amadori-Verbindungen reagieren weiter zu Melanoidinen [10]. Melanoidine stellen eine heterogene Klasse an braungefärbten Verbindungen, die immer ein Stickstoff-Atom enthalten, dar [10].

Abbildung 4 zeigt die zwei Hauptwege, über die diese Reaktionen laufen. Die beiden Hauptwege verlaufen über 1,2-Enolisierung zu 3-Deoxy-1,2-dicarbonylen oder 2,3-Enolisierung zu 1-Deoxy-2,3-Dicarbonylen [4]. Welcher der beiden Wege beschritten wird hängt dabei primär vom pH-Wert ab: bei niedrigen pH-Werten wird eine 1,2-Enolisierung gegenüber der 2,3-Enolisierung vorgezogen [4]. Die Faktoren, die Einfluss auf den Verlauf der Enolisierung haben könnten, wurden 1964 von Anet beschrieben [11]. Für die 1,2-Enolisierung ist ein niedriger pH-Wert entscheidend, da bei diesem das Stickstoff-Atom protoniert werden kann. Die 2,3-Enolisierung, bei der das Amadori-Produkt teilweise deprotoniert vorliegen sollte, wird durch hohe pH-Werte indirekt gefördert, da das Stickstoff-Atom nicht protoniert werden kann und somit eine 1,2-Enolisierung nicht möglich ist. Dieser Zusammenhang konnte in einer Studie zur Bildung des zu Rindfleischaroma beitragenden 4-Hydroxy-5-Methyl-3(2H)-furanon gezeigt werden [12]. Die Amadori-Produkte 1-Deoxy-1-dibenzylamino-D-Fructuronsäure, 1-Benzylamino-1-Deoxy-D-Fructuronsäure und 1-Benzylamino-1-Deoxy-D-Xylulose wurden in 2 N Schwefelsäure zu 2-Furaldehyd umgesetzt. Bei pH 7 wurde hingegen 4-Hydroxy-5-Methyl-3(2H)-furanon als Hauptprodukt ermittelt. Bei Lösen der Amadori-Produkte in Essigsäure und Einstellen des pH-Werts auf 2.5 mit Eisessig wurde das Furanon in Ausbeuten von unter 6 % aus 1-Benzylamino-1-Deoxy-D-Fructuronsäure und 1-Benzylamino-1-Deoxy-D-Xylulose gebildet, während es als Hauptprodukt aus 1-Deoxy-1-dibenzylamino-D-Fructuronsäure nachgewiesen wurde.

Niedriger pH-Wert: 1,2-Enolisierung



Hoher pH-Wert: 2,3-Enolisierung

Abbildung 4 Letzter Schritt der Maillard-Reaktion. Schematische Darstellung der beiden Reaktionswege zur Bildung von Melanoidinen [4, 13].

1.2 Maillard-Reaktionsprodukte und ihre biologische Relevanz

Im Rahmen einer typischen „Western diet“ werden regelmäßig stark erhitzte Lebensmittel, die dadurch bedingt hohe Gehalte an Maillard-Reaktionsprodukten aufweisen können, konsumiert [14]. Tabelle 1 zeigt die Gehalte des gut charakterisierten und stabilen Maillard-Reaktionsprodukts N^ε-Carboxymethyllysin [23-25] in einigen Lebensmitteln. Abbildung 5 zeigt die chemische Struktur von N^ε-Carboxymethyllysin.

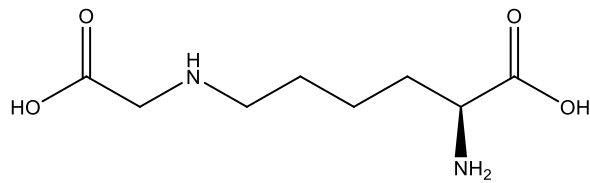
Abbildung 5 Chemische Struktur von N^ε-Carboxymethyllysine

Tabelle 1 Zusammenfassung der CML-Gehalte einiger Lebensmittel

Lebensmittelgruppe	CML-Gehalt (mg/kg)	Referenz
Obst und Gemüse	26.7 ± 30.4	[15]
Kaffee	84.1 ± 8.1	[15]
Cerealien	281.3 ± 151.2	[15]
Milch	343	[16]
Kondensmilch	499 (0 - 1015)	[16]
Molkenkäse	1691	[16]

Während Maillard-Reaktionsprodukte durch die chemische Reaktion von reduzierten Zuckern mit Amino-Gruppen zum Beispiel in Lebensmitteln entstehen, bezeichnet der Begriff AGE (*Advanced Glycation Endproduct*) die Bildung dieser Produkte *in vivo*, beispielsweise durch die Langzeit-Inkubation von Proteinen mit Glukose [21]. Eine weitere Studie hat gezeigt, dass *in vivo* α -Dicarbonyl-Verbindungen wie Glyoxal als Vorstufe für AGE dienen können [22]. Die Analyse humaner Plasmaproteine von Typ II Diabetikern und gesunden Personen hat dabei ergeben, dass Typ II Diabetiker signifikant höhere Glyoxal-AGE Antigen-Level haben als gesunde Personen. Die Aufnahme von großen Mengen an Maillard-Reaktionsprodukten könnte eine signifikante Erhöhung des AGE-Levels des Körpers zu Folge haben, da diese durch Absorption zumindest teilweise in den Blutkreislauf gelangen können [17-20]. Eine Studie an N^ε-Carboxymethyllysine, einem gut charakterisierten und stabilen Produkt der Maillard-Reaktion [23-25], welches auch als Hauptepitop AGE-modifizierter Proteine beschrieben wird [21], hat gezeigt, dass ungefähr 30 % des mit der Nahrung aufgenommenen CML in den Blutkreislauf gelangen [18]. Eine Arbeit an 172 gesunden

Erwachsenen hat eine starke Korrelation zwischen CML-Plasmakonzentration und Aufnahme von Maillard-Reaktionsprodukten gezeigt [26]. Bei dieser Studie wurde die Nahrungsaufnahme über drei Tage aufgezeichnet und die CML-Plasmakonzentration mittels ELISA bestimmt. An Langzeitvegetariern und Omnivoren wurde gezeigt, dass Langzeitvegetarier signifikant höhere CML-Plasmakonzentrationen als Omnivore haben [27]. Die mittels CML-ELISA ermittelte CML-Plasmakonzentration betrug für Langzeitvegetarier 525.7 ± 29.5 ng/mL während bei Omnivoren 427.1 ± 15.0 ng/mL gemessen wurden. Weiters wurden in dieser Studie Glukose-Plasmakonzentration, C-reaktives Protein-Konzentration, die Nierenfunktionsparameter Kreatinin und Cystatin C bestimmt und die glomeruläre Filtrationsrate berechnet. Da diese Werte in den normalen Konzentrationsbereich fielen und zwischen den Gruppen nicht signifikant unterscheidbar waren, wurden inflammatorische Prozesse oder reduzierte Nierenfunktionsrate als Ursache der Unterschiede der AGE-Plasmakonzentration ausgeschlossen.

Neben exogen mit der Nahrung aufgenommenem CML, kann dieses auch endogen gebildet werden. Für die Bildung von CML wurden zwei Mechanismen vorgeschlagen. Der von Kasper und Schieberle vorgeschlagene Mechanismus zur CML-Bildung involviert weder freies Glyoxal noch auto-oxidative Reaktionen (Abbildung 6) [28]. Glyoxal wird beispielsweise mit Keksen aufgenommen. Eine Studie, in der Glyoxal chromatographisch als Chinoxalin-Derivat gemessen wurde, schätzt, dass die spanische Bevölkerung täglich durchschnittlich 213 µg Glyoxal pro Person mit Keksen aufnimmt [29].

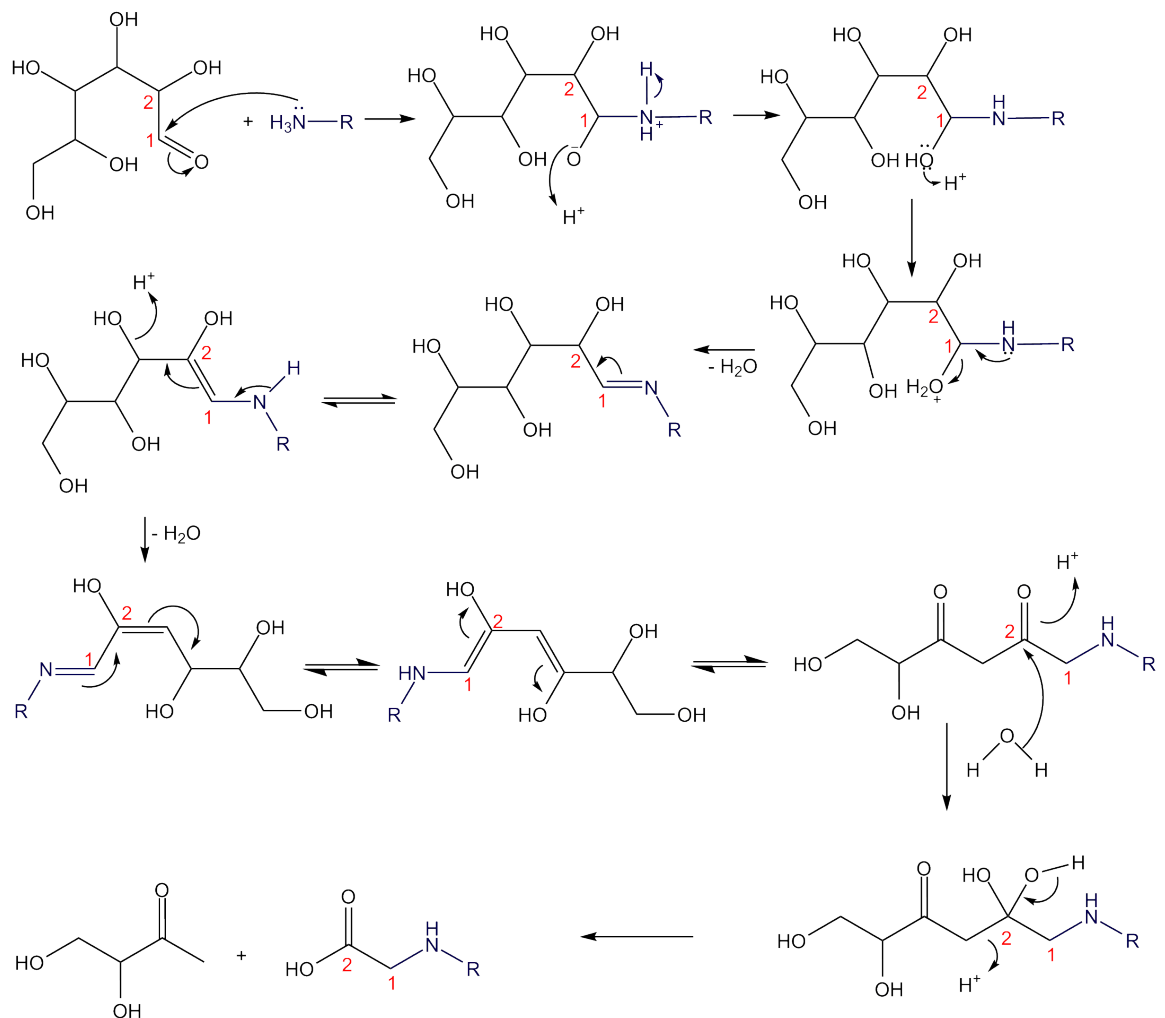


Abbildung 6 Von Kasper und Schieberle postulierter Mechanismus der CML-Bildung [28]

In dieser Studie wurden Hippuryllysine, D-[1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]-Glukose und D-[U- $^{13}\text{C}_6$]-Glukose zur Aufklärung des Mechanismus eingesetzt. Der abgebildete Mechanismus beruht auf dem Einbau der Kohlenstoffatome C_1 und C_2 aus einem Molekül Glukose. Die Aminogruppe der Lysinseitenkette der Schiff'schen Base reagiert mit der Aldehydgruppe eines Glukose-Moleküls, gefolgt von einer Amadori-Umlagerung, die die Bildung einer 2,4-Dioxo-Gruppe zur Folge hat. Kasper und Schieberle schlagen vor, dass diese 2,4-Dioxo-Verbindung unter Hydratation zu CML und 3,4-Dihydroxy-2-butanon in einer β -Keto-Spaltung umgesetzt wird. Dieser Mechanismus wurde in einer Studie von Culbertson et. al. [30] unterstützt. In ihren Experimenten konnten Culbertson et al. [30] die CML-Bildung unter Anwesenheit von starken Chelatbildnern

und phenolischen Antioxidantien zeigen. Die Bildung von CML unter diesen Bedingungen impliziert einen radikalfreien Mechanismus [30].

Andere Studien schlagen einen auf freien Radikalreaktionen beruhenden Mechanismus vor. Hayase et al. [31] führten Experimente mit einem 3-Deoxyglucoson-Lysozym-Modellsystem durch. In dieser Studie wird beschrieben, dass die Bildung von CML, Glyoxal und Glukosonen unter aeroben Bedingungen in einer oxidativen, von Übergangsmetallionen katalysierten Reaktion verläuft [31]. Dieser Mechanismus wird in von Nagai et al. [32] durchgeführten Experimenten mit dem Radikalbildner Peroxynitrit unterstützt. Die Studie weist darauf hin, dass Peroxynitrit-induzierte CML-Bildung nicht nur aus Amadori-Produkten sondern auch aus Glukose, in einem Reaktionsweg über Glucosone und Glyoxal, erfolgen kann [32]. In diesen Experimenten konnte Glucoson mittels HPLC nachgewiesen werden. In dem von Hayase et al. [31] beschriebenen Mechanismus ist Glucoson ein Zwischenprodukt. Zyzak et al. [33] beschrieben einen oxidativen Zerfall von Fructoselysin zu Glucoson und CML bei physiologischem pH-Wert und Temperatur. Eine weitere Studie von Fu et al. [34] beschreibt die Metallionen-katalysierte Oxidation von mehrfachungesättigten Fettsäuren bei der Anwesenheit von Protein. In vitro wurde gezeigt, dass, in Übereinstimmung mit konjugierten Dienen, der CML-Gehalt von LDL unabhängig von der Anwesenheit des Amadori-Produkts Fructoselysin am Protein in einer Kupferionen-katalysierten Oxidation steigt [34]. Versuche von Al-Abed und Bucala [35] zeigen eine mögliche direkte Bildung von CML aus Glyoxal durch Inkubation mit Lysin unter physiologischen Bedingungen. Die Studie schlägt eine mögliche Beteiligung von Cystein vor. Anwesenheit von Cystein im Protein könnte die Bildung von CML durch Bildung eines temporären Quervernetzungen, der möglicherweise stabilisierend auf das System wirkt, unterstützen [35]. Mit der Bildung von Quervernetzungen durch AGEs werden negative Auswirkungen auf den menschlichen Körper assoziiert. Beispielsweise untersucht eine Arbeit an humanem Knorpelkollagen, die Auswirkung von mit zunehmenden Alter im Knorpelgewebe akkumulierten AGEs auf das Kollagen-Netzwerk in Gelenken [36]. Dabei wurde Knorpelkollagen mit Threose inkubiert um

den AGE-Gehalt zu erhöhen. Inkubation mit Threose führte zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der AGE-Bildung und zu einer Erhöhung der Steifheit des Kollagen-Netzwerks. Dies könnte dazu beitragen, dass das Knorpelkollagen leichter verletzbar wird. Abbildung 7 zeigt den von Hayase et al. [31] postulierten Reaktionsweg.

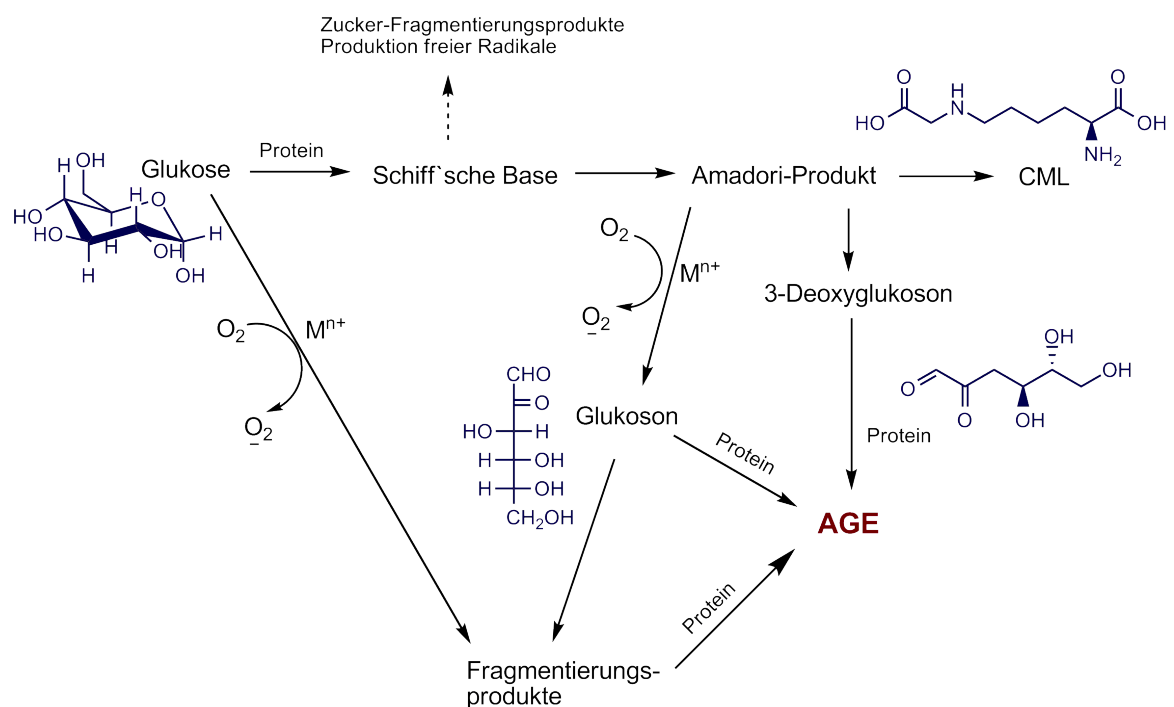


Abbildung 7 Von Hayase postulierter Mechanismus der CML-Bildung [31]

AGEs, für die oft CML als Indikator benutzt wird, werden mit der Progression diverser Krankheiten, beispielsweise Diabetes, in Zusammenhang gebracht.

Diabetes Patienten, besonders jene mit eingeschränkter Nierenfunktion, zeigen erhöhte CML-Plasmakonzentrationen im Vergleich zu gesunden Personen [37, 38]. Bei Typ II Diabetes-Patienten mit proliferativer Retinopathie wurden mittels ELISA-Plasmakonzentration von 1182 ± 346 ng/mL ($5,8 \pm 1,7$ μ M) gemessen während gesunde Kontrollen Plasmakonzentrationen von 521 ± 134 ng/mL ($2,6 \pm 0,7$ μ M) aufwiesen [37]. Plasmakonzentration über 1000 ng/mL ($4,9$ μ M) wurden dabei mit einem 25-mal so großem Risiko für proliferative Retinopathie assoziiert. Bei Typ I

Diabetes-Patienten mit reduzierter glomerulärer Filtrationsrate wurden mittels LC/MS/MS CML-Plasmakonzentrationen von 4,9 (2,0 – 12,6) μM nachgewiesen [38]. Diabetes Typ I Patienten mit normaler glomerulärer Filtrationsrate zeigen deutlich geringere CML-Plasmakonzentrationen von 2,9 (1,7 – 4,4) μM .

Der regelmäßige Konsum von hochtemperaturbehandelten Mahlzeiten wird mit der Progression von kardiovaskulären Komplikationen von Diabetes Typ II Patienten in Verbindung gebracht [39]. So zeigte eine 15-tägige Studie an 24 Diabetikern, dass die Aufnahme von Mahlzeiten, die stark erhitze Lebensmittel enthielten, zur verstärkten Bildung von proinflammatorischen Cytokinen führte im Vergleich zum Verzehr der gleichen Mahlzeit nach geringer Erhitzung [39]. Weiters stieg die AGE-Serumkonzentration nach Konsum der hocheerhitzen Mahlzeiten um 28 % an [39]. Im Vergleich zu den niedrigererhitzen Mahlzeiten enthielten die hocheerhitzen Mahlzeiten ungefähr fünfmal so viel AGEs. Mit Mahlzeiten, die niedrigererhitze Lebensmittel enthielten, wurden durchschnittlich $3,67 \pm 1,2 \times 10^6$ AGE Einheiten pro Tag aufgenommen, während mit Mahlzeiten, die hocheerhitze Lebensmittel enthielten, durchschnittlich $16,3 \pm 3,7 \times 10^6$ AGE Einheiten pro Tag aufgenommen wurden.

Auch bei gesunden Menschen wurde der regelmäßige Verzehr von stark thermisch behandelten Lebensmitteln mit einem Anstieg kardiovaskulärer Risikofaktoren in Zusammenhang gebracht [14]. Bei der Studie, an der 62 Freiwillige teilnahmen, handelte es sich um eine randomisierte, Crossover Intervention, bei der die Effekte einer hocheerhitzen und einer niedrigererhitzen Mahlzeit verglichen wurden. Nach einem Monat wurde eine signifikant verringerte Insulinsensitivität und geringere Plasmakonzentrationen an langkettigen Omega-3-Fettsäuren, Vitamin C und Vitamin E ermittelt. Weiters wurde ein Anstieg an Plasmacholesterin und Triglyceriden beobachtet.

Neben möglichen für die Gesundheit nachteiligen Wirkungen können Maillard-Reaktionsprodukte aber auch positive Wirkungen mit sich bringen. In einer Studie an Fibroblasten des Mausherzens wurde beispielsweise gezeigt, dass Brotkrustenextrakt

die Antioxidantien-Abwehr der Fibroblasten *in vitro* verbesserte und auch der Antioxidantien-Status des Herzens von Mäusen, die mit einer Brotkrustenextrakt enthaltenden Futtermischung ernährt wurden positiv, beeinflusst wurde [40]. In der Studie wurde ein signifikanter Anstieg in der Proteinexpression von Mn-SOD und Ec-SOD nach Behandlung mit Brotkrustenextrakt gezeigt. Um oxidativen Stress zu verursachen wurden Fibroblasten des Mausherzens mit Wasserstoffperoxid behandelt. Nach 24 h starben zwischen 50 – 80 % der Zellen. Das Vorbehandeln mit Brotkrustenextrakt konnte dies reduzieren.

Mit der Nahrung aufgenommene Maillard-Reaktionsprodukte, könnten auch Auswirkungen auf Hunger- und Sättigungsregulation haben. Die Aufnahme von thermisch behandelten Nahrungsmitteln wurde mit einer höheren Energiezufuhr in Verbindung gebracht, da die Energiedichte dieser Lebensmittel auf Grund des Wasserverlustes beim Erhitzen höher ist [14]. Eine weitere Hypothese ist, dass diese Lebensmittel eine hohe Konzentration an Aromastoffen aufweisen, die Hunger- und Sättigungsregulation beeinflussen und damit auch Nahrungs- und Energiezufuhr modulieren. Dies wurde durch Studien unterstützt, die einen Einfluss von retronasaler Aromafreisetzung auf die empfundene Sättigung zeigen [41]. Weiters wird diese Hypothese durch eine Studie an Wistar Ratten belegt, die zeigt, dass die Aufnahme von Futtermittel mit 25 % (w/w) Brotkruste für drei Wochen Insulin und Leptin-Rezeptor mRNA-Level im *Bulbus olfactorius* erhöht, während NPY mRNA-Level gesenkt werden [42]. Die Erhöhung des Insulin-Levels im Gehirn wird mit einer Reduzierung der Nahrungsaufnahme und einer Erhöhung des Energieverbrauchs durch anabolische Neuropeptide assoziiert [43].

1.3 Regulation der Sättigung und Energiehomöostase

Energiehomöostase kann definiert werden als Prozess, bei dem die Energiezufuhr dem Energieverbrauch angepasst ist um das Körpergewicht und somit die Energiereserven, die im menschlichen Körper in Form von Fett gespeichert werden, konstant zu halten [44]. Für die Energiehomöostase sind somit zwei Faktoren entscheidend, die

Energiezufuhr durch Nahrungsaufnahme und der Energieverbrauch durch Grundumsatz und physikalische Aktivität. Dabei ist zu beachten, dass Übergewicht beim Menschen nicht durch einige wiederholte Episoden des massiven Überessens, sondern ein kleines, regelmäßiges Übermaß an Energiezufuhr verursacht wird [44]. Eine Studie zu Energiezufuhr und Energieverbrauch schätzen, dass eine zusätzliche Kalorienzufuhr von weniger als 0,5 % zu Gewichtszunahme führt [45]. Prinzipiell kann die Regulation der Nahrungsaufnahme in Langzeitprozesse, die die Stabilität der Körperfettmasse regulieren, und Kurzzeitprozesse, die Mahlzeitsende und Intervall zwischen Mahlzeit regulieren, unterteilt werden [44]. In diesem Zusammenhang ist die Regulation der Sättigung zu beachten [44]. Abbildung 8 zeigt eine Darstellung von in die Regulation der Sättigung involvierter Systeme.

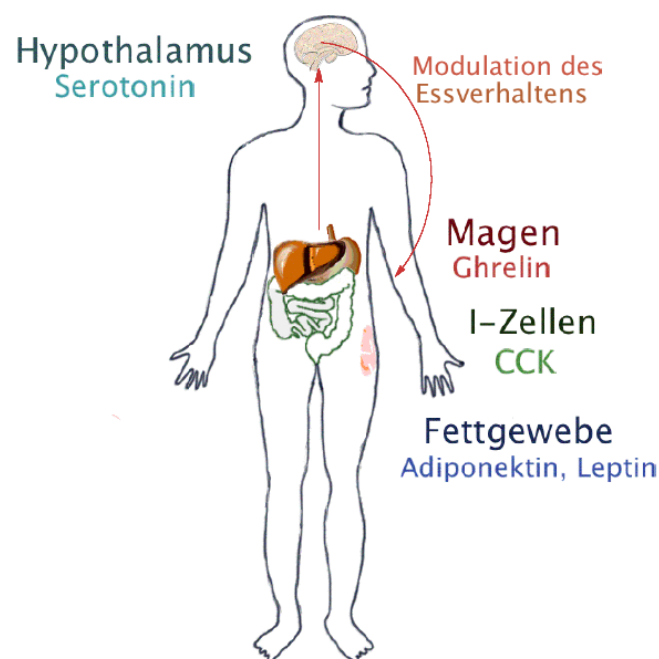


Abbildung 8 Schematische Darstellung in die Regulation der Sättigung involvierter Systeme. Modifiziert nach [46]

Die Regulation von Hunger und Sättigung besteht aus einer komplexen Interaktion von neuronalen und hormonalen Signalen aus unterschiedlichen Geweben und dem Zentralnervensystem [47]. Eines der am besten untersuchten hormonellen

Sättigungssignale ist Cholecystokin (CCK) [44]. CCK wird von enteroendokrinen I-Zellen nach der Aufnahme von Lipiden und Proteinen ausgeschüttet und vermittelt die Inhibierung der Nahrungsaufnahme [48]. Eine wichtige Anbindungsstelle für die Integration von peripheren Signalen zur Regulation der Nahrungsaufnahme stellen vagale afferente Neuronen dar, welche ein primäres Ziel von CCK sind [48]. Weiters reguliert CCK die Expression von Rezeptoren und Neuropeptiden dieser Neuronen. Dieser Effekt wird von Ghrelin inhibiert [48].

Ghrelin wird im Magen sekretiert und erhöht, wenn es peripher oder zentral gegeben wird, die Nahrungsaufnahme. Eine Studie an Ratten hat gezeigt, dass intrazerebroventrikuläre Ghrelin-Injektionen dosisabhängig Nahrungsaufnahme und Körpergewicht erhöhen [49]. In einer weiteren Studie an Ratten führte eine akut systemische Administration von 1 nmol Ghrelin pro Ratte zu einer signifikanten Stimulation der Nahrungsaufnahme [50]. Die Effekte von Ghrelin auf Nahrungsaufnahme, Sauerstoffverbrauch, Magenentleerung und NPY mRNA-Expression wurden in einer Mausstudie untersucht [51]. Die Studie zeigte eine erhöhte Ghrelin Genexpression im Magen beim Fasten und in ob/ob Mäusen. Weiters führte die periphere Administration von Ghrelin zu erhöhter Nahrungsaufnahme und verringertem Energieverbrauch.

Im nüchternen Zustand ist die Plasmakonzentration an Ghrelin erhöht und fällt kurz nach dem Beenden einer Mahlzeit ab. Eine einzigartige Eigenschaft von Ghrelin im Vergleich zu anderen gastrointestinalen Signalen ist, dass Ghrelin-induzierte Signale direkt an Rezeptoren im Hypothalamus geleitet werden, obwohl so wie für CCK Rezeptoren an vagalen Nerven vorhanden sind [47].

Neben Ghrelin hat auch Leptin Einfluss auf den Effekt von CCK; es wirkt sich verstärkend aus [48]. Leptin wird aus dem Fettgewebe sekretiert und kann über Rezeptor-vermittelten Transport ins Gehirn gelangen, wo es über Leptin-Rezeptoren Energiebalance und Essverhalten beeinflusst [52]. In den „Sättigungszentren“ des

Gehirns exprimieren zwei verschiedene Arten der Neuronen Leptin-Rezeptoren. Zum einen, eine Population an Neuronen, die orexigenes Neuropeptid Y (NPY) produziert und zum anderen eine Population an Neuronen, die das anorexigene Proopiomelanocortin (POMC) synthetisiert. Leptin inhibiert NPY/AgRP-Neuronen und unterdrückt die Expression von orexigenen Neuropeptiden [52]. Desweiteren erhöht Leptin die POMC-Synthese und verringert dadurch Appetit und erhöht den Energieverbrauch durch Aktivierung von Melanocortin-Rezeptoren im Zentralnervensystem [52]. Auf diese Weise nimmt Leptin auf NPY und POMC Einfluss. Für Leptin wurde auch ein Zusammenhang mit dem Serotonin-System gezeigt [53].

1.3.1 Serotonin

1.3.2 Vorkommen und Funktion

Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) ist ein Indolamin, welches zur Klasse der Monoamin-Neurotransmitter zählt.

Serotonin ist, unter anderem, für die Regulation kardiovaskulärer Funktionen von Bedeutung. Eine Studie an Mäusen deutet auf Regulierung der Differenzierung und Proliferation des adulten und sich entwickelnden Herzens über Interaktion mit dem Serotonin-Rezeptor 5-HT_{2B} hin [54].

Im Endothel der Lunge, beispielsweise, ist die Bildung von 5-Hydroxytryptophan durch die Monooxygenase Tryptophan-Hydroxylase 1 [55] der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Serotonin-Synthese [56]. Desweiteren ist 5-HT im Gastrointestinaltrakt anzutreffen. Im Darm befindet sich mit einem Anteil von 95 % der Großteil des im menschlichen Körper vorkommenden Serotonins, wobei 90 % davon auf die enterochromaffinen Zellen (EC) der Darmschleimhaut entfallen [57]. Anhand von Meerschweinchen EC-Zellen wurde gezeigt, dass Serotonin sehr schnell von einer kleinen Menge Zellen ausgeschüttet werden kann und so zu hohen lokalen Konzentrationen führen kann [58].

Im Gehirn gebildetes Serotonin kann die Blut-Hirn-Schranke nicht überqueren; es wird aus der Aminosäure Tryptophan gebildet, die diese Schranke passieren kann [59]. Tryptophan kompetitiert mit anderen Aminosäuren um den Zugang zum Gehirn [53]. Durch erhöhte Glukose-Level nach der Nahrungsaufnahme wird Insulin sekretiert, welches die Verwendung von großen, neutralen Aminosäuren in der Peripherie, mit relativer Ausnahme von Tryptophan, erhöht [53]. Daher hat die postprandiale Insulin-Sekretion zur Folge, dass Tryptophan vermehrt ins das Gehirn aufgenommen und Serotonin synthetisiert werden kann [53]. Weiters reguliert Serotonin seine Synthese im Gehirn über Serotonin-Rezeptoren [53].

Abbildung 9 zeigt eine schematische Darstellung der Synthese und Ausschüttung von Serotonin. Bei der Ausschüttung von Serotonin spielen Calcium-Ionen eine wichtige Rolle. Calcium-Ionen sind verbreitete sekundäre Messenger und ihre Beteiligung an der Neurotransmitterausschüttung wurde in mehreren Studien gezeigt [60, 61]. Beispielsweise wurde die Abhängigkeit der Neurotransmitterausschüttung von Calcium-Ionen in einer Studie mittels Ca^{2+} „uncaging“ und dem für Calcium-Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 FF gezeigt [62]. Diese Studie hat gezeigt, dass die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration auf 10 μM ausreichend für die Ausschüttung von bis zu 80% des Neurotransmitterpools in weniger als 3 ms ist. Die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration führt zur Exocytose von Serotonin (Abbildung 9, 3) aus den synaptischen Vesikeln (Abbildung 9, 2) der präsynaptischen Membran in den extraneuronalen synaptischen Raum [59, 60]. Durch Erkennung der ausgeschütteten Neurotransmitter durch Rezeptoren (Abbildung 9, 4) in der postsynaptischen Membran ändern sich, oft durch Intervention von sekundären Botenstoffen wie cAMP, die Ionenpermeabilität, das Membranpotential und der Metabolismus des postsynaptischen Neurons [59]. Die im extraneuronalen Raum verbliebenen Neurotransmitter werden inaktiviert (Abbildung 9, 6) oder wieder in die präsynaptische Axonendigung aufgenommen (Abbildung 9, 5) [59].

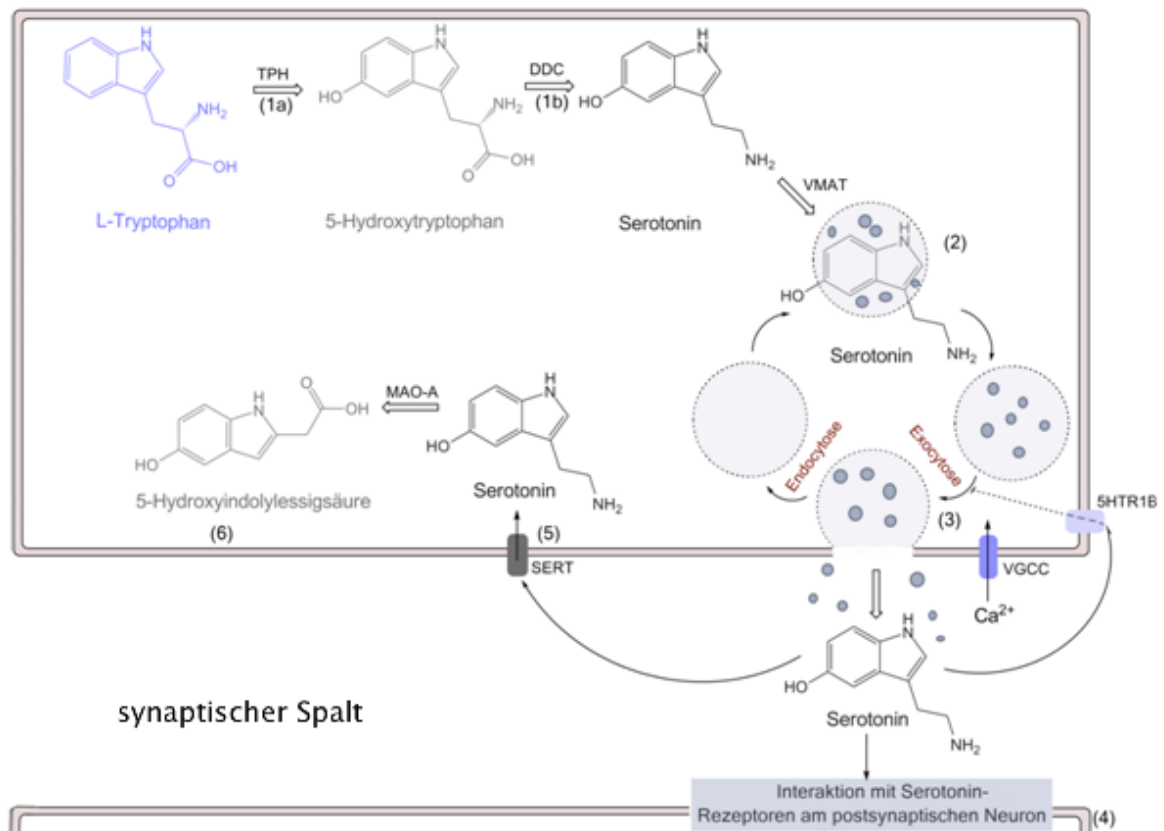


Abbildung 9 Schematische Darstellung der Biosynthese von Serotonin. Die aus Nahrung aufgenommene, essentielle Aminosäure Tryptophan wird durch TPH (Tryptophan-Hydrolase; 1a) zu 5-Hydroxytryptophan umgesetzt, welches in Folge durch DDC (Dopa-Decarboxylase; 1b) zu Serotonin decarboxyliert wird. Serotonin wird mittels VMAT (vesikulärer Monoamintransporter; 2) in Vesikel geschleust, die anschließend durch Exocytose (3) in den synaptischen Spalt entleert werden. Die Ausschüttung des Neurotransmitters wird induziert über Influx von Ca²⁺-Ionen, welche über VGCC (spannungsgesteuerter Ca²⁺-Ionenkanal; 3) in die Axonendigung einströmen können. Der ausgeschüttete Neurotransmitter kann mit Rezeptoren am postsynaptischen Neuron interagieren (4) oder über SERT (Serotonintransporter; 5) wieder in die Zelle eingeschleust werden und durch das Enzym MAO-A (Monoaminoxidase-2; 6) zu 5-Hydroxyindolyllessigsäure abgebaut werden. Modifiziert nach [59, 63]

Insgesamt wurden bisher 14 verschiedene Serotonin-Rezeptoren identifiziert, die nach Funktionsweise und Strukturhomologie, in sieben Familien eingeteilt werden

(Abbildung 10) [64, 65]. Die Serotonin-Rezeptoren 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ und 5-HT₇ gehören zur Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren [64-66]. 5-HT₃ fällt in die Gruppe der ionotropen Rezeptoren und bildet somit eine Ausnahme [64-66].

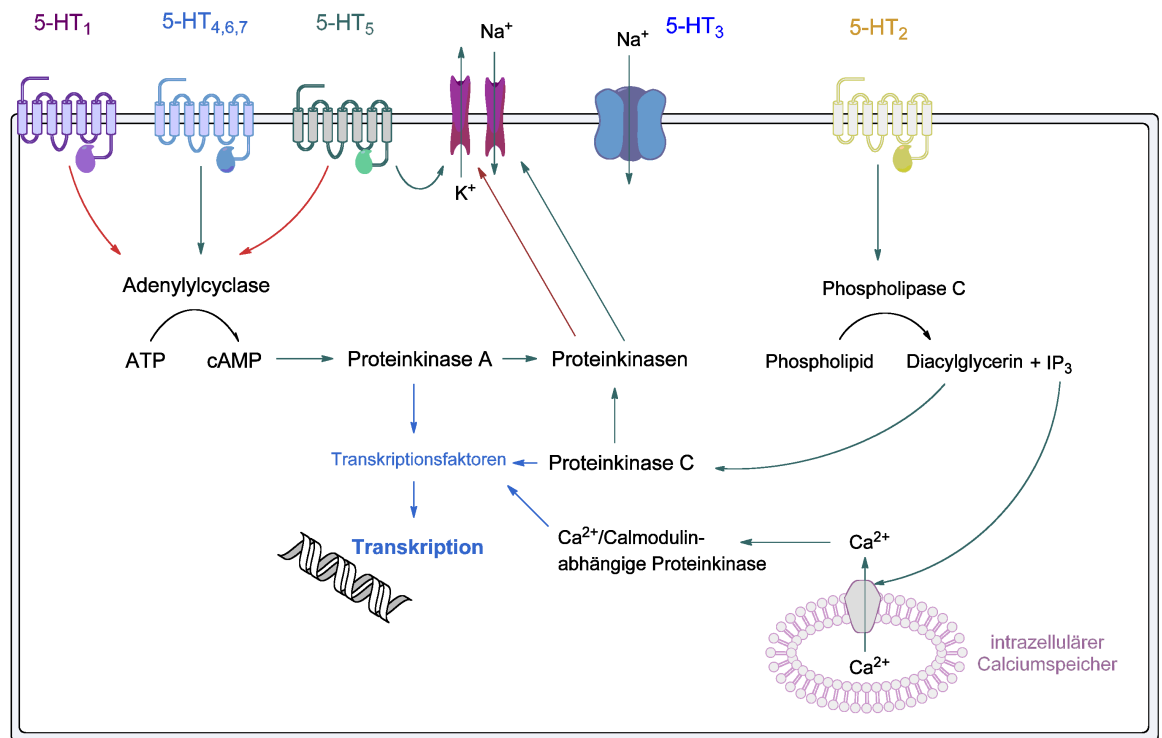


Abbildung 10 Schematische Darstellung der 7 Serotonin-Rezeptorklassen und ihrer intrazellulären Effektoren. 5-HT₁, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ und 5-HT₇, G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit 7 Transmembrandomänen, wirken auf die Synthese von cAMP durch die Adenylylcyclase (AC; EC 4.6.1.1). In weiterer Folge aktiviert cAMP die Proteinkinase A (EC 2.7.11.11), welche über Phosphorylierung von Proteinkinasen die Ionenkanal-Aktivität moduliert. Die Aktivität des Kationenkanals ist dabei für die De-/Hyperpolarisierung des Neurons von Bedeutung. 5-HT₂ beeinflusst die Ionenkanalaktivität über Aktivierung von Phospholipase C (EC 3.1.4.11). Die Aktivierung von Phospholipase C führt zur Depolarisierung des Neurons über Aktivierung von Proteinkinase C (EC 2.7.11.13) und weiteren Proteinkinasen. In der Phospholipase C katalysierten Reaktion von Phospholipid zu Diacylglycerin wird IP₃ frei, welches zur Calcium-Ausschüttung und zur Aktivierung der Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase (EC 2.7.11.17) führt. CamK, PKC und PKA wirken über Phosphorylierung auf Transkriptionsfaktoren, die die Transkription beeinflussen. 5-HT₃ Aktivierung führt zur raschen Depolarisierung des Neurons. Modifiziert nach [53].

Serotonin-Rezeptoren sind in eine Vielzahl biologischer Prozesse involviert. Beispielsweise wurde bei Mäusen bei Licht-Dunkel-Tests eine Reduktion der Beunruhigung der Testobjekte durch 5-HT₃ Rezeptor Antagonisten beobachtet [64]. Des Weiteren kann der 5-HT₃ Rezeptor die Ausschüttung von CCK, welches unter anderem mit Panikzuständen assoziiert wurde [67, 68], modulieren [64]. Für die Serotonin-Rezeptoren 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} und 5-HT_{1B} wurde ein Zusammenhang mit der Regulation der Nahrungsaufnahme gezeigt [69-73].

1.3.3 Serotonin in der Regulation von Nahrungsaufnahme und Sättigung

Für das hypothalamische Serotonin-System wurde ein Einfluss auf die Kontrolle der Kohlenhydrat-Aufnahme und auf die Sättigung gezeigt (Abbildung 11) [74].

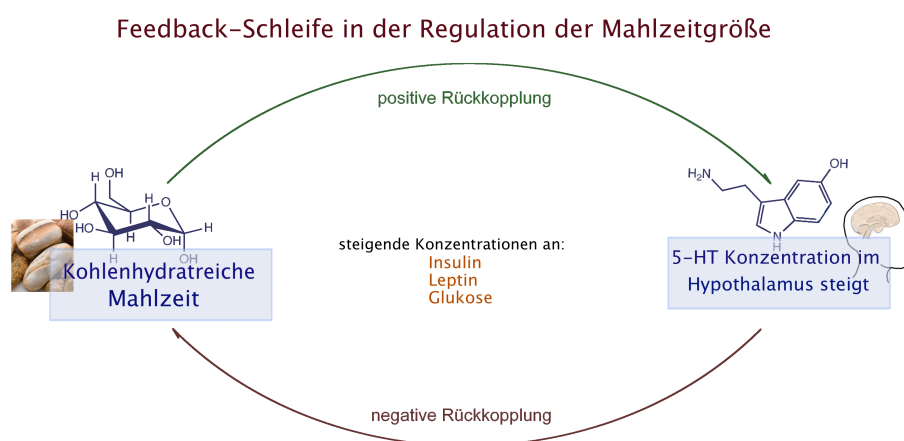


Abbildung 11 Postulierter Feedback-Mechanismus in der Kontrolle der Größe der konsumierten Mahlzeit für kohlenhydratreiche Mahlzeiten. Aus der Abbildung geht eine Beteiligung zirkulierender Hormone und hypothalamischen Serotonins hervor. Modifiziert nach [75].

Weiters wurde ein inverser Zusammenhang zwischen Serotoninkonzentration im Gehirn und Nahrungsaufnahme etabliert [53]. Die Aktivierung der unterschiedlichen

Serotonin-Rezeptoren kann dabei verschiedene Auswirkungen auf die Sättigung und Nahrungsaufnahme haben.

Beispielsweise führt die Aktivierung des ersten voll sequenzierten Serotonin-Rezeptorsubtyps [64], 5-HT_{1A}, zu verstärkter Nahrungsaufnahme [69, 72]. Diese Wirkung des Serotonin-Autorezeptors ist möglicherweise auf verminderte Beteiligung von Serotonin in anorexigenen Stoffwechselwegen, bedingt durch eine verringerte Ausschüttung des Neurotransmitters, zurückzuführen [53]. In weiterer Folge wurde gezeigt, dass Behandlung von nicht-hungernden Ratten mit 5-HT_{1A} Agonist 7-(Dipropylamino)-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-1-ol, kurz 8-OH-DPAT, zu erhöhter Nahrungsaufnahme führt [76, 77].

Für Serotonin-Rezeptoren 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A} und 5-HT_{2C} wurde ein gegenteiliger Effekt beobachtet. Die Aktivierung dieser Rezeptoren führt zu einer Verringerung der Nahrungsaufnahme [70, 71, 73]. In diversen Studien an Ratten wurde gezeigt, dass Verbindungen, die 5-HT_{1B} oder 5-HT_{2C} stimulieren, die Sättigung fördern. Dabei wird davon ausgegangen, dass Stimulierung von 5-HT_{2C} mehr auf Regulation der Essensrate und Stimulierung von 5-HT_{1B} mehr auf Mahlzeitgröße Einfluss nimmt [78, 79].

In der therapeutischen Regulation von Körpergewicht und Nahrungsaufnahme durch Serotonin-Rezeptoren wurden 5-HT_{2C}-Agonisten erfolgreich eingesetzt [80]. Zudem zeigten Studien an 5-HT_{2C} knockout-Mäusen, dass diese Adipositas entwickeln [81]. Dieser Effekt könnte auf 5-HT_{2C} Rezeptoren auf POMC-Neuronen zurückzuführen sein, bei denen Agonismus für den Rezeptor zu Erhöhung des MC₄ Rezeptor-Signalwegs führt [80].

Neben 5-HT_{2C} wurde auch 5-HT_{1B} als mögliches Ziel zur Behandlung von Adipositas untersucht [80]. Ähnlich wie für 5HT_{2C}-Agonisten wird von einer Steigerung des MC₄ Rezeptor-Agonismus ausgegangen [80]. Agonismus von 5-HT_{1B} Rezeptoren auf NPY/AgRP-Neuronen soll zu diesem Effekt führen, da diese zu einer Steigerung des α -

msh, ein MC₄-Rezeptor Agonist, führen und gleichzeitig zu eine Senkung der AgRP-Level, ein MC₄-Rezeptor Antagonist, zur Folge haben [80]. Studien an 5-HT_{1B} knockout-Mäusen haben gezeigt, dass diese mehr Nahrung aufnehmen und ein höheres Körpergewicht aufweisen als Wildtyp-Mäuse [82].

Neben Co-Lokalisation von Serotonin-Rezeptoren mit NPY/AgRP und POMC auf Neuronen [80], wurde auch ein Zusammenhang zwischen dem Serotonin-System und Leptin gezeigt [53]. Das Vorhandensein von Leptin-Rezeptoren auf serotonergen Neuronen deutet drauf hin, dass Teile der Wirkung von Leptin auf das Energiegleichgewicht über das Serotonin-System laufen [53]. An einer Studie, die den Milchkonsum von Mäusen untersuchte, wurde festgestellt, dass Behandlung mit Serotonin-Rezeptor Antagonist bzw. Serotonin-Entzug, den anorexigenen Effekt von Leptin vermindert [83]. Daten einer weiteren Tierstudie an Ratten weisen ebenso auf Serotonin als mögliches peripheres Sättigungssignal hin [84]. In dieser Studie wurden hungernde Ratten mit 5 mg/kg Serotonin behandelt. Diese Ratten zeigten, bei Zugang zu Futter, normales Sättigungsverhalten.

2. Problemstellung

Zahlreiche Studien befassen sich mit der Wirkung von Maillard-Reaktionsprodukten auf den menschlichen Körper und deren Einfluss auf die Progression diverser Krankheiten, zum Beispiel die Progression kardiovaskulärer Komplikationen bei Diabetes-Patienten. Das stabile und gut charakterisierte N^ε-Carboxymethyllysin wird dabei häufig als Indikator für Maillard-Reaktionsprodukte verwendet.

Neben den Auswirkungen auf die Gesundheit werden Maillard-Reaktionsprodukte mit einer erhöhten Energieaufnahme assoziiert. Eine Studie an Wistar Ratten hat gezeigt, dass Aufnahme von Futter angereichert mit 25 % (w/w) Brotkruste Insulin und Leptin-Rezeptor mRNA-Level im *Bulbus olfactorius* erhöht, während NPY mRNA-Level gesenkt werden [42].

Zu den Auswirkungen auf das Serotonin-System liegen jedoch bisher keine Daten vor.

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen des gut-charakterisierten und stabilen Maillard-Reaktionsprodukts N^ε-Carboxymethyllysin auf die Genregulation der humanen Neuroblastoma-Zelllinie SH-SY5Y zu untersuchen, besonders in Hinblick auf Gene die mit der Regulation der Sättigung in Zusammenhang gebracht werden. Mittels DNA-Microarray wurde ein genomweites Screening durchgeführt und in weiterer Folge eine Auswahl an Genen mittels qRT-PCR, in einem zeitabhängigen Kontext weiter untersucht. Dabei wurden die, von SH-SY5Y-Zellen endogen exprimierten und im Zusammenhang der Regulation der Sättigung beschriebenen, Serotonin-Rezeptoren *HTR1A*, *HTR1B* und *HTR1B* detailliert untersucht. Weiters sollten Untersuchungen zur Serotonin-Ausschüttung und intrazellulärer Calcium-Mobilisierung durchgeführt werden, um einen Effekt von CML auf funktioneller Ebene zu zeigen. Da Studien auf einen Zusammenhang zwischen Calcium und RAGE hin deuten und N^ε-Carboxymethyllysin ein RAGE-Ligand ist, wurde in weiterer Folge der Einfluss von N^ε-Carboxymethyllysin auf die RAGE-Expression untersucht.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Advanced VMS-C4, Magnetrührer, VWR
Arium 611VF, satorius stedim biotech Wasseraufbereitungsanlage
Autoklav 3870 ML, Tuttnauer
Axon GenePix 4100A Microarray-Scanner
Dry-Line Trockenschrank, VWR
Infinite M200 Plattenlesegerät, Tecan
Inkubator CO₂ Binder C150, Binder
IT400 Trino, Mikroskop, VWR
LittleShot Hybridisierungsoven
NanoQuantTM Platte, Tecan
Perspective Biosystems Expedite 8909 synthesizer
PioneerTM Waage, OHAUS
Telstar, Biostar Plus Sterilwerkbank
Zentrifuge, Eppendorf 5810R
Zentrifuge, Eppendorf 5804R

3.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien

Cellstar tissue culture flask, PS, red standard cap (T25, T175), Greiner bio-one
Cryoröhrchen mit Innengewinde, 2 mL, Carl Roth

Eppendorf Research Mikroliterpipetten 10 - 5000 µL
 Eppendorf Research Multikanalpipette, 100 µL
 Glasobjektträger, Schott Nexterion
 Hybridisierungskammer, Grace Biolabs
 Klebepunkte, Grace Biolabs
 Multiwell-Plate (6, 96 Wells) mit Abdeckplatte, Greiner bio-one
 Multi-SafeSeal-Tubes, Carl Roth
 Neubauer improved Bright-line Zählkammer, 0.1 mm Tiefe, 0.0025 mm², Brand
 Thermo Scientific, Matrix Pipettierhilfe

Reagenzien

Acetonitril	Biosolve chemicals
N ^ε -Carboxymethyllysine	Iris Biotech
D-(+)-Glukose	Carl Roth, wasserfrei
	Carl Roth, ≥ 99,5%, für zellbiologische
	Anwendungen
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth, wasserfrei, ≥ 99% p.a ACS
Ethanol	Carl Roth, ≥ 96%, vergällt
Ethylendiamin	Sigma-Aldrich
FBS	Gibco
L-Glutamin-Lösung	Sigma-Aldrich, steril filtriert, 200 nM
HBSS	Sigma-Aldrich
HEPES	Sigma-Aldrich
Imidazol	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Chromasolv, > 99,9%
Kaliumchlorid	Carl Roth, ≥ 99,5% p.a
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, ≥ 99% p.a

N-Laurylsarcosin Natrium Salz	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, > 99,8%
NPPOC-dG	Sigma-Aldrich
NPPOC-dA	Sigma-Aldrich
NPPOC-dC	Sigma-Aldrich
NPPOC-dT	Sigma-Aldrich
Nutrient Mixture F-12 Ham Medium	Sigma-Aldrich, steril filtriert
Penicillin/Streptomycin-Lösung	in Sigma-Aldrich, steril, 10000 Einheiten Penicillin, 10 0,9% NaCl mg/mL Streptomycin
Trypanblau-Lösung (0,4%)	
Trypsin-EDTA-Lösung	Sigma-Aldrich, steril

Molekularbiologische Kits

Cy3-markierte random Nonamer-Primers, Tebu Bio, Offenbach, Deutschland

Fluo-4 Direct Calcium Assay Kit, Invitrogen, Life Technology, Carlsbad, USA

High Capacity cDNA Kit, Life Technology, Carlsbad, CA, USA

MasterPure Complete DNA and RNA Isolation Kit, Epicentre, Madison, WI, USA

RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland

Serotonin-sensitiver ELISA Kit, DLD Diagnostika, Hamburg, Deutschland

SuperScript III Reverse Transkription-Kit, Invitrogen, Life Technology, Carlsbad, USA

SYBR Green MasterMix, Life Technology, Carlsbad, CA, USA

qRT-PCR Primer

Die Primer wurden von VBC Biotech, Wien synthetisiert. Der RAGE-Primer wurde aus einer Primerbank entnommen und von Sigma-Aldrich, Österreich synthetisiert. Tabelle 2 zeigt die Sequenzen der Primer und die Länge des jeweiligen Amplikons.

Tabelle 2 Sequenzen der verwendeten Primer und Länge des jeweiligen Amplikons

Gen	Produktlänge (bp)	Primer (Forwards)	Primer (Reverse)
HTR1A	108	TCATCGTGGCTCTTGTCTG	CGGGGTTAAGCAGAGAGTTG
HTR1B	109	CTGGTGTGGGTCTTCTCCAT	AGAGGATGTGGTCGGTGTTT
HTR2A	144	GTTGCTTACTCGCCGATGATA	TGCCAAGATCACTTACACACAAA
TBP	130	CCCGAAACGCCGAATATAATCC	GACTGTTCTTCACTCTTGGCTC
RAGE	79	ACTACCGAGTCCGTGTCTACC	GGAACACCAGCCGTGAGTT

3.2 Zellkultur

3.2.1 Auftauen von kryopreservierten Zellen

Ein Cryoröhrchen wurde aus dem flüssigen Stickstoff entfernt und zügig bei 37°C unter ständigem Schwenken im Wasserbad aufgetaut. Um das beim Einfrieren zugesetzte, zytotoxische Dimethylsulfoxid abzutrennen, wurde die Zellsuspension in 9 mL Kultivierungsmedium transferiert und für 10 min bei 110 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, das Zellpellet in 10 mL Kultivierungsmedium mit 20 % FBS-Zusatz resuspendiert und die Zellsuspension in eine T25-Zellkulturflasche überführt. Die Zellen wurden in einer 5 % CO₂-Atmosphäre bei 37°C in einem Inkubator kultiviert.

3.2.2 Kultivierung von SH-SY5Y Zellen

Die humane Neuroblastoma-Zelllinie SH-SY5Y wurde in einer 1:1 Mischung von Ham's F-12 Nutrient Mixture und Minimum Essential Medium Eagle kultiviert. Das Medium wurde supplementiert mit 10 % FBS, 2 % L-Glutamin, 1 % Pyruvat und 1 % Penicillin/Streptomycin. Um Interaktionen von im Serum enthaltenen Proteinen mit CML zu verhindern, wurden alle Inkubationen serumfrei durchgeführt. Bei Erreichen

einer Konfluenz von 90 % wurden die Zellen abgeerntet und für Versuche ausgestreut. Zum Abernten der Zellen wurde das Medium abgesaugt, mit PBS gewaschen und Trypsin bzw. Accutase zugesetzt. Nach einer Einwirkzeit von 1-2 Minuten wurde die enzymatische Reaktion durch Zusatz von Kultivierungsmedium abgestoppt. Zur Ermittlung der Zellzahl wurde ein 20 µL Aliquot, der durch mehrmaliges auf- und abpipettieren gut vereinzelt Zellen, mit 180 µL Trypanblau (1:10 Verdünnung) versetzt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension wurde durch Multiplikation der ermittelten Zellzahl pro Großquadrat mit dem Verdünnungsfaktor und dem Zählkammerfaktor von 10,000 berechnet.

3.3 Methoden

3.3.1 Toxizitätstest mittels MTT-Assay

Beim MTT-Assay wird **Methyl-Thiazolyl-Tetrazolium** (MTT) durch die mitochondriale Succinatdehydrogenase zu einem in Kulturmedium unlöslichen Formazan umgesetzt. Die Methode dient zur Bestimmung der Proliferation und basiert auf der Umsetzung des MTT-Reagenz durch lebende Zellen [85]. Daher kann es zur Bestimmung der Vitalität herangezogen werden. Das in Abhängigkeit von der Zellaktivität gebildete Formazan [86] kann in DMSO gelöst werden und die Absorption mit einem Photometer bestimmt werden. Abbildung 12 zeigt die Umsetzung des MTT-Reagenz zu Formazan.

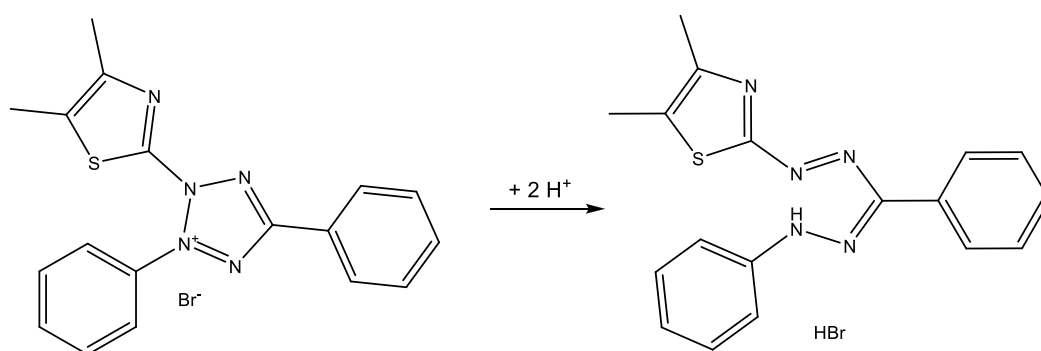


Abbildung 12 Umsetzung des MTT-Reagenzes durch Dehydrogenasen zu unlöslichem Formazan

Für den MTT-Assay wurden $8,3 \times 10^4$ Zellen/ 67 μL Medium in jedes Well einer 96-Well Platte ausgestreut. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt und mit 500 μM , 250 μM , 100 μM CML bzw. serumfreies Medium supplementiert mit 1% FBS ersetzt. Es wurde für 12, 24 bzw. 48 h mit Substanz inkubiert. Die Platte wurde für 2 min bei 800 x g zentrifugiert und das Medium abgesaugt. Pro Well wurden 100 μL MTT-Reagenz 1:6 verdünnt mit serumfreiem Medium zugesetzt und ca. 1,5 h bis zur Bildung von violetten Kristallen am Wellboden inkubiert. Anschließend wurde für 10 min bei 1000 x g zentrifugiert, das MTT-Reagenz abgesaugt und die gebildeten violetten Kristalle in 150 μL DMSO gelöst und die Absorption am Infinite M200 Plattenlesegerät bei 570 nm gemessen. Als Referenzlängenwelle wurden 650 nm gewählt.

3.3.2 Genomweites Screening der Genregulation mittels DNA-Microarray

DNA-Microarrays bieten die Möglichkeit, den Effekt einer Substanz auf eine Vielzahl von Genen gleichzeitig zu untersuchen. Auf der Oberfläche des Chips befinden sich 60mer Oligonukleotide, die Genen des ganzen Genoms entsprechen. Diese hybridisieren mit der fluoreszenzmarkierten Probe. Durch Scannen der Chips und Vergleich mit einer nicht behandelten Kontrolle können Unterschiede im

Expressionsmuster nach Behandlung mit einer Substanz analysiert werden. Um mehrere Gene gleichzeitig untersuchen zu können werden diese chemisch auf eine Glasoberfläche synthetisiert. Die Sequenzen werden dabei Base für Base aufeinanderfolgend aufgebaut. Abbildung 13 zeigt die schematisch die chemischen Vorgänge bei der Synthese.

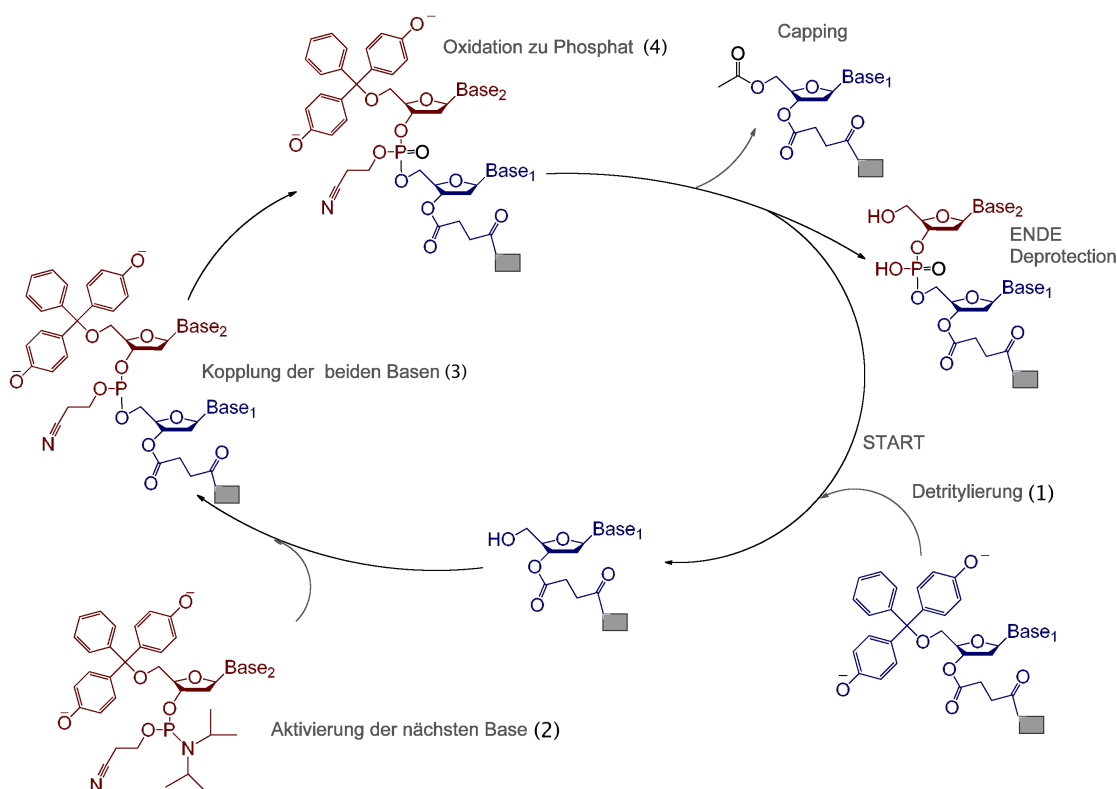


Abbildung 13 Schematische Darstellung der chemischen Vorgänge bei der Microarray-Synthese. Die Abbildung zeigt den Synthesekreislauf für das schrittweise anhängen von Basen. Es folgen Detritylierung (1), Aktivierung (2), Ankopplung der Base (3) und Oxidation (4) aufeinander. Modifizierte Darstellung nach [87].

3.3.2.1 *Synthese der Microarrays*

Die in dieser Arbeit verwendeten Microarrays wurden wie von Agbavwe et al. [87] beschrieben synthetisiert. Bei der eingesetzten Methode handelt es sich um die sogenannte „maskless“ Array-Synthese [88].

Zuerst wurde die UV-Lampe eingeschaltet und die Intensität bei 365 nm bestimmt um die Bestrahlungszeit zu berechnen, die benötigt wird um während der Synthese die NPPOC-Gruppe abzuspalten und so für die Bindung der nächsten Base zu aktivieren. Anschließend wurde ein sauberer, beschichteter Glasobjektträger in die Reaktionskammer gespannt. Die Reaktionsgefäße des Expedite wurden mit der jeweiligen Base befüllt und die zur Reaktionskammer führenden Kapillaren durch mehrmaliges spülen über den „purge“-Befehl von Luftblasen befreit. Um zu Überprüfen, ob die Reaktionskammer dicht war, wurde mehrmals mit Acetonitril gespült. Die Sequenzen und Positionen der zu synthetisieren Probes wurden am Computer in Protocol-File und Sequence-File gespeichert und auf das Gerät geladen. Nach beendeter Synthese wurden die Microarrays zum Abspalten der Schutzgruppen für 2 h in ein Ethyldiamin/Ethanol-Bad gegeben. Reste der Lösung wurden durch Waschen mit Wasser entfernt und die Arrays unter Argon getrocknet.

3.3.2.2 *Inkubation und RNA-Isolierung*

Eine Gesamtzahl von $2,5 \times 10^6$ SH-SY5Y-Zellen wurde in 35 mm Zellkulturschalen ausgestreut und für 24 h anwachsen gelassen. Dann wurden die Zellen für 3 h mit Inkubationsmedium mit oder ohne Zusatz von 50 bzw. 500 μ M CML behandelt. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, mit 500 μ L eiskaltem PBS gewaschen und RNA mittels des RNeasy Mini Kit isoliert.

RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung mittels des RNeasy Mini Kits basiert auf der selektiven Bindung von RNA an einer Silica-Membran. Im ersten Schritt werden die Zellen durch Zusatz von Guanidinium-Chlorid lysiert und dabei RNasen deaktiviert. Durch Zusatz von Ethanol

werden anschließend die optimalen Bindungsverhältnisse für RNA auf der Silica-Solid-Phase-Extraktionssäule geschaffen. Die RNA kann dann gewaschen werden und in weiterer Folge aufgereinigt mit nukleasefreiem Wasser eluiert werden.

Die Isolation erfolgte nach Anleitung des Herstellers:

- PBS Reste wurden mittels Pipette entfernt und 350 µL β-Mercaptoethanol haltiger Lysepuffer RLT zugesetzt
- der Zellrasen wurde mit der Rückseite einer Pipettenspitze von der Zellkulturschale gelöst, das Zelllysate in ein Mikrozentrifugenröhrchen transferiert und kurz gevortext
- es wurde mit einem Äquivalent 70%igem Ethanol (350 µL) versetzt, durch mehrmaliges auf- und ab-pipettieren homogenisiert, auf das RNeasy-Säulchen geladen und für 15 sec bei 8000 x g zentrifugiert
- dann wurden 700 µL des Waschpuffers RW1 zugegeben und für 15 sec bei 8000 x g zentrifugiert
- anschließend wurde 2x mit je 500 µL des Waschpuffers RPE gewaschen. Der Puffer wurde zwischen den Zentrifugationsschritten jeweils 3 min einwirken gelassen.
- im nächsten Schritt wurde das RNeasy-Säulchen für eine Minute bei voller Geschwindigkeit in der Zentrifuge getrocknet
- die RNA konnte dann durch zweimalige Elution mit je 30 µL nukleasefreiem Wasser gewonnen werden

Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration und Qualität wurden photometrisch mittels NanoQuant-Platte bestimmt. Dazu wurde die Absorption bei 230, 260 und 280 nm bestimmt. Die Software des Photometers berechnet zwei Ratios, die über die Qualität der RNA Auskunft geben:

- $A_{260/230}$ sollte zwischen 1,8 und 2,1 liegen. Ratios kleiner als 1,8 deuten auf Guanidium Chlorid-Kontamination hin, das Enzyme in weiteren Experimenten denaturieren könnte.
- $A_{260/280}$ sollte ebenfalls zwischen 1,8 und 2,1 liegen. Ratios kleiner als 1,8 deuten auf Protein-Kontamination hin.

Die Qualität der RNA wurde zusätzlich auf einem Agarose-Gel überprüft. Die durch Phosphatgruppen negativ geladene RNA wandert im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode. Um ein 1%-iges Agarose-Gel zu bereiten wurden 1,3 g Agarose in 130 mL 1xTAE-Puffer in der Mikrowelle aufgeschmolzen. Nach dem Abkühlen der Agarose-Mischung auf ca. 60°C wurden 8 µL Ethidiumbromid zugesetzt. Die Proben wurden 1:2 mit Probenpuffer versetzt, für 10 min bei 70 °C inkubiert und nach dem Abkühlen auf Eis auf das ausgehärtete Gel aufgetragen. Das Gel wurde für 80 min bei 120 V und 200 mA laufen gelassen. Anschließend wurde die RNA durch die Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids detektiert.

Reverse Transkription und Labeling

Die isolierte RNA wurde wie von Ouellet et al. [89] beschrieben in einem Schritt in cDNA umgeschrieben und mit Cy3-markiert. Dazu wurden mindestens 10 µg RNA in 4,5 µL nukleasefreiem Wasser aufgenommen und mit 12,5 µL Cy3-markierte Nonamer-Primer ($c = 1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, Tebu Bio, Offenbach, Deutschland) versetzt. Die Proben wurden für 5 min bei 70°C behandelt und vor Zugabe von 13 µL Master Mix (Tabelle 2, SuperScript III Reverse Transkription-Kit, Invitrogen, Life Technology, Carlsbad, USA) auf Eis gekühlt. Die reverse Transkription erfolgte im Thermocycler bei 25°C für 5 min und 46°C für 3h. Die Reaktion wurde durch Inkubation mit 30 µL 200 mM NaOH/ 20 mM EDTA bei 65°C für 10 min abgestoppt und die RNA abgebaut. Die basische Probenlösung wurde durch Zugabe von 60 µL 1M HEPES (pH 7,0) neutralisiert und anschließend mit Qiaquick-Säulchen laut Anleitung des Herstellers aufgereinigt um die übrigen RNA-Bruchstücke und Farbstoffreste zu entfernen. Nach der Aufreinigung der Cy3-makierten cDNA wurde diese in der SpeedVac vollständig getrocknet.

Tabelle 3 Ansatz für die reverse Transkription laut Angaben des Herstellers

Komponente	Volumen pro Probe / μL
10 x First Strand Buffer	3,0
Magnesiumchlorid	4,0
DTT (c= 100 mM)	1,0
dNTPs (c= 10 mM)	1,0
Super Script III (200 U/ μL)	3,0
RNase out (40 (U/ μL))	1,0

3.3.2.3 Hybridisierung, Waschen und Scannen

Das cDNA-Pellet wurde in 85 μL nukleasefreiem Wasser aufgenommen und mit 183 μL Hybridisierungslösung (Tabelle 3) versetzt. Nach dem Homogenisieren durch mehrmaliges auf- und ab-pipettieren wurde die Lösung in die Hybridisierungskammer pipettiert und diese durch Klebepunkte verschlossen. Der Microarray wurde zwecks Lichtschutz mit Alufolie umwickelt und bei 42°C unter konstanter Rotation inkubiert. Nach 24 h wurde der Microarray in eine mit NSWB-Puffer gefüllte Petrischale transferiert und die Hybridisierungskammer abgelöst. Dann wurde für 2 min mit NSWB-, 1 min mit SW- und 15 sec mit FW-Puffer gewaschen. Der Microarray wurde mit Argon getrocknet und die Fluoreszenz von Cy3 in einem Axon GenePix 4100A Microarray-Scanner gemessen.

Tabelle 4 Reaktionsansatz für die Microarray-Hybridisierung

Komponente	Volumen pro Probe/ μL
2x MES-Puffer	135,0
cDNA in nukleasefreiem Wasser	85,0
BSA	15,0
Eco I Qualitätskontrolle	10,0
Eco II Qualitätskontrolle	10,0
QC Qualitätskontrolle	10,0
Heringsperma DNA	3,0

3.3.3 Untersuchung der Expression ausgewählter Gene mittels qRT-PCR

3.3.3.1 Inkubation und RNA-Isolierung

2,5x10⁶ SH-SY5Y-Zellen wurden 24 h vor dem Experiment in 35 mm Zellkulturschalen ausgestreut. Anschließend wurde für 0,25, 0,5, 1, 3 bzw. 6 h mit 500 µM CML inkubiert und mRNA mittels des Masterpure Complete RNA and DNA Isolation Kits isoliert. Für Experimente mit dem Calcium-Blocker Neomycin wurde zuerst mit 100 µM Neomycin inkubiert, das Medium dann abgesaugt und anschließend für weitere 15 min mit 100 µM Neomycin und 500 µM CML co-inkubiert.

RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung mittels Masterpure Complete RNA and DNA isolation Kit basiert auf der Fällung von Nukleinsäuren mittels Isopropanol und anschließendem Verdau der genomischen DNA durch das Enzym DNase.

Die Durchführung erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers:

- das Medium wurde abgesaugt und Mediumsrückstände durch einmaliges Waschen mit 300 µL eiskaltem PBS entfernt.
- die Zellen wurden durch Zusatz von 300 µL Lysepuffer versetzt mit Proteinase K lysiert, das Zelllysate in ein Mikrozentrifugenröhrchen transferiert und bei 65°C für 15 min inkubiert. Die Mischung wurde dabei alle 5 min gevortext.
- nach 5 min kühlen im Eis, wurden 150 µL Proteinfällungsreagenz zugesetzt und für 10 sec gevortext
- Proteine und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 4°C und 10.000 x g für 10 min pelletiert.

- der Überstand wurde in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen transferiert und 500 µL Isopropanol zur Fällung der Nukleinsäuren zugesetzt
- nach homogenisieren durch 40-maliges invertieren des Reaktionsgefäßes wurden die Nukleinsäuren durch Zentrifugation bei 4°C und 10.000 x g für 10 min pelletiert.
- der Isopropanol wurde abgegossen und Rückstände mittels Pipette entfernt bevor 200 µL DNase I-Lösung zugesetzt und die mitgefällte, genomische DNA für 20 min bei 37°C verdaut wurde
- anschließend wurden 200 µL 2xLysepuffer und 200 µL Proteinfällungsreagenz zugesetzt. Nach jeder Zugabe wurde durch Vortexen homogenisiert.
- nach 5 min im Eis wurde Proteinreste bei 4°C und 10.000 x g pelletiert
- der klare Überstand wurde in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt und die RNA durch Zugabe von 500 µL Isopropanol ausgefällt.
- das nach 10 min bei 4°C und 10.000 x g entstandene Pellet wurde 2x mit Ethanol gewaschen und anschließend in 60 µL nukleasefreiem Wasser re-suspendiert.
- die gelöste RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.3.3.2 Reverse Transkription

Da in der qRT-PCR DNA als Startmaterial benötigt wird, muss die isolierte mRNA zuerst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dazu wird das Enzym reverse Transkriptase eingesetzt, dass unter anderem in Retroviren anzutreffen ist.

Zur reversen Transkription wurden 2 µg RNA in 10 µL nukleasefreiem Wasser eingesetzt. Es wurde ein Master Mix bestehend aus dem Enzym MultiScribe, Puffer, Nukleotide, Random Primer und RNase Inhibitor bereitet (Tabelle 4, High Capacity cDNA Kit, Life Technology, Carlsbad, CA, USA) und durch mehrmaliges auf- und abpipettieren homogenisiert. Nach dem vorlegen von 10 µL Master Mix in jedes Well

wurde die jeweilige RNA-Probe zugesetzt und für kurz zentrifugiert. Die Reaktion wurde im Thermocycler für 10 min bei 25°C, 120 min bei 37°C und 5 min bei 85°C behandelt. Die erhaltene cDNA wurde 1:10 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Tabelle 5 Zu pipettierende Volumina der verschiedenen Reaktionskomponenten für die reverse Transkription

Komponente	Volumen pro Probe / μL
nukleasefreies Wasser	3,2
10x Reaktionspuffer	2,0
10x Random Primer	2,0
MultiScribe reverse Transkriptase	1,0
RNase Inhibitor	1,0
25x Nukleotide	0,8

3.3.3.3 quantitative Real Time PCR

Die PCR (Polymerase Chain Reaction) dient zur quantitativen Detektion spezifischer DNA-Sequenzen. Eine typische PCR besteht aus drei Schritten, die mehrmals aufeinander folgend wiederholt werden[90]:

- Denaturierung: Denaturierung doppelsträngiger DNA zu Einzelsträngen
- Annealing: Hybridisierung des Forward- und Reverse-Primers an die komplementäre Sequenz der Template-DNA
- Elongation: DNA-Polymerase verlängert den Primer. Es entsteht ein doppelsträngiges Produkt, das dem vor dem Denaturieren vorliegenden, doppelsträngigen Template entspricht

Abbildung 14 zeigt die drei Schritte der PCR.

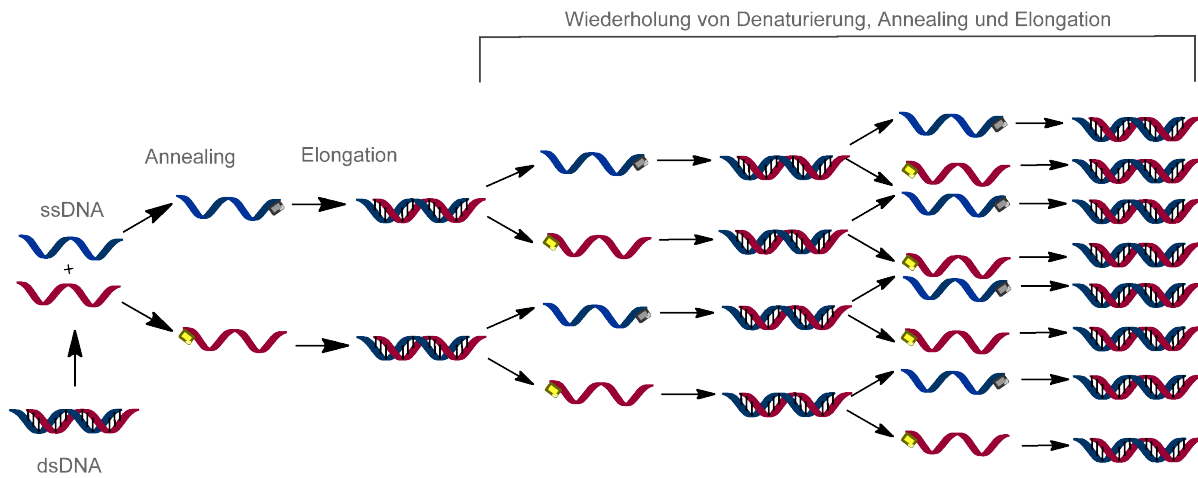


Abbildung 14 Schematische Darstellung der Schritte einer PCR.

Bei der qRT-PCR wird nach jedem Elongationsschritt detektiert. Zur Detektion kann der Fluoreszenz-Farbstoff SYBR green eingesetzt werden. SYBR green zeigt frei in Lösung nur geringe Fluoreszenz, die stark zunimmt sobald der Farbstoff an die kleine Furche doppelsträngiger DNA bindet [91]. Da die Anzahl an doppelsträngigen DNA-Molekülen nach jedem Cycle steigt, steigt auch die beobachtete Fluoreszenz. Somit kann der Verlauf der PCR in Echtzeit verfolgt werden. SYBR green bindet nicht produktspezifisch [92]. Daher wird am Ende der Amplifikation eine Schmelzkurven-Analyse durchgeführt. Die Schmelztemperatur eines Amplikons ist stark abhängig von der Größe und Basenzusammensetzung. Bei spezifischer Amplifikation sollte daher nur ein Peak beobachtet werden [92].

Zuerst wurde ein Master Mix angesetzt. Dazu wurden 2x SYBR green Master Mix (Life Technology, Carlsbad, CA, USA), Forward-, Reverse-Primer und nukleasefreies Wasser wie in Tabelle 5 beschrieben gemischt. Anschließend wurden 29,7 μL der so bereiteten Mischung in jedes Mikrozentrifugenröhrchen vorgelegt. Dazu wurden 3,3 μL der jeweiligen cDNA-Verdünnung zugefügt und durch kurzes Vortexen homogenisiert. Die

Proben wurden dann in Triplikaten zu je 10 µL auf die 96-well Platte aufgetragen. Die Platte wurde durch eine Folie versiegelt, 1 min bei 1000 rpm zentrifugiert und das PCR-Programm gestartet. Das PCR-Programm beinhaltete einen 20 sec 95°C-Schritt gefolgt von 45-Zyklen mit je 3 sec 95°C und 30 sec 60°C. Anschließend an die Amplifizierungsschritte wurde das folgende Schmelzkurven-Programm angehängt: 15 sec 95°C, 60 sec 60°C gefolgt von einem langsamen Anstieg um 0,5°C bis auf 95°C, die für weitere 15 sec gehalten wurden. Tabellen 5 zeigt die Zusammensetzung des Master Mix.

Tabelle 6 Zusammensetzung des Master Mix und Konzentration der eingesetzten Primer

Komponente	Primerkonzentration	
	200 nM (HTR1A, HTR2A,TBP)	100 nM (HTR1B, RAGE)
2x SYBR green Master Mix	515,0	515,0
Forward-Primer	10,3	5,2
Reverse-Primer	10,3	5,2
nukleasefreies Wasser	391,4	401,7

3.3.4 Messung der Serotonin-Ausschüttung mittels Serotonin-sensitivem ELISA

Bei dem zur Bestimmung der Serotonin-Ausschüttung verwendeten Kit handelt es sich um einen kompetitiven ELISA. Derivatisiertes Serotonin kompetitiert um eine festgelegte, begrenzte Anzahl an Antiserumbindungsstellen. Nach dem Erreichen des Gleichgewichts werden freies Antigen und Antigen-Antiserumkomplexe durch Waschschrte entfernt. Der gebundene Antikörper wird dann durch eine Farbreaktion detektiert (Abbildung 15). Die gemessene Intensität ist invers-proportional zur Serotoninkonzentration der Probe.

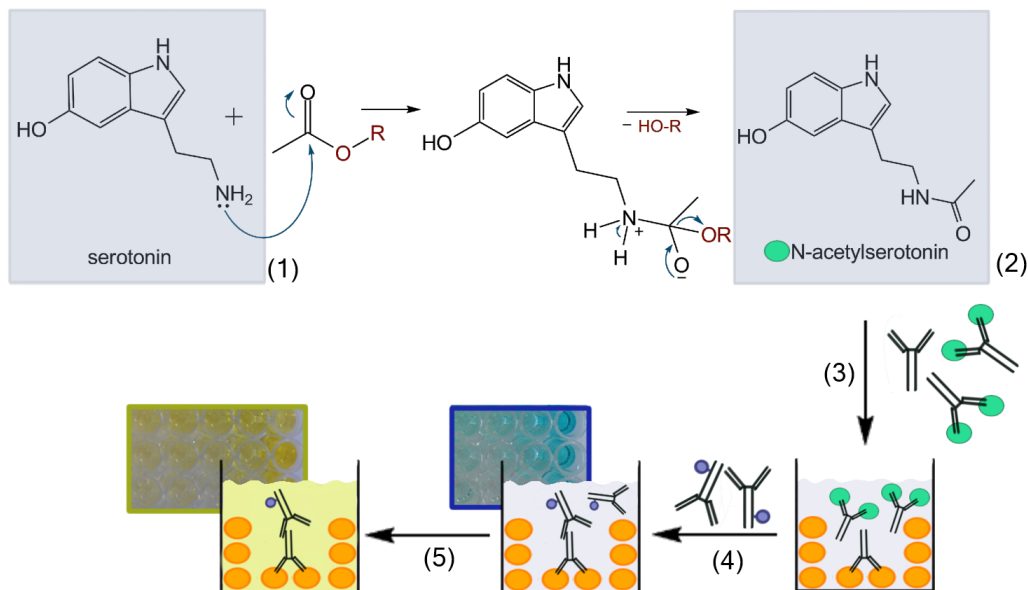


Abbildung 15 Schematische Darstellung des verwendeten ELISA. Im ersten Schritt wird Serotonin (1) zu N-Acylserotonin (2) umgesetzt. N-Acylserotonin kompetitiert um eine begrenzte Anzahl an Antiserumbindungsstellen (3). Nach einem Waschschrift wird mit einem zweiten Antikörper inkubiert (4), welcher an den ersten bindet. Durch Zugabe von Substrat kommt es zu einer Farbreaktion, die durch Säure abgestoppt wird (5). Die Intensität kann anschließend gemessen werden und zur Berechnung der Konzentration herangezogen werden.

Für dieses Experiment wurden je $1,25 \times 10^6$ SH-SY5Y Zellen 48 h vor der Inkubation in 35 mm Zellkulturschalen ausgestreut. Das Kultivierungsmedium wurde vor dem Versuch aspiriert und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde für 5 min mit unterschiedlichen Konzentrationen CML oder Krebs-Ringer-HEPES-Puffer inkubiert. Die Serotoninkonzentration im Überstand wurde mittels eines kommerziell erhältlichen Serotonin-sensitiven ELISA (DLD Diagnostika, Hamburg, Deutschland) entsprechend der Anleitung des Herstellers ermittelt. Um die erhaltenen Konzentrationen auf den Zellgehalt in der jeweiligen Zellkulturschale beziehen zu können, wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit 300 μ L Lysepuffer versetzt. Vor der Messung wurde das Zelllysats mit PBS auf ein Gesamtvolumen von

1800 µL verdünnt, durch mehrmaliges auf- und abpipettieren homogenisiert und die Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen.

3.3.5 Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Mobilisierung

Die Bestimmung der intrazellulären Calcium-Mobilisierung beruht auf der fluorimetrischen Messung mittels des Fluoreszenzfarbstoffs Fluo-4. Fluo-4 ist ein besonders für die Messung von Calcium-Signalen über einen Zeitverlauf geeignet [93]. Weiters zeigt es eine hohe Rate der Zellpermeation und ist einem großen dynamischen Bereich einsetzbar [94].

Die intrazelluläre Ca^{2+} -Mobilisierung wurde mittels des kommerziell erhältlichen Fluo-4 Direct Calcium Assay Kits bestimmt. Dazu wurden je 75,000 SH-SY5Y Zellen pro Well in eine 96-Well Platte ausgestreut und für 48 h anwachsen gelassen. Die Zellen wurden 1 h vor Inkubation mit Fluo-4 auf serumfreies Medium umgestellt. Nach der Zugabe von Fluo-4 wurde für 30 min bei 37°C und anschließend weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden direkt vor der Messung mit HBSS oder verschiedenen Konzentrationen an CML stimuliert. Die Substanz- bzw. Pufferzugabe erfolgte über die Injektoren des Tecan Infinite Plattenlesegeräts. Die Fluoreszenz bei 520 nm wurde nach einer Anregung bei 490 nm alle zwei Sekunden für 1,5 min gemessen.

3.3.6 Statistische Auswertung der Experimente

Auswertung des Toxizitätstest

Die Rohdaten des MTT-Tests wurden auf den Mittelwert der Kontrolle bezogen und in Prozent angegeben. Ausreißer wurden mittels Nalimov-Test ermittelt und vom Datensatz ausgeschlossen. Statistische Signifikanz wurde mittels zweifaktorieller Varianzanalyse mit anschließendem Holm-Sidak post hoc Test bestimmt und markiert mit mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) oder *** ($p < 0,001$).

Auswertung der Microarrays

Die Microarray-Scans wurden in NimbleGen 2.1 geladen und manuell aligned. Mit Hilfe der gleichen Software wurden Probe-Reports erstellt und diese mittels der Robust Multiarray Analysis (RMA) Funktion normalisiert. Die Fluoreszenz wurde zusätzlich mit dem Mittelwert fünf nicht-regulierter Gene (HPRT, MRPL, NSE, TBP, UBC) normalisiert. Anschließend wurde durch beziehen auf die Kontrolle die x-fache Änderung berechnet. Probes mit einer x-fachen Änderung über 1,2 bzw. unter 0,8 wurden selektiert und mittels der Pathway-Analyse Software DAVID näher untersucht und mit der Software Panther nach molekularer Funktion geordnet. Die von DAVID erstellten Annotation Cluster mit einem Anreicherungsfaktor über 1,3 wurden als Kandidaten für weitere Untersuchungen herangezogen [95]. Zusätzlich wurde mittels der freizugänglichen Software R eine Heatmap erstellt.

Um die Reaktion einzelner Probes für ein Gen darzustellen wurden die die normalisierten Fluoreszenzdaten jeder Probe der drei biologischen Replikate gemittelt und die Standardabweichung berechnet. Sofern eine Regulation nach unten festgestellt wurde, wurde der Kehrwert gebildet um hinauf- und hinunter-regulierte Probes im gleichen Maßstab zu zeigen. Nicht regulierte Probes, mit einer x-fachen Änderung von 1,0 befinden sich im Ursprung der Darstellung, hinunter-regulierte nach links zeigend und hinauf-regulierte nach rechts zeigend.

Auswertung der PCR-Daten

PCR-Daten, die aus den Amplifikationsdaten mittels LinRegPCR v.2012.2 berechnet wurden [96, 97], wurden auf TBP als nicht reguliertes Referenzgen bezogen [98, 99]. Die normalisierten Werte wurden auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrolle bezogen und als x-fache Änderung im Bezug zu dieser angegeben. Die Daten wurden nicht auf Ausreißer getestet. Statistische Signifikanz wurde mittels zweifaktorieller Varianzanalyse mit anschließendem Holm-Sidak post hoc Test bestimmt und markiert mit mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) oder *** ($p < 0,001$).

Auswertung des Serotonin-ELISA

Die gemessenen Absorptionen wurden in die aus der Standard-Reihe erhaltene Regressionsgleichung eingesetzt und so die jeweilige Serotonin-Konzentration ermittelt. Die berechnete Serotonin-Konzentration wurde durch Division durch die gemessene DNA-Konzentration auf die Zellmenge in der jeweiligen Kulturschale normalisiert. Die normalisierten Probenkonzentrationen wurden auf den Mittelwert der Kontrolle bezogen und in % angegeben. Ausreißer wurden mittels Nalimov-Test ermittelt und vom Datensatz exkludiert. Statistische Signifikanz wurde mittels Student's t-Test bestimmt und gekennzeichnet mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) oder *** ($p < 0,001$).

Auswertung der intrazellulären Calcium-Mobilisierung

Die gemessenen Absorptionen wurden gegen die Zeit aufgetragen und die Fläche unter Kurve (AUC) mittels SigmaPlot 11 bestimmt. Die ermittelte Fläche wurde auf die Kontrolle bezogen und in % angegeben. Ausreißer wurden mittels Nalimov-Test bestimmt und vom Datensatz entfernt. Statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA gegen die Kontrolle mit anschließendem Holm-Sidak post hoc Test und gekennzeichnet mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) oder *** ($p < 0,001$).

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Zytotoxizitätsbestimmung mittels MTT

Die Zytotoxizität von CML wurde mittels MTT-Assay untersucht. Die Ergebnisse nach Inkubation mit 100 – 500 μM CML für 12 – 48 Stunden sind in Abbildung 16 dargestellt.

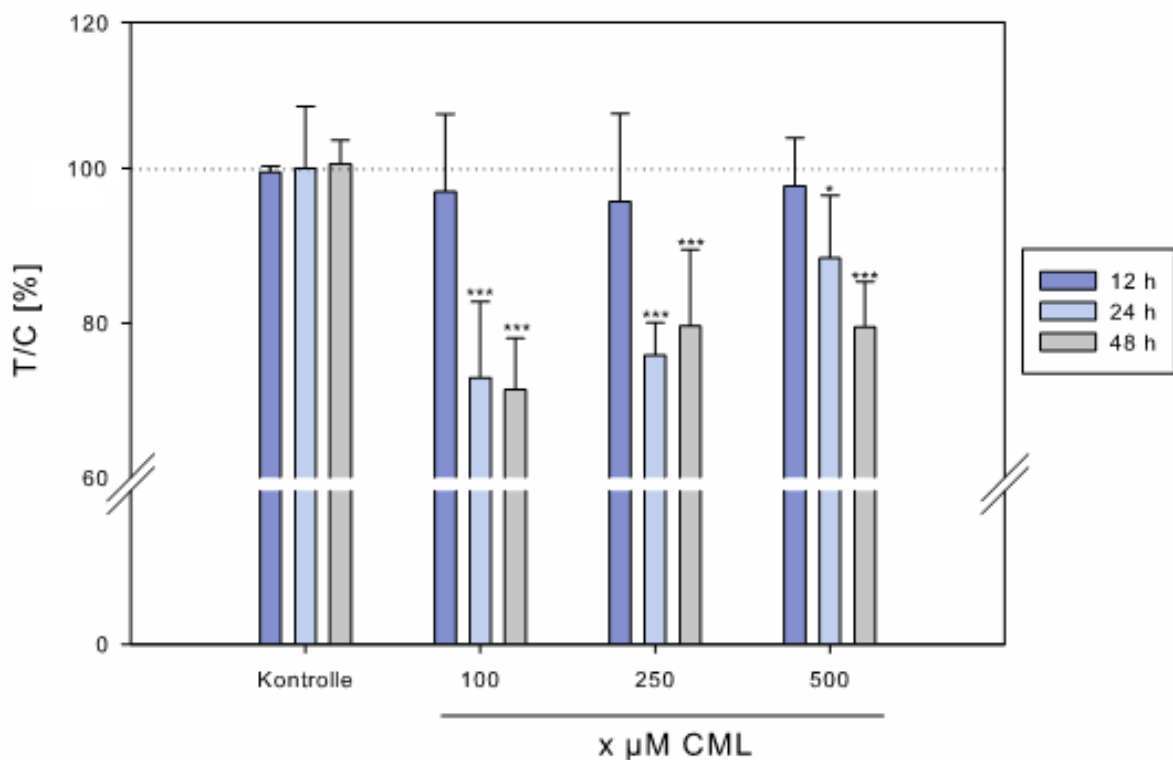


Abbildung 16 Graphische Darstellung der MTT-Ergebnisse. SH-SY5Y Zellen wurden für 12, 24 oder 48 h mit 100-500 μM CML oder serumfreiem Kultivierungsmedium inkubiert. Ergebnisse sind bezogen auf die Kontrolle (T/C) als Mittelwert mit zugehöriger Standardabweichung dargestellt ($n=2$, $tr=2-3$). Statistische Signifikanz wurde mittels zweifaktorieller Varianzanalyse getestet und markiert mit * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$) oder *** ($p<0,001$)

Nach Behandlung von SH-SY5Y Zellen für 12 h zeigte sich für keine der getesteten Konzentrationen ein zytotoxischer Effekt ($p > 0,05$ vs. Kontrolle=100%). Inkubation mit 100, 250 oder 500 μM CML für 24 h führte zu signifikanter Verringerung der Zellaktivität. Es wurden Werte von $72,9 \pm 9,8 \%$ ($p < 0,001$ vs. Kontrolle=100%), $75,8 \pm 4,2 \%$ ($p < 0,001$ vs. Kontrolle=100%) bzw. $88,4 \pm 8,1 \%$ ($p = 0,018$ vs. Kontrolle ermittelt. CML-Inkubation für 48 h zeigte ähnliche Effekte mit Werten von $71,4 \pm 6,7 \%$ ($p < 0,001$ vs. Kontrolle=100%), $79,6 \pm 9,9 \%$ ($p < 0,001$ vs. Kontrolle=100%) bzw. $79,4 \pm 5,8 \%$ ($p < 0,001$ vs. Kontrolle=100%).

4.2 DNA-Microarrays zur Ermittlung des Einflusses von CML auf die Genregulation von SH-SY5Y Zellen

4.2.1 Bestimmung der RNA-Qualität

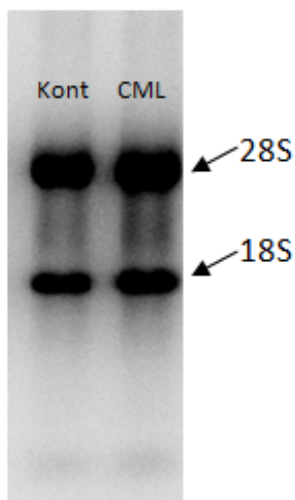


Abbildung 17 Auftrennung der isolierten RNA im Agarose-Gel

Die Reinheitsgrad und Integrität der isolierten RNA wurde photometrisch und mittels Agarose-Gelelektrophorese bestimmt. Abbildung 17 zeigt beispielhaft die Integrität der isolierten RNA. Bei intakter RNA sollte ein Verhältnis von 2:1 zwischen 28S und 18S rRNA-Banden bestehen. Das mittels Image J ermittelte Verhältnis für die isolierte RNA lag zwischen 2,0:1 – 2,2:1. Weiters sind zwei distinkte Banden am Gel sichtbar. Bei degradierter RNA würde man hingegen in der unteren Region des Gels eine breite, undefinierte Bande sehen.

4.2.2 DNA-Microarray Analyse und Pathway-Analyse

Die Plasmakonzentration an N^E-Carboxymethyllysine im gesunden Menschen liegt bei 2,6 µM [37, 100]. Deutlich höhere Plasmakonzentrationen konnten im Zusammenhang mit diversen Krankheiten, beispielsweise Diabetes mellitus [37], nachgewiesen werden. Bei Patienten mit Diabetes mellitus mit reduzierter Nierenfunktion wurden Plasmakonzentrationen von bis zu 12 µM erfasst [38]. Studien zur Akkumulation von CML haben gezeigt, dass CML in diversen Geweben, unter Anderem in hippocampalen Neuronen, mit zunehmendem Alter akkumuliert [101]. Da Studien zur Akkumulation von CML auf immunologischen Färbungen basieren sind derzeit nur qualitative Daten vorhanden [101]. Basierend auf einer Akkumulation von CML im humanen Körper, wurde daher für erste Experimente eine Konzentration von 50 µM CML gewählt.

Drei junge Passagen (P11-P12) und drei ältere Passagen (P18-P19) SH-SY5Y-Zellen wurden für 3 h mit 50 µM CML oder Kontrollmedium inkubiert. Abbildung 18 zeigt Scatterplots für P11-12 (Abbildung 18 A) und P18-P19 (Abbildung 18 B).

Die Scatterplots zeigen die log₂ Fluoreszenzintensitäten der jeweiligen Probe nach Behandlung mit CML und Medium gegeneinander aufgetragen. Die Diagonale entspricht daher einer x-fachen Änderung von 1,0 und somit durch CML unveränderte Expression. Die beiden grünen Linien entsprechen einer x-fachen Änderung von 2,0. Daraus geht hervor, dass eine Behandlung mit 50 µM CML nach 3 h geringe Effekte auf die Genregulation von SH-SY5Y-Zellen zeigt. Da sich keine Unterschiede zwischen jungen und älteren Passagen zeigten, wurde der Mittelwert aus den 6 biologischen Replikation gebildet.

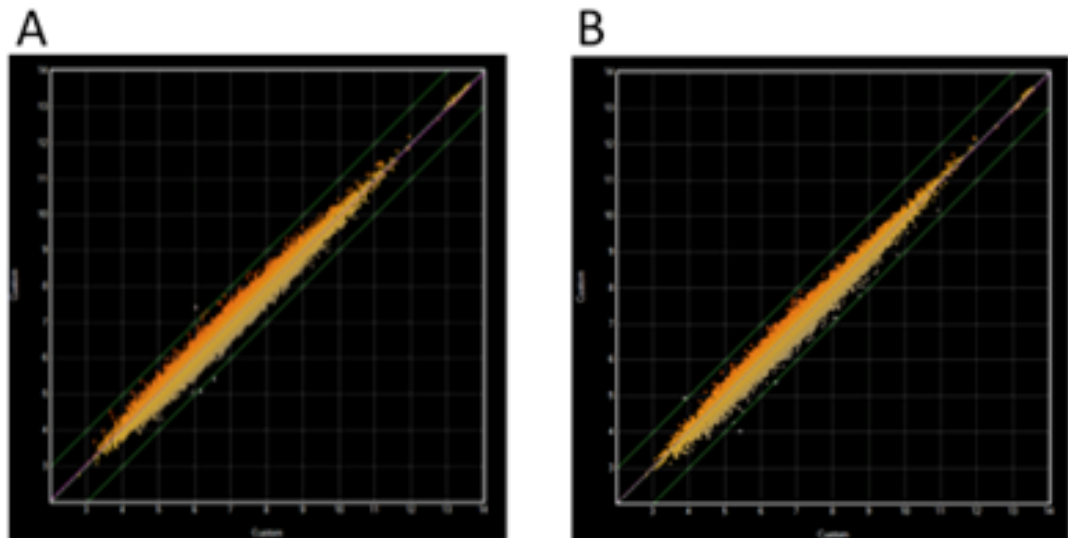


Abbildung 18 Scatterplot der log2 Fluoreszenzintensitäten nach Inkubation von SH-SY5Y Zellen (P11-P12 A; P18-P19 B) mit 50 μM CML für 3 h. Die Diagonale repräsentiert ein gleiches Maß an Expression in den Kontrollzellen und nach CML-Behandlung (n=3).

Im nächsten Versuch wurde eine 10-fach höhere CML-Konzentration, nämlich 500 μM , gewählt. Abbildung 19 zeigt Scatterplots der log2 transformierten Fluoreszenzintensitäten nach Inkubation mit 50 μM oder 500 μM CML.

Der Scatterplot der Daten nach Behandlung mit 50 μM CML ist deutlich schmaler, als jener, der nach Behandlung mit 500 μM CML erhalten wurde. Dies lässt sich auch in einer Heatmap (Abbildung 20) für eine Selektion an Genen zeigen.

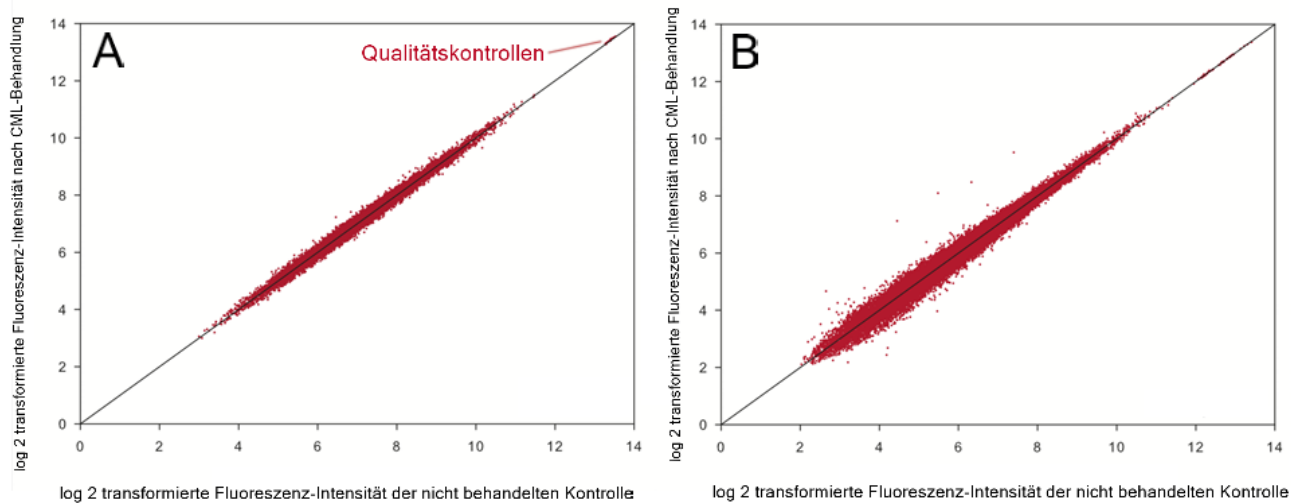


Abbildung 19 Scatterplot der log₂ Fluoreszenzintensitäten nach Inkubation von SH-SY5Y Zellen mit 50 µM (A, n=6) bzw. 500 µM CML (B, n=3) für 3 h. Die Diagonale repräsentiert ein gleiches Maß an Expression in den Kontrollzellen und nach CML-Behandlung, wie am Beispiel der Qualitätskontrollen erkenntlich.

Zusätzlich, ermöglicht die Darstellung in Form einer Heatmap den direkten Vergleich der Reaktion verschiedener Probes für ein Gen und der drei biologischen Replikate für beide Konzentrationen. Eine Erhöhung der eingesetzten Konzentration um den Faktor 10 führte zu ausgeprägteren Effekten auf die Genregulation.

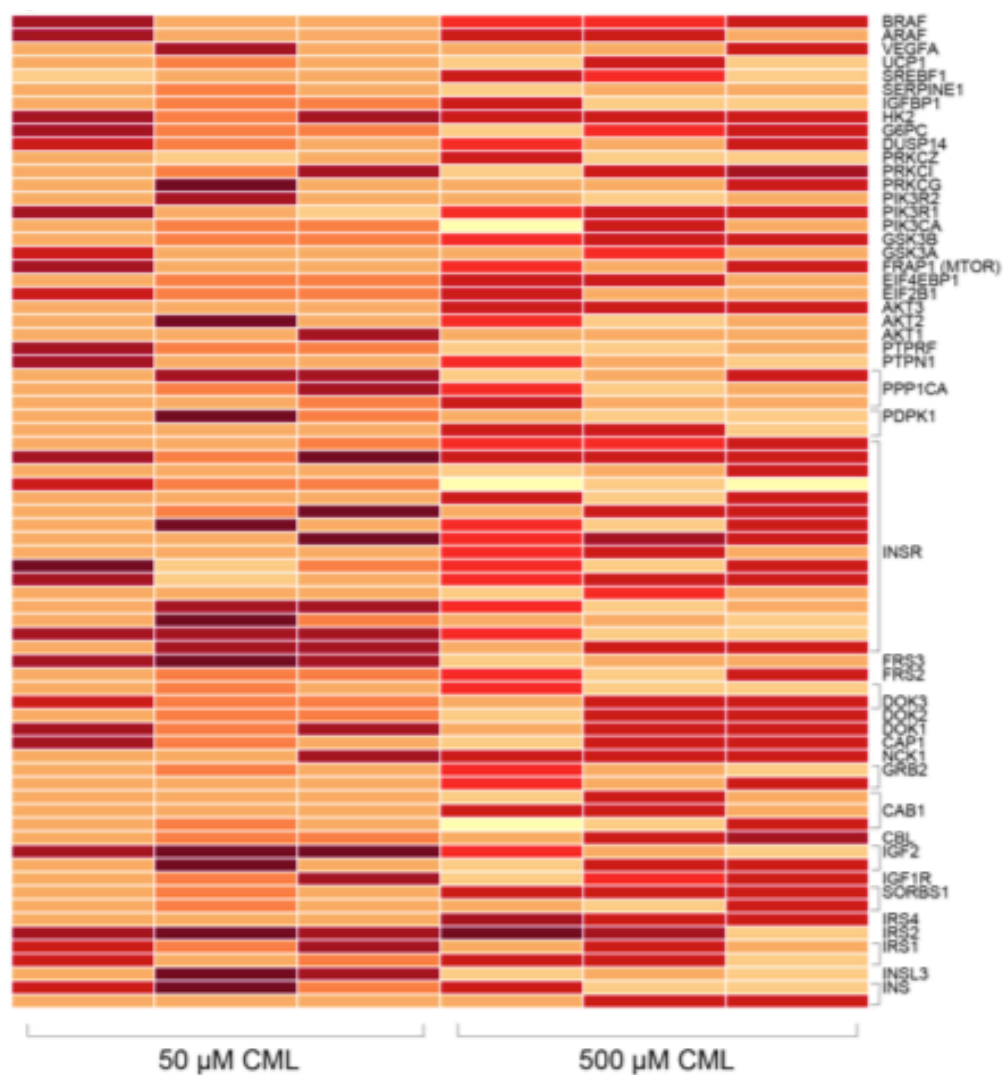


Abbildung 20 Graphische Darstellung der Microarray-Ergebnisse in Form einer Heatmap. Die Heatmap zeigt eine Auswahl an Genen nach Behandlung mit 50 μ M bzw. 500 μ M CML (n=3). Gelb entspricht dabei einer x-fachen Änderung unter 1,0, orange einer x-fachen Änderung von 1,0 und rot über 1,0 und somit einer verstärkten Expression nach CML-Behandlung.

Dies spiegelt sich in der Gesamtzahl der regulierten Probes wieder: Die x-fache Änderung von 143 Probes wurde durch Inkubation mit 50 μ M auf mindestens 1,2 hinauf- oder herunter-reguliert während Inkubation mit 500 μ M CML auf 413 Probes

wirkte. In dieser Studie wurde eine x-fache Änderung von mindestens als Ausschlusskriterium 1,2 gewählt, da diese häufig für Microarray-Daten benutzt wird [102]. Aufgrund des stärkeren Effekts von 500 µM CML, wurde diese Konzentration für weitere Untersuchungen gewählt.

Die durch 500 µM CML differentiell exprimierten Probes wurden mittels der Clustering Software Panther nach molekularer Funktion geordnet. Das Tortendiagramm in Abbildung 21 zeigt die dabei identifizierten molekularen Funktionen, auf die CML möglicherweise Einfluss haben könnte. Die Mehrheit der eingegeben Probes entfällt auf die Kategorien Bindung, katalytische Aktivität und Rezeptoraktivität.

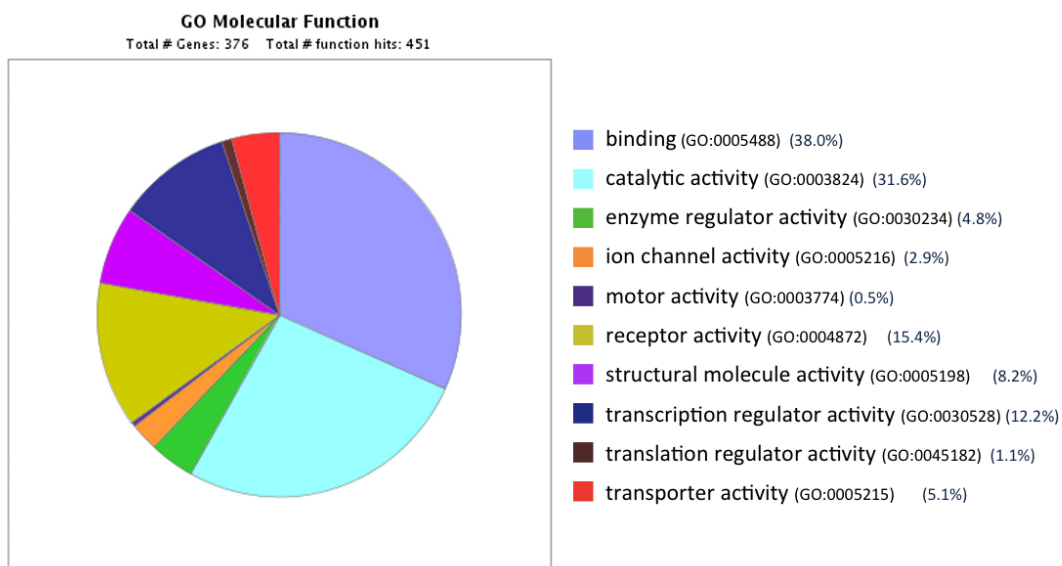


Abbildung 21 Durch Panther erstellte Aufteilung der durch CML differentiell exprimierten Probes auf verschiedene molekulare Funktionen.

In weiterer Folge wurden die 413 differentiell exprimierten Probes in die Signalweg-Analyse Software DAVID eingegeben. DAVID ist ein freizugängliches Online-Tool, welches die Zuordnung biologischer Funktionen in großen Genlisten dient [95]. Das gewählte Werkzeug „Functional Annotation Clustering“ erstellt Gruppen, die Gene mit zusammenhängenden Funktionen umschließt [95]. Die erstellten Gruppen bekommen einen Anreicherungssterm zugewiesen. Gruppen, die einen Anreicherungssterm über 1,3 erhalten haben, könnten für weitere Untersuchung interessante Gene beinhalten [95].

Insgesamt wurden durch DAVID 152 Cluster identifiziert. Die ersten beiden Cluster mit einem Anreicherungssterm von 3,9 bzw. 2,6 zeigen, ähnlich wie Panther, eine Wirkung von CML auf die Rezeptoraktivität der neuronalen Zelllinie SH-SY5Y auf. Bei näherer Betrachtung, ist zu erkennen, dass vorwiegend Serotonin-Rezeptoren in diese Cluster fallen (Abbildung 22). Daher wurden die für Serotonin-Rezeptoren HTR1A, HTR2A und HTR1B spezifischen Probes des Microarrays genauer analysiert.

Die hypothalamische Ausschüttung von Serotonin ist ein wichtiges Sättigungssignal [103]. Zwischen der Serotoninkonzentration im Gehirn und Nahrungsaufnahme wurde ein inverser Zusammenhang etabliert [53]. Von den 14 bekannten Serotonin-Rezeptoren wurde für einige ein Einfluss auf die Sättigung gezeigt. In dieser Arbeit wurden Serotonin-Rezeptoren HTR1A, HTR2A und HTR1B näher untersucht, da für diese bereits eine Verbindung mit der Regulation der Sättigung gezeigt wurde. Der Serotonin-Rezeptor HTR1A kontrolliert die Serotonin-Ausschüttung. Die Aktivierung dieses Rezeptorsubtyps führt zu einer Steigerung der Nahrungsaufnahme [69, 72]. Im Gegensatz dazu wurde für die Serotonin-Rezeptoren HTR1B, HTR2A und 5HTR2C gezeigt, dass diese bei Aktivierung die Nahrungsaufnahme reduzieren [70, 71, 73]. Der Serotonin-Rezeptor 5HTR2C wurde nicht ausgewählt, da dieser in SH-SY5Y Zellen nicht detektiert werden konnte.

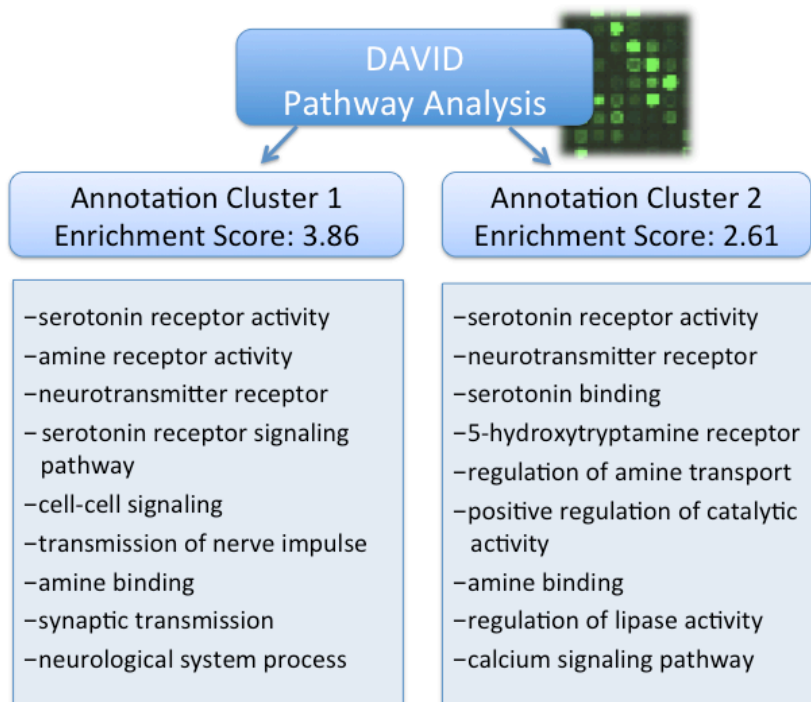


Abbildung 22 Auszug aus den von DAVID erstellten Annotation Clusters für die 413 eingegebenen durch Inkubation mit 500 μ M CML für 3 h differentiell regulierten Microarray-Probes

Abbildung 23 veranschaulicht die Regulation der 19 verschiedenen Microarray-Probes für den Serotonin-Rezeptor HTR2A. Dies zeigt, dass die Reaktion der Probes nicht einheitlich ist. Von diesen 19 Probes bewegt sich die Mehrheit zwischen einer x-fachen Änderung von 1.0 – 1.1 +/- . Zwei Probes zeigen eine starke Regulation nach oben. Für HTR1A wurde ein ähnliches Verhalten beobachtet. Hier wurden 64 % der Probes hinauf-reguliert.

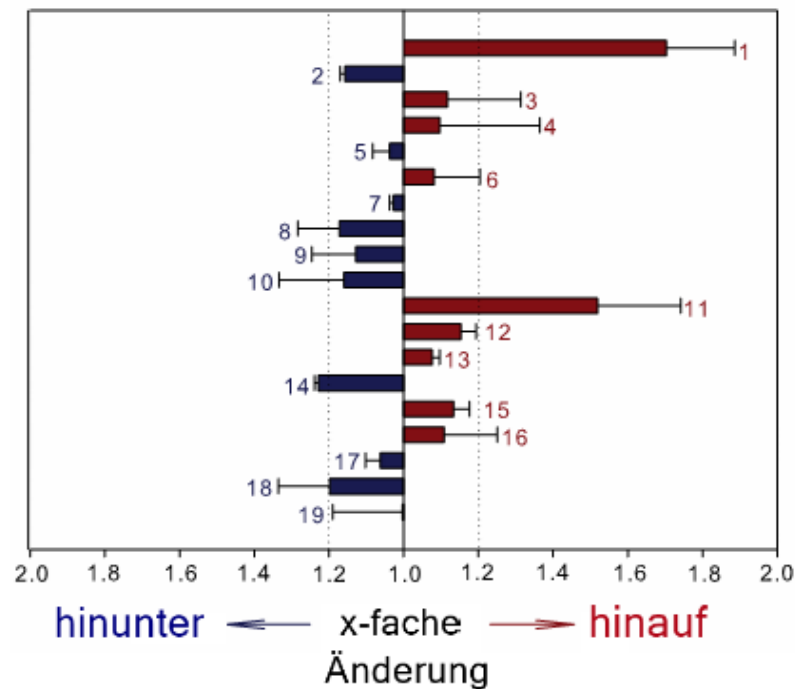


Abbildung 23 Graphische Repräsentation der 19 Microarray-Probes für HTR2A nach Inkubation mit 500 μ M CML für 3 h. Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert der x-fachen Änderung $\pm$ SEM (n=2-3).

4.3 Einfluss von CML auf Genexpression von HTR2A, HTR1A und HTR1B

Um die Ergebnisse des DNA-Microarrays zu verifizieren, wurde die Expression der Serotonin-Rezeptoren HTR2A, HTR1A und HTR1B mittels qRT-PCR untersucht. Nach Inkubation mit 500 μ M CML für 3 h wurden entsprechend dem Microarray der sättigungsvermittelnde Rezeptor HTR2A und der Autorezeptor HTR1A signifikant hinauf-reguliert mit x-fachen Änderungen von $4,12 \pm 0,53$ ($p < 0,001$ vs. Kontrolle=1) bzw. $3,58 \pm 0,53$ ($p < 0,001$ vs. Kontrolle=1). Serotonin-Rezeptor HTR1B wurde ebenfalls hinauf-reguliert und erreichte nach 3 h ein Maximum von $4,82 \pm 1,07$ ($p < 0,001$ vs. Kontrolle=1). Damit zeigen die Ergebnisse der PCR, ähnlich wie die des Microarrays, eine Regulation dieser Serotonin-Rezeptoren, die in die Regulation von Hunger und Sättigung involviert sind [69-73]. Die in der qRT-PCR erhaltenen Effekte sind deutlich

stärker, als jene, die im Microarray gezeigt wurden. Dies könnte drauf zurückzuführen sein, dass die qRT-PCR eine sensitivere Methode ist [104, 105], wodurch kleine Unterschiede in der Expression leichter feststellbar sind. In einer Studie, die die Expression 48 humaner Gene mittels Microarray und qRT-PCR vergleicht, wurde gezeigt, dass die Korrelation zwischen Daten der beiden Techniken mit einem Korrelationskoeffizienten r von 0.89 zwar hoch ist, aber bei RMA normalisierten Daten für 13 % der Gene eine schwache Korrelation beobachtet wurde [106]. Ähnlich wurden bei einer Studie, die die Effekte der Hypoxie bei der Geburt auf die Genexpression der Nebennieren sieben Tage alter Ratten untersucht, Microarray und qRT-PCR eingesetzt [104]. Dabei war die Expression einiger Gene gut zwischen Microarray und qRT-PCR vergleichbar, für einige wurden allerdings auch gegenteilige Effekte beobachtet. Drei der zwölf gewählten Gene zeigten in dieser Studie zwischen Microarray und qRT-PCR keine übereinstimmenden Ergebnisse. Das Gen *Cpt2*, welches für Carnitin-Palmitoyltransferase II codiert, wurde beim Microarray-Versuch durch Hypoxie hinauf-reguliert während die qRT-PCR Ergebnisse eine Senkung des mRNA-Levels und damit das Gegenteil des Microarray-Ergebnisses zeigten. Die Autoren der Studie führen diese Unterschiede auf die geringere Sensitivität des Microarrays und das geringe Ausmaß der Expression der betroffenen Gene zurück.

Zusätzlich zu der dem Microarray entsprechenden 3 h Inkubation wurde die Expression der Serotonin-Rezeptoren auf ihre Zeitabhängigkeit untersucht. Dazu wurde die Rezeptor-Expression nach Inkubation mit 500 μ M CML für 0,25, 0,5, 1 und 6 h untersucht.

HTR1A, HTR2A und HTR1B wurden nach Inkubation mit 500 μ M CML für 0,25 h hinauf-reguliert mit x -fachen Änderungen von $2,75 \pm 1,17$ ($p < 0,001$ vs. Kontrolle=1), $3,45 \pm 2,51$ ($p < 0,001$ vs. Kontrolle=1) bzw. $3,08 \pm 1,91$ ($p < 0,001$ vs. Kontrolle=1). Nach 6 h erreichte die Expression der drei Rezeptoren ihr jeweiliges Minimum (Abbildung 24). Dieses Expressionsmuster entspricht einer Regulation, die eine Gegenregulation zur Folge hat. Dieses Phänomen wurde in mehreren Studien im Zusammenhang mit

zeitabhängigen Genexpressionsversuchen gezeigt [107, 108]. Die Ergebnisse der zeitabhängigen qRT-PCR Experimente zeigen einen Einfluss von CML auf das Serotonin-System auf regulatorischer Ebene.

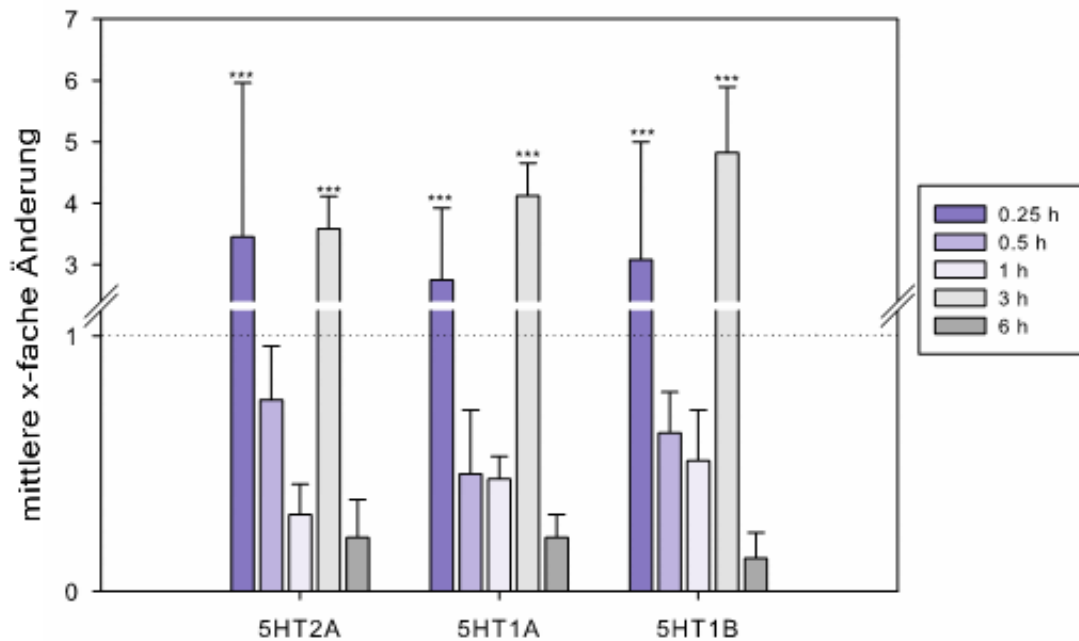


Abbildung 24 Serotonin-Rezeptor Expression nach Inkubation mit 500 μ M CML für 0,25 – 6 h. Ergebnisse sind dargestellt als mittlere x-fache Änderung bezogen auf die Kontrolle (n=3, tr=2-3). Statistische Signifikanz wurde mittels zweifaktorieller Varianzanalyse mit anschließendem Holm-Sidak post hoc Test getestet und markiert mit * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$) oder *** ($p<0,001$)

4.4 Einfluss von CML auf die Serotonin-Ausschüttung

Um zu untersuchen, ob N^ε-Carboxymethyllysine auf funktioneller Ebene Einfluss auf das Serotonin-System nimmt, wurde die Serotonin-Ausschüttung gemessen.

Die Serotonin-Ausschüttung wurde mittels des kommerziell erhältlichen ELISA-Kits (Serotonin-sensitiver ELISA Kit, DLD Diagnostika, Hamburg, Deutschland) untersucht. Dazu wurden SH-SY5Y-Zellen mit CML in Konzentrationen von 0,05 – 500 μ M oder Krebs-Ringer-HEPES-Puffer ohne CML als Kontrolle behandelt. Dabei konnte gezeigt

werden, dass der Zusatz von 500 μM CML zu einer signifikanten Steigerung von $44 \pm 39\%$ ($p=0,040$) in der Serotonin-Ausschüttung führt (Abbildung 25).

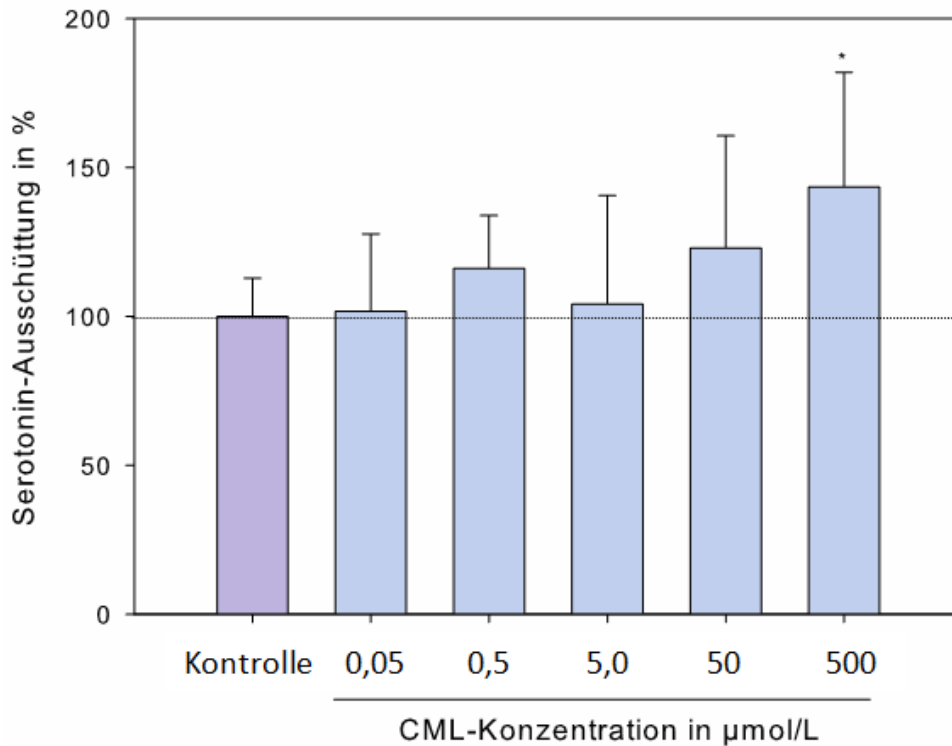


Abbildung 25 Serotonin-Ausschüttung nach fünfminütiger Stimulierung mit unterschiedlichen CML-Konzentrationen (0,05 – 500 μM). Ergebnisse sind dargestellt bezogen auf die Kontrolle (%) ($n=3$, $tr=2$). Signifikanz wurde ermittelt mittels Student's t-Test und gekennzeichnet mit * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$) oder *** ($p<0,001$).

Somit wurde erstmals ein Einfluss von CML auf das Serotonin-System der humanen Neuroblastoma-Zelllinie SH-SY5Y nicht nur auf genetischer, sondern auch auf funktioneller Ebene gezeigt.

Dies bestätigt auch eine Studie an der in der Maillard-Reaktion aus Glukose und Leucin gebildeten, in Brotkruste vorkommenden, Verbindung 3-Methylbutanal. Diese Studie hat gezeigt, dass sie in verschiedenen Konzentrationen die Serotonin-Konzentration im Gehirn von Ratten steigert bzw. ein schlafähnliches Verhalten auslöst [109]. Eine

Injektion von 30 mg/kg 3-Methylbutanal führte zu erhöhten Serotonin-Konzentrationen im Gehirn der Tiere. Eine höhere Dosis von 120 mg/kg hingegen löste ein schlafähnliches Verhalten aus.

4.5 Einfluss von CML auf die intrazelluläre Calcium-Mobilisierung

Calcium-Ionen spielen in der Zelle häufig als sekundärer Botenstoff eine Rolle und sind unter anderem in die Neurotransmitter-Ausschüttung involviert [60, 61]. Für die Ausschüttung von Neurotransmittern ist die intrazelluläre Calcium-Konzentration von Bedeutung. Ein intrazellulärer Anstieg der Calcium-Konzentration führt zur Serotonin-Exocytose aus den synaptischen Vesikeln der präsynaptischen Membran in den extraneuronalen synaptischen Raum [59, 60].

Da Inkubation mit 500 μ M CML sowohl die Genexpression der Serotonin-Rezeptoren *HTR2A*, *HTR1A* und *HTR1B*, als auch die Serotonin-Ausschüttung in SH-SY5Y-Zellen beeinflusste, wurden die Effekte von CML auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Mobilisierung untersucht. SH-SY5Y-Zellen wurden mit CML in Konzentrationen von 0.05 – 500 μ M stimuliert. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Mobilisierung wurde nach der Behandlung mit allen getesteten Konzentrationen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen signifikant erhöht. Die höchste eingesetzte Konzentration, 500 μ M, führte zu einer Steigerung der Ca^{2+} -Mobilisierung von 56 ± 14 % ($p=0,005$ vs. Kontrolle=100%). Für 50 μ M, 5 μ M und 0,5 μ M CML wurden Erhöhungen in der intrazellulären Ca^{2+} -Mobilisierung von 72 ± 33 % ($p<0,001$ vs. Kontrolle=100%), 50 ± 21 % ($p=0,006$ vs. Kontrolle=100%) und 67 ± 43 % ($p<0,001$ vs. Kontrolle=100%) ermittelt (Abbildung 26).

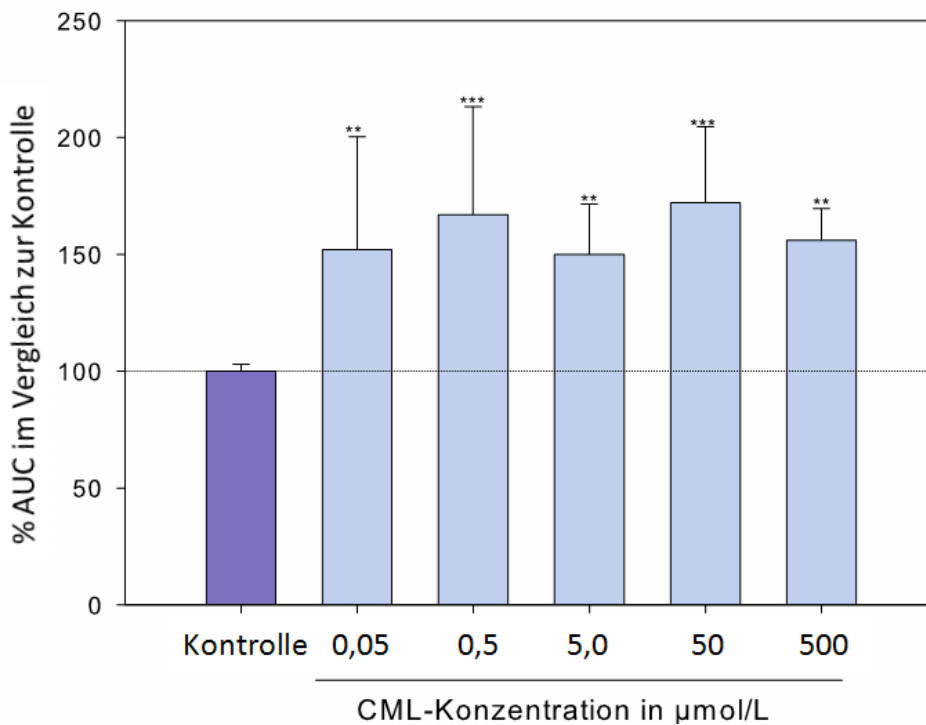


Abbildung 26 Intrazelluläre Ca^{2+} -Mobilisierung nach Stimulierung mit unterschiedlichen Konzentrationen an CML (0,05 – 500 µM). Ergebnisse sind dargestellt als Fläche unter der Kurve (% AUC) bezogen auf die Kontrolle (stimuliert mit HBSS) (n=3, tr=2-6). Signifikanz wurde ermittelt mittels ANOVA gegen die Kontrolle (Kontrolle=100%) mit anschließendem Holm-Sidak post hoc Test und gekennzeichnet mit * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$) oder *** ($p<0,001$).

In einigen Studien wurden die Effekte von AGEs auf cytosolisches Calcium von glatten Muskelzellen der Aorta untersucht. Eine Studie an Ratten hat gezeigt, dass AGEs die mit einer Erhöhung an cytosolischem, freiem Calcium verbundene Proliferation dieser Zellen stimuliert [110]. Eine weitere Studie zu Ca^{2+} -vermittelten Signalwegen und intrazellulärem Ca^{2+} wurde unter anderem mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2-AM an Endothelzellen der Rinderaorta durchgeführt [111]. Diese Studie zeigte, dass AGEs eine akute Depletion des Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern induzieren können [111]. Weiters wurde in der Studie die Hypothese aufgestellt, dass der Mechanismus die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies durch NAD(P)H Oxidase und eine

mögliche Aktivierung des IP₃-Rezeptors involviert [111]. Als Haupt-AGE wurde in dieser Studie CML identifiziert [111].

4.6 Einfluss von CML auf die Genexpression von RAGE

Das Maillard-Reaktionsprodukt N^ε-Carboxymethyllysin ist ein gut charakterisierter RAGE-Ligand [112]. In einer Studie, die den Einfluss von AGEs auf Glukoseverwendung und ATP-Level in SH-SY5Y-Zellen untersucht, wurde unter anderem die RAGE-Expression gemessen und somit gezeigt, dass diese Zellen den Rezeptor endogen in detektierbaren Mengen exprimieren [113].

Um den Einfluss von CML auf RAGE in dieser Zelllinie zu untersuchen, wurde die Expression des Rezeptors nach verschiedenen Inkubationszeiten mittels qRT-PCR gemessen. Nach Inkubation mit 500 µM CML für 0,25 h und 0,5 h wurde RAGE signifikant hinauf-reguliert mit x-fachen Änderungen von $1,34 \pm 0,09$ ($p < 0,001$ vs. Kontrolle=1) bzw. $1,13 \pm 0,15$ ($p = 0,004$ vs. Kontrolle=1) (Abbildung 27). Des Weiteren wurde RAGE nach 1 h ($0,61 \pm 0,07$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle=1) und 6 h ($0,86 \pm 0,12$, $p = 0,001$ vs. Kontrolle=1) herunter-reguliert. Daher zeigte die RAGE ein ähnliches Expressionsmuster, wie die Expression von *HTR1A*, *HTR1B* und *HTR2A*. Ebenso wie die drei untersuchten Serotonin-Rezeptoren wurde auch RAGE nach 0,25 h rauf- und nach 1 und 6 h runter-reguliert. Dieses Verhalten deutet auf einen Zusammenhang zwischen den untersuchten Serotonin-Rezeptoren und RAGE hin.

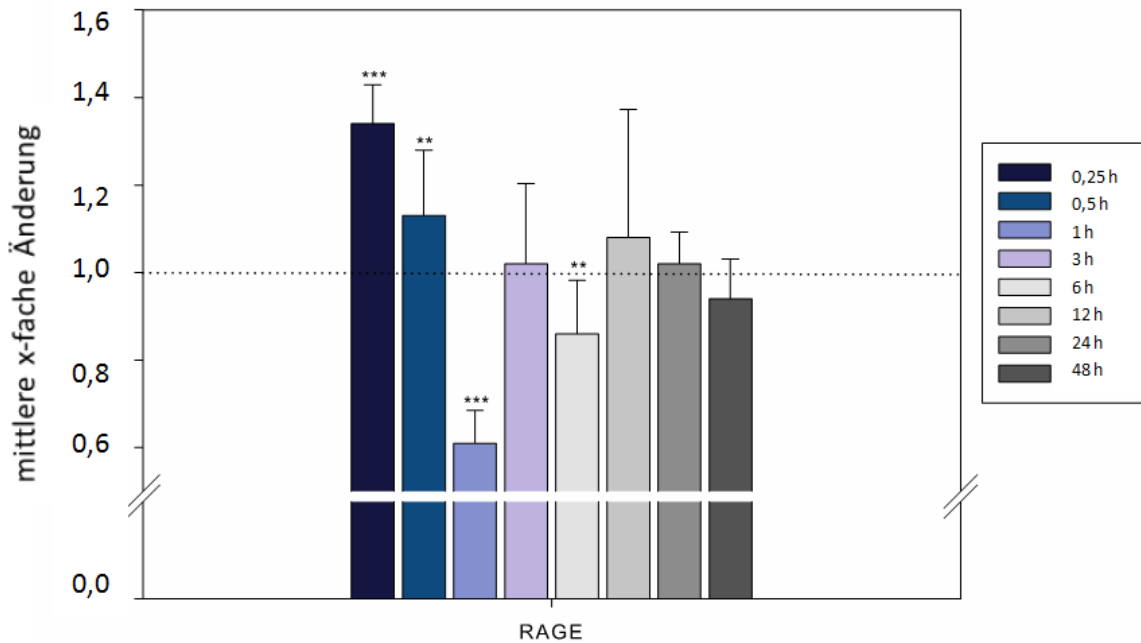


Abbildung 27 RAGE-Expression nach Behandlung mit 500 µM CML für 0,25 – 48 h. Ergebnisse sind dargestellt als mittlere x-fache Änderung bezogen auf die Kontrolle (n=3-4, tr=2-4). Statistische Signifikanz wurde mittels zweifaktorieller Varianzanalyse mit anschließendem Holm-Sidak post hoc Test getestet und markiert mit * (p<0,05), ** (p<0,01) oder *** (p<0,001)

4.7 Einfluss des Ca²⁺-Signalweg Inhibitors Neomycin auf die Genexpression von HTR2A, HTR1A, HTR1B

Um die Abhängigkeit der Expression Serotonin-Rezeptoren 5-HT_{2A}, 5-HT_{1B} und 5-HT_{1A} sowie RAGE von der Ca²⁺-Mobilisierung zu untersuchen, wurde die Expression nach 15-minütiger Inkubation mit 500 µM CML mit und ohne Vorinkubation mit 100 µM Neomycin, ein Aminoglycosid-Antibiotikum, welches Ca²⁺-Freisetzung von IP₃ und Ryanodin-sensitiven intrazellulären Calcium-Speichern blockiert [114, 115], gemessen.

In diesem Versuch zeigte sich, dass im Gegensatz zu 15 minütiger Inkubation mit CML (1,34 ± 0,09; p<0,001 vs. Kontrolle=1), die RAGE-Expression bei 15-minütiger

Vorinkubation mit dem Ca^{2+} -Blocker Neomycin nicht steigt ($0,88 \pm 0,07$, $p=0,005$ vs. Kontrolle=1). Ähnliche Effekte wurden für *HTR1A*, *HTR2A* und *HTR1B* beobachtet (Abbildung 28). Nach Inkubation mit 500 μM CML für 15 min wurden x-fache Änderungen von $2,75 \pm 1,17$ ($p<0,001$ vs. Kontrolle=1), $3,45 \pm 2,51$ ($p<0,001$ vs. Kontrolle=1) und $3,08 \pm 1,91$ ($p<0,001$ vs. Kontrolle=1) ermittelt. Vorinkubation mit 100 μM Neomycin führte zu deutlich geringeren Anstiegen in der Expression von $1,41 \pm 0,10$ ($p>0,05$ vs. Kontrolle=1), $1,16 \pm 0,09$ ($p>0,05$ vs. Kontrolle=1) und $1,17 \pm 0,15$ ($p>0,05$ vs. Kontrolle=1) für *HTR1A*, *HTR2A* und *HTR1B*.

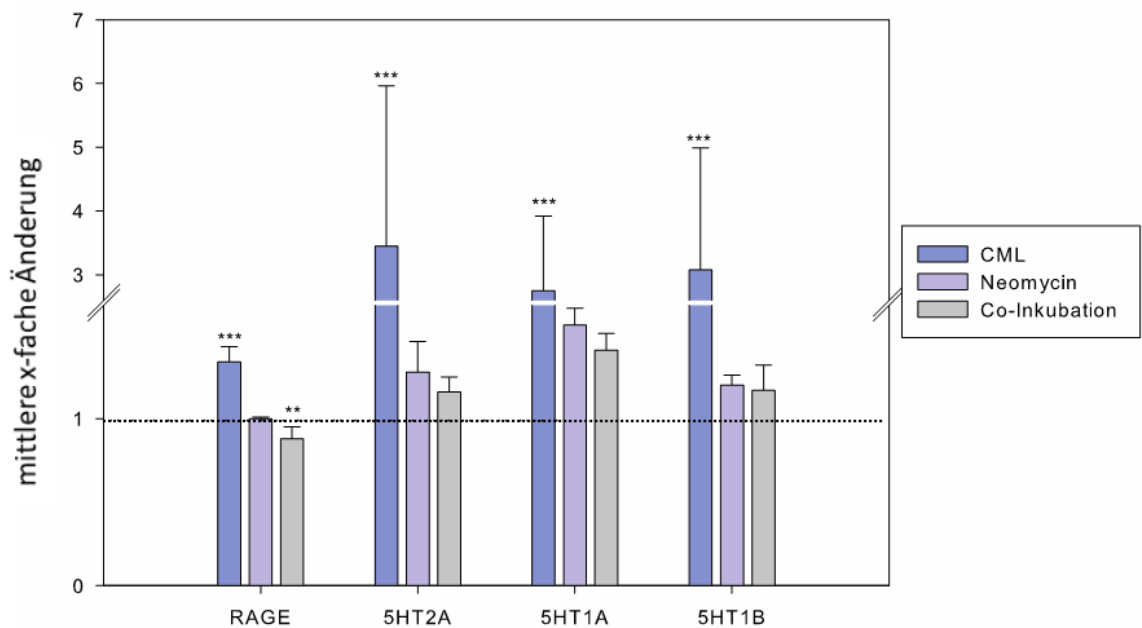


Abbildung 28 Expression von *RAGE*, *HTR2A*, *HTR1A* und *HTR1B* nach 15 min Inkubation mit CML, Neomycin oder Kombination beider. Ergebnisse sind dargestellt als mittlere x-fache Änderung bezogen auf die Kontrolle ($n=1-4$, $tr=2-4$). Statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA vs. Kontrolle mit anschließendem Holm-Sidak post hoc Test getestet und markiert mit * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$) oder *** ($p<0,001$)

Die Rolle von Calcium-Ionen in der Neurotransmitter-Ausschüttung ist gut beschrieben [60, 61]. Eine Studie von Collison et al. [116] weist auf einen Zusammenhang zwischen RAGE-Aktivierung und Ca^{2+} -Mobilisierung hin. Weiters deutet eine Studie an Mäusen auf einen direkten Zusammenhang zwischen AGE, RAGE und der Ca^{2+} -Homöostase des Myokards hin. In der Arbeit wurde gezeigt, dass Überexpression von RAGE im Herz die systolische und diastolische intrazelluläre Calciumkonzentration reduziert [117].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine 15-minütige Vorinkubation mit 100 μM Neomycin die Raufregulierung von RAGE blockiert. Daher wurde hypothetisiert, dass die CML-induzierte RAGE-Aktivierung ebenfalls über intrazelluläre Ca^{2+} -Mobilisierung erfolgt. Weiters wurde die Raufregulierung von *HTR1A*, *HTR2A* und *HTR1B* blockiert. Dies deutet auf einen möglichen Zusammenhang zwischen RAGE-Rezeptor und Calcium-abhängiger Serotonin-Ausschüttung hin. Dieses Ergebnis sollte durch Erhöhung der Anzahl biologischer Replikate verifiziert werden. Um diesen Zusammenhang näher zu untersuchen, könnten Versuche nach einem RAGE knockdown durch siRNA durchgeführt werden. Bei siRNA handelt es sich um zwei 21-Nukleotid lange einzelsträngige RNAs, die einen 19-Nukleotid umspannenden Duplex, mit je 2-3 Nukleotiden Überhang auf beiden Seiten, bilden [118]. Der Antisense-Strand der siRNA wird vom RNA-Interferenz-Komplex genutzt um die mRNA-Degradation zu begünstigen und so zum knockdown des Gens zu führen [118].

Weiters könnte das Experiment mit einem zweiten Calcium-Blocker, beispielsweise, 2-Aminoethoxydiphenylborat wiederholt werden. Bei 2-Aminoethoxydiphenylborat handelt es sich um einen nicht-kompetitiven IP_3 -Rezeptor Inhibitor [119].

5. Schlussbetrachtung

Im Rahmen einer typischen „Western diet“ werden häufig stark erhitzte Lebensmittel konsumiert. Durch die starke thermische Behandlung kommt es zur Maillard Reaktion, bei der Stickstoffverbindungen, beispielsweise die ϵ -NH₂-Gruppe von Lysin mit reduzierenden Zuckern reagieren. N^ε-Carboxymethyllysin ist ein gut charakterisiertes und stabiles Produkt der Maillard-Reaktion [23-25], das oft als Indikator für das Vorkommen von Maillard-Reaktionsprodukten in Lebensmitteln eingesetzt wird. Die Plasmakonzentration an CML liegt bei ungefähr 2,6 μ M [37, 100]. Erhöhte Plasmakonzentrationen von bis zu 12,6 μ M wurden bei Diabetes-Patienten festgestellt [38]. Da eine Akkumulation von CML, beispielsweise in hippocampalen Neuronen, nur mittels immunologischen Färbungsmethoden gezeigt wurde [101], wurden ausgehend von einer Akkumulierung CML-Konzentration von 50 μ M und 500 μ M gewählt. Die gewählten CML-Konzentrationen wurden in SH-SY5Y Zellen getestet. Dieses Zellmodell wurde gewählt, da es bereits in anderen Studien zur Untersuchung der Effekte von AGEs auf die ATP-Level und Glukose-Verwendung eingesetzt wurde [113, 120]. Weiters wurde gezeigt, dass diese Zelllinie endogen RAGE exprimiert [113]. Um die Effekte von CML auf die Sättigung zu untersuchen ist diese Zelllinie von Vorteil, da sie endogen Serotonin-Rezeptoren exprimiert. Serotonin-Rezeptor 1A, dessen Aktivierung mit verstärkter Nahrungsaufnahme verbunden wird [69, 72], wird von SH-SY5Y Zellen exprimiert [121].

In ersten Experimenten wurde der Effekt von CML auf SH-SY5Y auf genomweiter Ebene mittels DNA Microarray untersucht. Die Pathway-Analyse von Microarray-Daten, die durch Inkubation mit CML für 3 h erhalten wurden, zeigte einen Effekt von 500 μ M auf die Serotonin-Rezeptor Expression. Für 50 μ M CML zeigten sich kaum Effekte auf die Genregulation; nur 0,3 % aller Probes wurden hinauf/herunter reguliert um einen Faktor von 1,2. Da nach Inkubation mit 500 μ M CML 0,9 % der Probes reguliert wurden, wurde diese Konzentration für weitere Experimente eingesetzt. Prinzipiell

konnten die Microarray-Ergebnisse mittels qRT-PCR verifiziert werden. In der qRT-PCR waren deutlich größere Effekte erkennbar, was möglicherweise auf die sensitivere Natur der Methode zurückzuführen ist. Nach Inkubation mit 500 μ M CML für 3 h wurden die Serotonin-Rezeptoren 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} und 5-HT_{1B} signifikant hinauf-reguliert. Dabei zeigten sich x-fache Änderungen von $4,12 \pm 0,53$, $3,58 \pm 0,53$ bzw. $4,82 \pm 1,07$ gegenüber nicht-behandelter Kontrollzellen. Auch nach Inkubation für 0,25 h zeigte sich eine signifikante Regulation hinauf. Dies deutet auf eine zeitabhängige Regulation/Gegenregulation hin. Auf funktioneller Ebene konnte für 500 μ M CML eine signifikante Steigerung der Serotonin-Ausschüttung gezeigt werden. Da Calcium-Ionen in die Neurotransmitter-Ausschüttung involviert sind, wurde die intrazelluläre Calcium-Mobilisierung untersucht. Diese wurde durch CML in Konzentrationen von 0,05 – 500 μ M gesteigert. Dabei konnte keine Konzentrationsabhängigkeit ermittelt werden. Um weitere Aussagen zu Konzentrationsabhängigkeiten von Serotonin-Ausschüttung und Calcium-Mobilisierung zu machen, könnten eventuell größere Konzentrationsbereiche untersucht werden. Auch könnte die Konzentration in kleinen Schritten gesteigert werden, um das Konzentrationsmaximum zu ermitteln.

In weiterer Folge wurde der Einfluss von CML auf die RAGE-Expression untersucht. Ähnlich zu den Serotonin-Rezeptoren wurde RAGE nach 0,25 h hinauf-reguliert. Nach 3 h zeigte sich kein Effekt auf die RAGE-Expression. Da zwischen RAGE-Aktivierung und Calcium in einer Studie mit humanen Neutrophilen ein Zusammenhang gezeigt wurde, wurde die Expression von RAGE nach Co-inkubation mit dem Calciumblocker Neomycin untersucht. Dazu wurde der 0,25 h Zeitpunkt gewählt, da zu diesem sowohl RAGE als auch Serotonin-Rezeptoren signifikant hinauf-reguliert wurden. Bei der Co-Inkubation wurde eine x-fache Änderung von $0,88 \pm 0,07$ für RAGE und $1,41 \pm 0,10$, $1,16 \pm 0,09$ und $1,17 \pm 0,15$ für *HTR1A*, *HTR2A* und *HTR1B* ermittelt. Aus diesen Daten geht hervor, dass Neomycin die CML-induzierte Regulation dieser Rezeptoren blockt bzw. stark abschwächt. Dies deutet auf einen möglichen Zusammenhang zwischen CML-induzierter, Calcium-vermittelter Serotonin-Ausschüttung und RAGE hin. Um diesen Zusammenhang weiter zu untersuchen, könnten Versuche mit siRNA dienen.

Weiters könnten die nächsten Faktoren der ersten beiden Cluster der Pathway-Analyse näher untersucht werden. In Cluster 2 ist neben den Hinweisen auf den Einfluss von CML auf die Serotonin-Rezeptoraktivität auch die Regulation der Lipase-Aktivität vertreten. Eine Studie an 592 26-93 jährigen Menschen hat gezeigt, dass die Fettmasse invers mit der CML-Serumkonzentration korreliert [122]. Da die CML-Serumkonzentration von der Fettmasse abhängig war, wurde darauf geschlossen, dass CML in der Fettmasse akkumulieren könnte oder Adipocyten den AGE-Metabolismus beeinflussen könnten. Eine Studie an C57/BL6-Mäusen hat gezeigt, dass die Entwicklung von Insulinresistenz und Typ II Diabetes durch anhaltende Aufnahme von Mahlzeiten mit hohem Fettgehalt mit einer erhöhten AGE-Konzentration in Zusammenhang steht [123]. Daher könnten Versuche zur Auswirkung von CML auf den Fettsäure-/Fettstoffwechsel interessant sein.

6. Zusammenfassung

Die starke Hitzebehandlung von Lebensmitteln führt zur Maillard Reaktion, bei der reduzierende Zucker mit Stickstoffkomponenten, beispielsweise der ϵ -Aminogruppe der Aminosäure Lysin, reagieren. Da stark thermisch behandelte Lebensmittel ein typischer Bestandteil der westlichen Ernährungsweise sind, werden möglicherweise große Mengen an Maillard-Reaktionsprodukten aufgenommen.

N ^{ϵ} -Carboxymethyllysin (CML) ist ein gut charakterisiertes und stabiles Produkt der Maillard-Reaktion, das häufig als Indikator für den Maillard-Reaktionsproduktgehalt in Lebensmitteln dient. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von chemisch synthetisiertem CML auf die Genregulation von SH-SY5Y-Zellen untersucht.

Um einen Einblick auf genomweite Effekte von CML zu erhalten, wurden DNA-Microarrays eingesetzt. Durch Pathway-Analyse von Daten, die durch die Inkubation mit 50 μ M bzw. 500 μ M CML für 3 h erhalten wurden, wurde ein Effekt von CML auf die Serotonin-Rezeptor Expression ermittelt. Die Ergebnisse des Microarrays wurden durch Versuche mittels qRT-PCR verifiziert. Dieser Versuch zeigte für *HTR1A*, *HTR2A* und *HTR1B* eine hinauf-regulierende Wirkung von 500 μ M CML nach Inkubation für 0,25 und 3 h. Zusätzlich zu den Effekten auf genetischer Ebene, wurde ein Effekt auf funktioneller Ebene gezeigt. Die Inkubation von SH-SY5Y-Zellen mit 500 μ M CML führte zur signifikanten Steigerung der Serotonin-Ausschüttung. Die intrazelluläre Calcium-Mobilisierung, welche einen wichtigen Parameter in der Neurotransmitter-Ausschüttung darstellt, wurde von CML in Konzentrationen von 0,05 – 500 μ M gesteigert. Da zwischen Calcium und RAGE ein Zusammenhang gezeigt wurde, wurde der Einfluss von CML auf den Rezeptor für AGEs (RAGE) untersucht. Ein zeitabhängiges qRT-PCR Experiment zeigte dabei, dass RAGE nach Inkubation mit 500 μ M CML für 0,25 h hinauf-reguliert wird. Diese wurde durch Co-Inkubation mit dem Calcium-Blocker unterdrückt. Ähnlich wurde die hinauf-Regulation von *HTR1A*, *HTR2A* und *HTR1B* blockiert.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit erstmals ein Effekt von CML auf das Serotonin-System auf genetischer und funktioneller Ebene gezeigt werden. Weiters beeinflusst CML die RAGE-Expression. Da Neomycin die hinauf Regulation der Serotonin-Rezeptoren und RAGE blockiert, deutet dies auf einen möglichen Zusammenhang zwischen CML-induzierter, Calcium-vermittelter Serotonin-Ausschüttung und RAGE hin.

7. Abstract

The high thermal treatment of food results in the Maillard reaction in which reducing sugars react with available amino-groups, for instance the ϵ -amino group of lysine. As highly thermally treated foods are a common component in a typical Western diet, considerable amounts of Maillard reaction products may be ingested.

N^ε-carboxymethyllysine (CML), which is a well investigated and stable product of the Maillard reaction, is often used as an indicator of the Maillard reaction product content in foods. Within the scope of this work, the impact of chemically synthesized CML on the gene regulation of human SH-SY5Y cells was investigated. In order to elucidate genome-wide effects of CML a customized DNA microarray was used. Pathway analysis of data generated after incubation with 50 μ M or 500 μ M CML for 3 h indicated an effect of CML on the serotonin receptor expression. This result was validated by qRT-PCR which revealed an up-regulation of *HTR1A*, *HTR1B* and *HTR2A* at 0,25 h and 3 h. In addition to effects on a genetic level, CML induced an effect on a functional level as well. Incubation of SH-SY5Y cells with 500 μ M CML led to a significant increase in serotonin release. Furthermore, 0.05 – 500 μ M CML increased the mobilization of intracellular calcium. Intracellular calcium is an important factor in neurotransmitter release and has been linked to the activation of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in human neutrophils. In order to investigate a possible link between CML-induced calcium mobilization and RAGE, the expression of the receptor was analyzed in a time-course qRT-PCR experiment. The qRT-PCR indicated an up-regulation of RAGE after incubation with 500 μ M CML for 0,25 h. This up-regulation was blocked when co-incubated with the calcium blocker neomycin. In addition to blocking the up-regulation of RAGE, the up-regulation of *HTR1A*, *HTR2A* and *HTR1B* was diminished as well.

In conclusion, this work showed an effect of CML on the serotonin system in SH-SY5Y cells on a genetic and a functional for the first time in addition to effects on RAGE expression. Neomycin blocked the up-regulation of serotonin receptors and RAGE,

pointing to a possible link between CML-induced calcium-mediated serotonin release and RAGE.

8. Referenzen

1. Jousse, F., et al., *Simplified kinetic scheme of flavor formation by the Maillard reaction*. J Food Sci, 2002. **67**(7): p. 2534-2542.
2. van Boekel, M.A., *Formation of flavour compounds in the Maillard reaction*. Biotechnol Adv, 2006. **24**(2): p. 230-3.
3. Hodge, J., *Chemistry of browning reactions in models systems*. J Agric Food Chem, 1953. **1**.
4. Nursten, H.E., *Maillard Reaction - Chemistry, Biochemistry and Implications*. 2005, Cambridge: Royal Society of Chemistry.
5. Ledl, F.S., E, *New Aspects of the Maillard Reaction in Foods and in the Human Body*. Angewandte Chemie Internationale - Edition in English, 1990. **29**(6).
6. John E. Hodge , C.E.R., *N-Glycosyl Derivatives of Secondary Amines*. J. Am. Chem. Soc, 1952. **74**(6): p. 1494–1497.
7. Hodge, J.E., *Dehydrated Foods, Chemistry of Browning Reactions in Model Systems*. J. Agric. Food Chem, 1953. **1**(15): p. 928–943.
8. Beswick, H.T. and J.J. Harding, *Aldehydes or dicarbonyls in non-enzymic glycosylation of proteins*. Biochem J, 1985. **226**(2): p. 385-9.
9. Guangyuan Lu, T.-H.Y., Chi-Tang Ho, *Generation of Flavor Compounds by the Reaction of 2-Deoxyglucose with Selected Amino Acids*. J. Agric. Food Chem, 1997. **45**: p. 233–236.
10. Morales, F.J., V. Somoza, and V. Fogliano, *Physiological relevance of dietary melanoidins*. Amino Acids, 2012. **42**(4): p. 1097-109.
11. Anet, E.F., *3-Deoxyglycosuloses (3-Deoxyglycosones) and the Degradation of Carbohydrates*. Adv Carbohydr Chem, 1964. **19**: p. 181-218.
12. Kevin B. Hicks, M.S.F., *Studies on the Mechanism of Formation of 4-Hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone, a Component of Beef Flavor, from Amadori Products*. J. Agric. Food Chem, 1975. **23**(5).
13. Hodge, J., *Origin of flavor in foods: Nonenzymatic browning reactions*, in *The Chemistry and Physiology of Flavors*, H.W.D. Schultz, E.A; Libbey, L.M, Editor. 1967, The AVI Publishing Co: Westport. p. 465-491.
14. Birlouez-Aragon, I., et al., *A diet based on high-heat-treated foods promotes risk factors for diabetes mellitus and cardiovascular diseases*. Am J Clin Nutr, 2010. **91**(5): p. 1220-6.
15. George L.J. Hull , J.V.W., Jennifer M. Ames , Geraldine J. Cuskelly *Ne-(carboxymethyl)lysine content of foods commonly consumed in a Western style diet*. Food Chemistry, 2012(131): p. 170-174.
16. S. Drusch, V.F., H.F. Erbersdobler, *Determination of Nε-carboxymethyllysine in milk products by a modified reversed-phase HPLC method*. Food Chemistry, 1999(65): p. 547-553.

17. Sebekova, K., et al., *Plasma concentration and urinary excretion of Nepsilon-(carboxymethyl)lysine in breast milk- and formula-fed infants*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1126**: p. 177-80.
18. Somoza, V., et al., *Dose-dependent utilisation of casein-linked lysinoalanine, N(epsilon)-fructoselysine and N(epsilon)-carboxymethyllysine in rats*. Mol Nutr Food Res, 2006. **50**(9): p. 833-841.
19. Uribarri, J., et al., *Diet-derived advanced glycation end products are major contributors to the body's AGE pool and induce inflammation in healthy subjects*. Ann NY Acad Sci, 2005. **1043**: p. 461-466.
20. Wenzel, E., et al., *Effect of heat-treated proteins on selected parameters of the biotransformation system in the rat*. Ann Nutr Metab, 2002. **46**(1): p. 9-16.
21. Ikeda, K., et al., *N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine protein adduct is a major immunological epitope in proteins modified with advanced glycation end products of the Maillard reaction*. Biochemistry, 1996. **35**(24): p. 8075-83.
22. Sady, C., et al., *Maillard reactions by alpha-oxoaldehydes: detection of glyoxal-modified proteins*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1481**(2): p. 255-64.
23. Ahmed, M.U., S.R. Thorpe, and J.W. Baynes, *Identification of N-Epsilon-Carboxymethyllysine as a Degradation Product of Fructoselysine in Glycated Protein*. J Biol Chem, 1986. **261**(11): p. 4889-4894.
24. Kislinger, T., et al., *N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression*. J Biol Chem, 1999. **274**(44): p. 31740-9.
25. Uribarri, J., et al., *Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet*. J Am Diet Assoc, 2010. **110**(6): p. 911-16 e12.
26. Uribarri, J., et al., *Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation endproducts: two links to inflammatory response, oxidative stress, and aging*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2007. **62**(4): p. 427-33.
27. Sebekova, K., et al., *Plasma levels of advanced glycation end products in healthy, long-term vegetarians and subjects on a western mixed diet*. Eur J Nutr, 2001. **40**(6): p. 275-81.
28. Kasper, M. and P. Schieberle, *Labeling studies on the formation pathway of Nepsilon-carboxymethyllysine in maillard-type reactions*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1043**: p. 59-62.
29. Arribas-Lorenzo, G. and F.J. Morales, *Analysis, distribution, and dietary exposure of glyoxal and methylglyoxal in cookies and their relationship with other heat-induced contaminants*. J Agric Food Chem, 2010. **58**(5): p. 2966-72.
30. Culbertson, S.M., et al., *Paradoxical impact of antioxidants on post-Amadori glycooxidation: Counterintuitive increase in the yields of pentosidine and Nepsilon-carboxymethyllysine using a novel multifunctional pyridoxamine derivative*. J Biol Chem, 2003. **278**(40): p. 38384-94.
31. Hayase, F., et al., *Effects of oxygen and transition metals on the advanced Maillard reaction of proteins with glucose*. Biosci Biotechnol Biochem, 1996. **60**(11): p. 1820-5.

32. Nagai, R., et al., *Peroxynitrite induces formation of N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine by the cleavage of Amadori product and generation of glucosone and glyoxal from glucose: novel pathways for protein modification by peroxynitrite*. Diabetes, 2002. **51**(9): p. 2833-9.
33. Zyzak, D.V., et al., *Formation of reactive intermediates from Amadori compounds under physiological conditions*. Arch Biochem Biophys, 1995. **316**(1): p. 547-54.
34. Fu, M.X., et al., *The advanced glycation end product, N-(epsilon)(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(17): p. 9982-9986.
35. Alabed, Y. and R. Bucala, *N-Epsilon-Carboxymethyllysine Formation by Direct Addition of Glyoxal to Lysine during the Maillard Reaction*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1995. **5**(18): p. 2161-2162.
36. Verzijl, N., et al., *Crosslinking by advanced glycation end products increases the stiffness of the collagen network in human articular cartilage: a possible mechanism through which age is a risk factor for osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(1): p. 114-23.
37. Boehm, B.O., et al., *Elevated serum levels of N(epsilon)-carboxymethyl-lysine, an advanced glycation end product, are associated with proliferative diabetic retinopathy and macular oedema*. Diabetologia, 2004. **47**(8): p. 1376-9.
38. Lieuw-A-Fa, M.L., et al., *Increased levels of N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine and N(epsilon)-(carboxyethyl)lysine in type 1 diabetic patients with impaired renal function: correlation with markers of endothelial dysfunction*. Nephrol Dial Transplant, 2004. **19**(3): p. 631-6.
39. Vlassara, H., et al., *Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15596-601.
40. Ruhs, S., et al., *Preconditioning with Maillard reaction products improves antioxidant defence leading to increased stress tolerance in cardiac cells*. Exp Gerontol, 2010. **45**(10): p. 752-762.
41. Ruijschop, R.M., et al., *Effects of retro-nasal aroma release on satiation*. Br J Nutr, 2008. **99**(5): p. 1140-8.
42. Sebekova, K., et al., *Behaviour and hormonal status in healthy rats on a diet rich in Maillard reaction products with or without solvent extractable aroma compounds*. Physiol Behav, 2012. **105**(3): p. 693-701.
43. Begg, D.P. and S.C. Woods, *The central insulin system and energy balance, in Appetite Control*. 2012. p. 111-129.
44. Hagan, S. and K.D. Niswender, *Neuroendocrine regulation of food intake*. Pediatr Blood Cancer, 2012. **58**(1): p. 149-53.
45. Rosenbaum, M., R.L. Leibel, and J. Hirsch, *Obesity*. N Engl J Med, 1997. **337**(6): p. 396-407.
46. Yeo, G.S. and L.K. Heisler, *Unraveling the brain regulation of appetite: lessons from genetics*. Nat Neurosci, 2012. **15**(10): p. 1343-9.

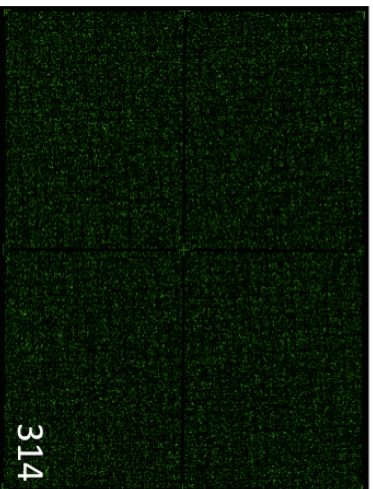
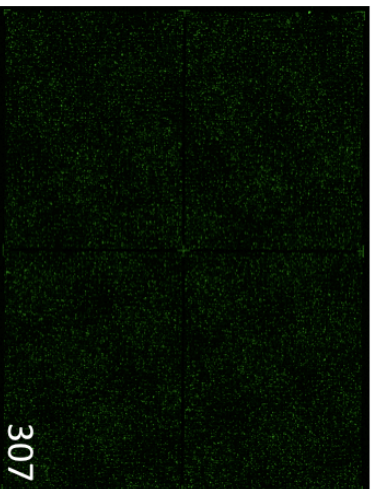
-
47. Woods, S.C. and D.A. D'Alessio, *Central control of body weight and appetite*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(11 Suppl 1): p. S37-50.
 48. Dockray, G.J., *Cholecystokinin*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2012. **19**(1): p. 8-12.
 49. Tschöp, M., D.L. Smiley, and M.L. Heiman, *Ghrelin induces adiposity in rodents*. Nature, 2000. **407**(6806): p. 908-13.
 50. Wren, A.M., et al., *Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats*. Diabetes, 2001. **50**(11): p. 2540-7.
 51. Asakawa, A., et al., *Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin*. Gastroenterology, 2001. **120**(2): p. 337-45.
 52. Owyang, C. and A. Heldsinger, *Vagal control of satiety and hormonal regulation of appetite*. J Neurogastroenterol Motil, 2011. **17**(4): p. 338-48.
 53. Lam, D.D. and L.K. Heisler, *Serotonin and energy balance: molecular mechanisms and implications for type 2 diabetes*. Expert Rev Mol Med, 2007. **9**(5): p. 1-24.
 54. Nebigil, C.G., et al., *Serotonin 2B receptor is required for heart development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(17): p. 9508-13.
 55. Fitzpatrick, P.F., *Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 355-81.
 56. MacLean, M.R., *Pulmonary hypertension and the serotonin hypothesis: where are we now?* Int J Clin Pract Suppl, 2007(156): p. 27-31.
 57. Keszthelyi, D., F.J. Troost, and A.A. Masclee, *Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function*. Neurogastroenterol Motil, 2009. **21**(12): p. 1239-49.
 58. Bertrand, P.P., *Real-time detection of serotonin release from enterochromaffin cells of the guinea-pig ileum*. Neurogastroenterol Motil, 2004. **16**(5): p. 511-4.
 59. Fuster, J., *Chemical Neurotransmission, in The Prefrontal Cortex*. 2008. p. 59-123.
 60. Augustine, G.J., *How does calcium trigger neurotransmitter release?* Curr Opin Neurobiol, 2001. **11**(3): p. 320-6.
 61. Nishiki, T.I. and G.J. Augustine, *Calcium-dependent neurotransmitter release: synaptotagmin to the rescue*. J Comp Neurol, 2001. **436**(1): p. 1-3.
 62. Schneggenburger, R. and E. Neher, *Intracellular calcium dependence of transmitter release rates at a fast central synapse*. Nature, 2000. **406**(6798): p. 889-93.
 63. Somoza, V., *The Maillard reaction in food and medicine: current status and future aspects*. Mol Nutr Food Res, 2009. **53**(12): p. 1485-6.
 64. Barnes, N.M. and T. Sharp, *A review of central 5-HT receptors and their function*. Neuropharmacology, 1999. **38**(8): p. 1083-152.
 65. Hoyer, D., J.P. Hannon, and G.R. Martin, *Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors*. Pharmacol Biochem Behav, 2002. **71**(4): p. 533-54.
 66. Alex, K.D. and E.A. Pehek, *Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission*. Pharmacol Ther, 2007. **113**(2): p. 296-320.
-

-
67. Zwanzger, P., K. Domschke, and J. Bradwejn, *Neuronal network of panic disorder: the role of the neuropeptide cholecystokinin*. *Depress Anxiety*, 2012. **29**(9): p. 762-74.
 68. Bradwejn, J., *Neurobiological investigations into the role of cholecystokinin in panic disorder*. *J Psychiatry Neurosci*, 1993. **18**(4): p. 178-88.
 69. Dourish, C.T., P.H. Hutson, and G. Curzon, *Low doses of the putative serotonin agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT) elicit feeding in the rat*. *Psychopharmacology* 1985. **86**(1-2): p. 197-204.
 70. Rosmond, R., C. Bouchard, and P. Bjorntorp, *5-HT_{2A} receptor gene promoter polymorphism in relation to abdominal obesity and cortisol*. *Obes Res*, 2002. **10**(7): p. 585-9.
 71. Jonnakuty, C. and C. Gragnoli, *What do we know about serotonin?* *J Cell Physiol*, 2008. **217**(2): p. 301-6.
 72. Mohammad-Zadeh, L.F., L. Moses, and S.M. Gwaltney-Brant, *Serotonin: a review*. *J Vet Pharmacol Ther*, 2008. **31**(3): p. 187-99.
 73. Feijo Fde, M., M.C. Bertoluci, and C. Reis, *[Serotonin and hypothalamic control of hunger: a review]*. *Rev Assoc Med Bras*, 2011. **57**(1): p. 74-7.
 74. Mancilla-Diaz, J.M., et al., *Role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in the hypophagic effect of 5-HT on the structure of feeding behavior*. *Med Sci Monit*, 2005. **11**(3): p. BR74-9.
 75. Leibowitz, S.F. and J.T. Alexander, *Hypothalamic serotonin in control of eating behavior, meal size, and body weight*. *Biol Psychiatry*, 1998. **44**(9): p. 851-64.
 76. Bendotti, C. and R. Samanin, *8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT) elicits eating in free-feeding rats by acting on central serotonin neurons*. *Eur J Pharmacol*, 1986. **121**(1): p. 147-50.
 77. Dourish, C.T., P.H. Hutson, and G. Curzon, *Characteristics of feeding induced by the serotonin agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT)*. *Brain Res Bull*, 1985. **15**(4): p. 377-84.
 78. De Vry, J. and R. Schreiber, *Effects of selected serotonin 5-HT₁ and 5-HT₂ receptor agonists on feeding behavior: possible mechanisms of action*. *Neurosci Biobehav Rev*, 2000. **24**(3): p. 341-53.
 79. Simansky, K.J., *Serotonergic control of the organization of feeding and satiety*. *Behav Brain Res*, 1996. **73**(1-2): p. 37-42.
 80. Sargent, B.J. and A.J. Henderson, *Targeting 5-HT receptors for the treatment of obesity*. *Curr Opin Pharmacol*, 2011. **11**(1): p. 52-8.
 81. Tecott, L.H., et al., *Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT_{2c} serotonin receptors*. *Nature*, 1995. **374**(6522): p. 542-6.
 82. Bouwknecht, J.A., et al., *Male and female 5-HT_{1B} receptor knockout mice have higher body weights than wildtypes*. *Physiol Behav*, 2001. **74**(4-5): p. 507-16.
 83. Yamada, J., et al., *Role of serotonergic mechanisms in leptin-induced suppression of milk intake in mice*. *Neurosci Lett*, 2003. **348**(3): p. 195-7.
 84. Edwards, S. and R. Stevens, *Peripherally administered 5-hydroxytryptamine elicits the full behavioural sequence of satiety*. *Physiol Behav*, 1991. **50**(5): p. 1075-7.
-

85. Stockert, J.C., et al., *MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets*. Acta Histochemica, 2012. **114**(8): p. 785-796.
86. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
87. Agbavwe, C., et al., *Efficiency, error and yield in light-directed maskless synthesis of DNA microarrays*. J Nanobiotechnology, 2011. **9**: p. 57.
88. Singh-Gasson, S., et al., *Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array*. Nature Biotechnology, 1999. **17**(10): p. 974-978.
89. Ouellet, M., et al., *A rapid and inexpensive labeling method for microarray gene expression analysis*. BMC Biotechnol, 2009. **9**: p. 97.
90. Mülhardt, C., *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*, in *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. 2009, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg. p. 84.
91. *Real-Time PCR Vs. Traditional PCR*. [cited 2013 05.05]; Available from: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/brochures/cms_042484.pdf.
92. *qPCR guide*. [cited 2013 05.05]; Available from: <http://www.eurogentec.com/uploads/qPCR-guide.pdf>.
93. Thomas, D., et al., *A comparison of fluorescent Ca²⁺ indicator properties and their use in measuring elementary and global Ca²⁺ signals*. Cell Calcium, 2000. **28**(4): p. 213-23.
94. Gee, K.R., et al., *Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes*. Cell Calcium, 2000. **27**(2): p. 97-106.
95. Huang da, W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources*. Nat Protoc, 2009. **4**(1): p. 44-57.
96. Ruijter, J.M., et al., *Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(6).
97. Tuomi, J.M., et al., *Bias in the C-q value observed with hydrolysis probe based quantitative PCR can be corrected with the estimated PCR efficiency value*. Methods, 2010. **50**(4): p. 313-322.
98. Valente, V., et al., *Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR*. BMC Mol Biol, 2009. **10**.
99. Wierschke, S., et al., *Evaluating reference genes to normalize gene expression in human epileptogenic brain tissues*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **403**(3-4): p. 385-90.
100. Teerlink, T., et al., *Measurement of Nepsilon-(carboxymethyl)lysine and Nepsilon-(carboxyethyl)lysine in human plasma protein by stable-isotope-dilution tandem mass spectrometry*. Clin Chem, 2004. **50**(7): p. 1222-8.
101. Kimura, T., et al., *Accumulation of advanced glycation end products of the Maillard reaction with age in human hippocampal neurons*. Neurosci Lett, 1996. **208**(1): p. 53-6.

-
102. Li, J.Y., et al., *Food deprivation-induced expression of minoxidil sulfotransferase in the hypothalamus uncovered by microarray analysis*. J Biol Chem, 2002. **277**(11): p. 9069-76.
 103. Meguid, M.M., et al., *Hypothalamic dopamine and serotonin in the regulation of food intake*. Nutrition, 2000. **16**(10): p. 843-57.
 104. Bruder, E.D., et al., *Microarray and real-time PCR analysis of adrenal gland gene expression in the 7-day-old rat: effects of hypoxia from birth*. Physiological Genomics, 2007. **29**(2): p. 193-200.
 105. Rajeevan, M.S., et al., *Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR*. J Mol Diagn, 2001. **3**(1): p. 26-31.
 106. Dallas, P.B., et al., *Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR -- how well do they correlate?* BMC Genomics, 2005. **6**: p. 59.
 107. Rubach, M., et al., *Multi-parametric approach to identify coffee components that regulate mechanisms of gastric acid secretion*. Mol Nutr Food Res, 2012. **56**(2): p. 325-35.
 108. Zambon, A.C., et al., *Time- and exercise-dependent gene regulation in human skeletal muscle*. Genome Biol, 2003. **4**(10): p. R61.
 109. Kubow, S., et al., *3-methylbutanal metabolism in the adult rat*. Clin Sci (Lond), 1981. **61**(4): p. 451-5.
 110. Jin, H., N.F. Liu, and R. Tang, *Effects of advanced glycosylation end products on proliferation and cytosolic free calcium in cultured rat aortic smooth muscle cells*. Zhongguo Yao Li Xue Bao, 1997. **18**(5): p. 422-5.
 111. Naser, N., et al., *Advanced glycation end products acutely impair Ca^{2+} signaling in bovine aortic endothelial cells*. Front Physiol, 2013. **4**: p. 38.
 112. Xue, J., et al., *Advanced glycation end product recognition by the receptor for AGEs*. Structure, 2011. **19**(5): p. 722-32.
 113. Kuhla, B., et al., *Differential effects of "Advanced glycation endproducts" and beta-amyloid peptide on glucose utilization and ATP levels in the neuronal cell line SH-SY5Y*. J Neural Transm, 2004. **111**(3): p. 427-39.
 114. Eun, S.Y., et al., *Effects of capsaicin on Ca^{2+} release from the intracellular Ca^{2+} stores in the dorsal root ganglion cells of adult rats*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **285**(5): p. 1114-20.
 115. Laver, D.R., et al., *The ryanodine receptor pore blocker neomycin also inhibits channel activity via a previously undescribed high-affinity Ca^{2+} binding site*. J Membr Biol, 2007. **220**(1-3): p. 11-20.
 116. Collison, K.S., et al., *RAGE-mediated neutrophil dysfunction is evoked by advanced glycation end products (AGEs)*. J Leukoc Biol, 2002. **71**(3): p. 433-44.
 117. Petrova, R., et al., *Advanced glycation endproduct-induced calcium handling impairment in mouse cardiac myocytes*. J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(10): p. 1425-31.
 118. McManus, M.T. and P.A. Sharp, *Gene silencing in mammals by small interfering RNAs*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(10): p. 737-47.
-

119. Kukkonen, J.P., P.E. Lund, and K.E. Akerman, *2-aminoethoxydiphenyl borate reveals heterogeneity in receptor-activated Ca(2+) discharge and store-operated Ca(2+) influx*. Cell Calcium, 2001. **30**(2): p. 117-29.
120. Langer, A.K., et al., *Identification of AGE-modified proteins in SH-SY5Y and OLN-93 cells*. Neurotox Res, 2006. **9**(4): p. 255-68.
121. Kruk, J.S., et al., *5-HT(1A) receptors transactivate the platelet-derived growth factor receptor type beta in neuronal cells*. Cell Signal, 2013. **25**(1): p. 133-43.
122. Semba, R.D., et al., *Fat mass is inversely associated with serum carboxymethyl-lysine, an advanced glycation end product, in adults*. J Nutr. **141**(9): p. 1726-30.
123. Sandu, O., et al., *Insulin resistance and type 2 diabetes in high-fat-fed mice are linked to high glycotxin intake*. Diabetes, 2005. **54**(8): p. 2314-9.



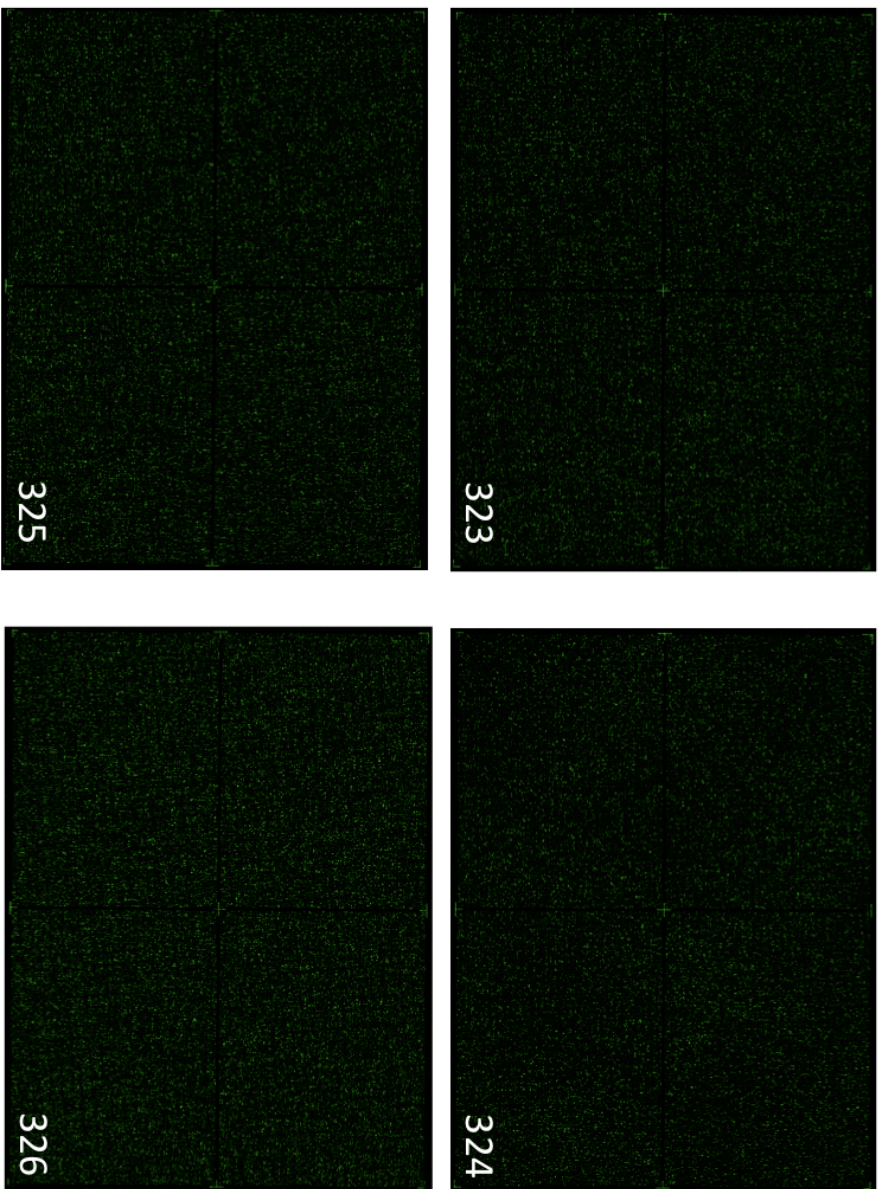


Abbildung 30 Microarray-Chips 323, 324, 325 und 326 für die Inkubation mit 50 μM CML (n=2) und Kontrolle (n=2)

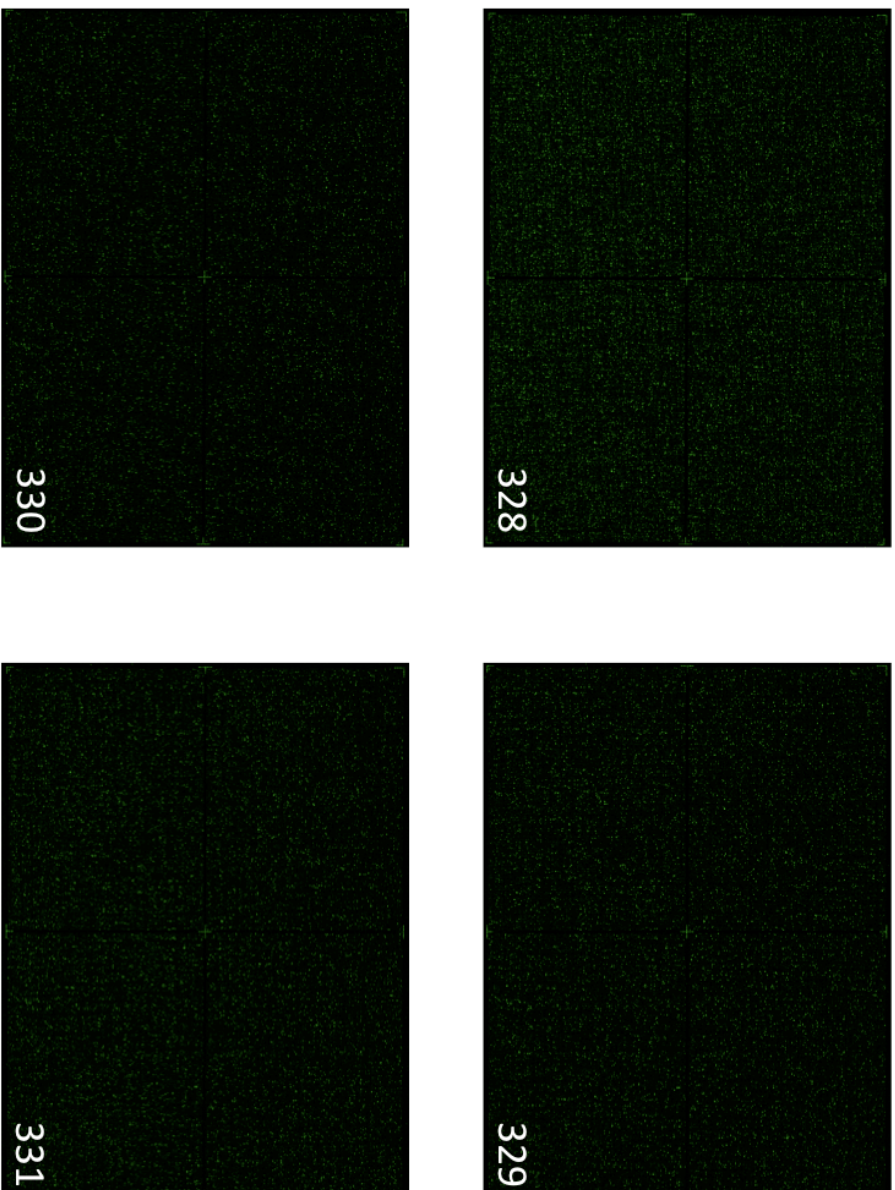


Abbildung 31 Microarray-Chips 328, 329, 330 und 331 für die Inkubation mit 50 μ M CML (n=2) und Kontrolle (n=2)

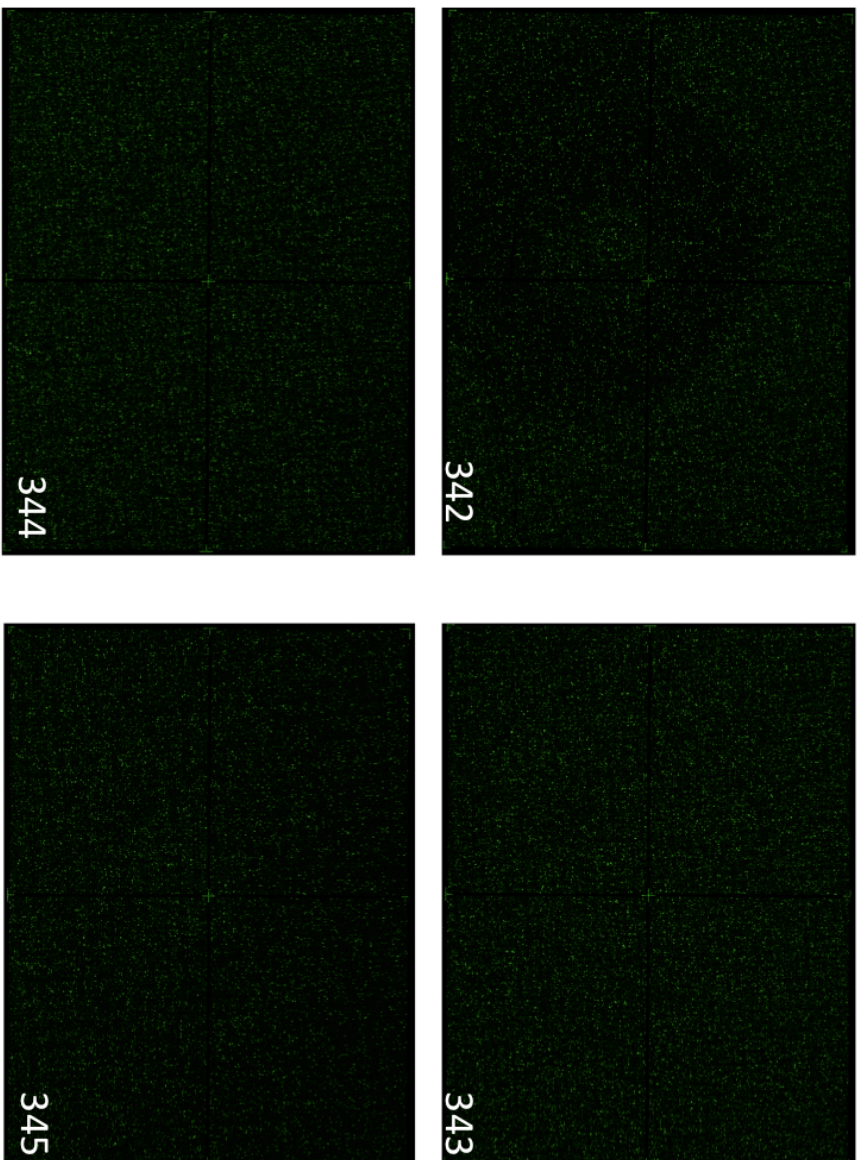


Abbildung 32 Microarray-Chips 342, 343, 344 und 345 für die Inkubation mit 500 μM CML (n=2) und Kontrolle (n=2)

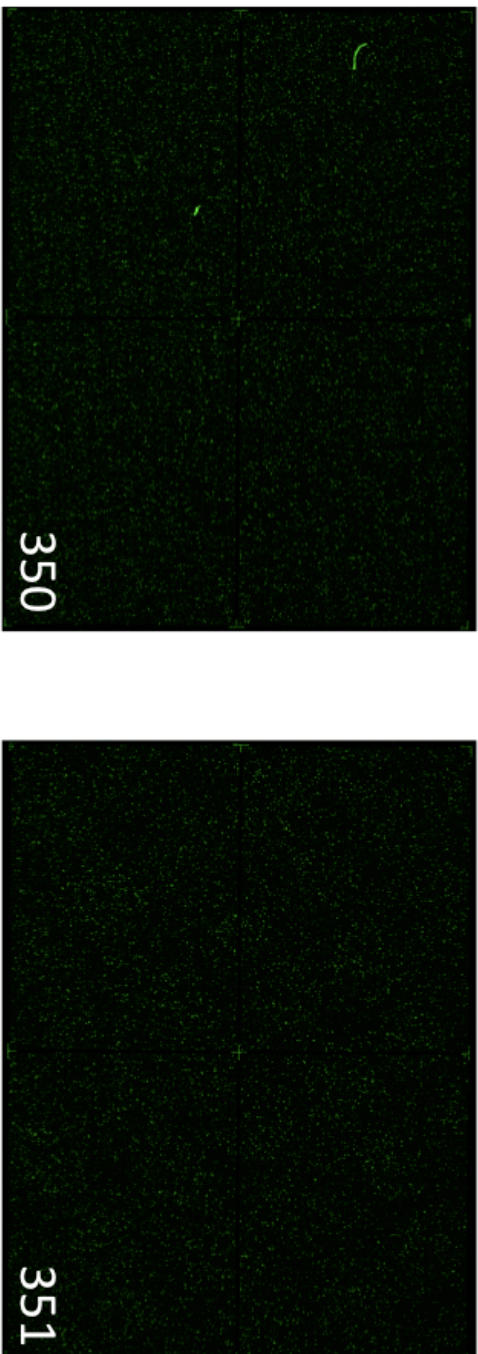


Abbildung 33 Microarray-Chips 350 und 351 für die Inkubation mit 500 μ M CML (n=1) und Kontrolle (n=1)

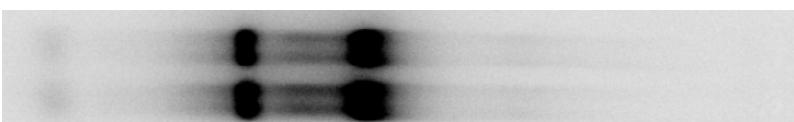


Abbildung 34 Agarose-Gel zur RNA-Qualitätskontrolle

Tabelle 7 Rohdaten der DNA-Konzentrationsbestimmung für den Serotonin-ELISA P16 und P15

Passage	Inkubationszeit	Einzelwerte (ng/µl)						Mittelwert (ng/µl)	STD (ng/µl)		
P16	Kontrolle	54,9	98,5	61,2	59,2	61,4	60,2	61,7	64,2	65,2	13,7
	Kontrolle 2	45,9	50,5	51,5	51,2	58,2	45,9	59,8	52,2	51,9	5,0
	CML 500 µM	44,4	47,6	51,3	48,0	44,6	48,2	48,0	47,8	47,5	2,2
	CML 500 µM 2	48,2	54,1	53,4	87,1	65,5	51,7	62,8	55,8	59,8	12,4
	CML 50 µM	58,0	119,4	59,9	63,8	58,0	59,0	76,7	61,8	69,6	21,0
	CML 50 µM 2	61,6	59,5	58,5	59,9	58,0	63,4	60,2	59,6	60,1	1,7
	CML 5 µM	58,6	55,2	74,0	56,6	57,8	57,6	56,8	55,4	59,0	6,2
	CML 5 µM 2	66,3	69,1	71,8	69,6	64,6	66,3	67,5	165,3	80,1	34,5
	CML 0,5 µM	62,3	64,3	64,1	67,4	82,4	64,0	63,7	71,5	67,5	6,7
	CML 0,5 µM 2	57,1	57,5	62,2	94,6	51,7	55,5	65,5	70,5	64,3	13,6
P15	CML 0,05 µM	52,7	49,1	49,2	54,3	53,9	54,3	55,0	54,5	52,9	2,4
	CML 0,05 µM 2	57,7	73,6	50,7	56,4	78,6	56,8	83,7	55,1	64,1	12,5
	Kontrolle	27,8	28,0	30,0	28,6	29,6	28,0	31,9	30,6	29,3	1,5
	Kontrolle 2	32,3	31,9	34,8	31,7	32,7	38,0	33,8	32,9	33,5	2,1
	CML 500 µM	28,8	27,4	29,3	28,8	28,5	31,0	31,1	29,3	29,3	1,2
	CML 500 µM 2	28,6	26,2	33,7	31,6	26,2	29,2	34,3	29,5	29,9	3,1
	CML 50 µM	35,0	34,2	32,7	31,9	33,2	35,6	32,0	33,4	33,5	1,3
	CML 50 µM 2	64,3	38,9	38,8	39,7	53,9	41,8	40,8	38,8	44,6	9,4

CML 5 µM	35,5	32,4	41,5	46,7	34,2	66,8	33,7	34,0	40,6	11,6
CML 5 µM 2	127,9	39,3	39,5	40,6	118,5	41,5	42,0	39,2	61,1	38,4
CML 0,5 µM	35,6	48,4	48,5	50,6	47,4	50,9	52,1	46,5	47,5	5,2
CML 0,5 µM 2	38,8	40,9	30,9	38,4	33,4	39,9	38,1	37,6	37,3	3,4
CML 0,05 µM	47,5	46,9	48,3	46,2	48,2	46,3	46,7	46,4	47,1	0,8
CML 0,05 µM 2	46,9	48,5	49,0	49,5	51,4	49,9	46,7	57,2	49,9	3,3

Tabelle 8 Zusammenfassung der DNA-Konzentrationsbestimmung für den Serotonin-ELISA P13

Passage	Inkubation	n	MW (ng/µL)	STD (ng/µL)
P13	Kontrolle	11	35,11	2,40
	Kontrolle 2	11	34,53	1,41
	Pos. Kontrolle	11	42,15	2,63
	Pos. Kontrolle 2	10	44,57	0,99
	CML 500 µM	11	35,10	1,58
	CML 500 µM 2	11	33,10	0,76
	CML 50 µM	11	31,40	0,83
	CML 50 µM 2	11	33,25	0,89
	CML 5 µM	8	39,21	1,11
	CML 5 µM 2	7	33,17	0,45
	CML 0,5 µM	7	43,23	0,55
	CML 0,5 µM 2	7	40,16	0,53
	CML 0,05 µM	12	34,93	1,21
	CML 0,05 µM 2	11	36,07	0,76

Tabelle 9 Zusammenfassung der DNA-Konzentrationsbestimmung für den Serotonin-ELISA P19

Passage	Inkubation	n	MW (ng/µL)	STD (ng/µL)
P19	Kontrolle	7	42,47	1,97
	Kontrolle 2	7	47,66	3,06
	Pos. Kontrolle	7	53,93	1,33
	Pos. Kontrolle 2	7	45,26	1,76
	CML 500 µM	7	44,36	0,77
	CML 500 µM 2	7	40,71	1,09
	CML 50 µM	7	40,56	1,23
	CML 50 µM 2	7	63,03	2,96
	CML 5 µM	7	42,03	3,50
	CML 5 µM 2	7	38,44	1,45
	CML 0,5 µM	7	44,51	0,72
	CML 0,5 µM 2	8	49,90	1,60
	CML 0,05 µM	7	44,29	1,09
	CML 0,05 µM 2	7	45,86	0,71

Tabelle 10 Rohwerte des Serotonin-ELISA nach dem Ausreißertest; Werte sind dargestellt in % auf die jeweilige Kontrolle bezogen

Kontrolle	0,05 µM	0,5 µM	5 µM	50 µM	500 µM
96,0	131,7	135,9	142,9	153,2	203,8
104,0	71,1	98,2	67,5	175,0	163,1
102,3	134,1	133,9	52,8	132,9	96,8
97,7	80,5	118,7	114,1	94,6	110,0
119,7	97,3	117,4	136,7	107,6	149,2
80,3	95,2	92,5	110,2	74,2	138,1

Tabelle 1.1 Rohdaten der Calcium-Mobilisierung nach dem Ausreißertest, Werte sind dargestellt in % auf die jeweilige Kontrolle bezogen.

	Kontrolle	500 µM	50 µM	5 µM	0,5 µM	0,05 µM
Einzelwerte (%)	97,3	150,5	164,8	142,0	179,3	96,9
	102,6	145,4	132,4	168,9	124,3	128,1
	103,1	162,7	134,9	184,1	153,3	114,9
	96,8	169,1	163,4	148,3	141,3	110,1
	97,8	137,5	155,9	142,2	104,9	96,3
	102,1	170,8	216,6	168,2	191,8	128,9
	97,2		206,2	121,0	124,7	228,6
	102,7		202,7	120,8	195,9	148,9
				150,0	242,7	211,5
					238,3	145,4
Mittelwert (%)	100,0	156,0	172,1	149,5	167,1	151,8
STD (%)	2,8	13,5	32,5	21,4	46,2	48,2

Tabelle 12 Rohdaten der qRT-PCR-Versuchs mit dem Calciumblocker Neomycin

	1B	1A	2A	RAGE
Kontrolle	1,04	0,87	0,90	1,04
	1,08	0,97	1,14	0,97
	0,87	1,16	0,95	0,98
				0,9
CML	1,84	2,35	1,17	1,28
	1,62	2,61	0,91	1,30
	1,49	2,29	0,79	1,23
				1,28
Neomycin	1,26	1,60	0,60	1,02
	1,14	1,45	0,86	0,99
	1,20	1,63	0,75	1,02
				1,03
Neomycin CML	0,99	1,33	0,62	0,86
	1,26	1,38	0,83	0,88
	1,25	1,52	1,01	0,83
				1,00

Tabelle 13 Rohdaten der qRT-PCR für das Gen *HTR2A*

Inkubationszeit	Kontrolle	500 μ M
15 min	1,07	1,97
	0,95	1,75
	0,96	1,70
	1,09	7,79
	0,90	6,39
	1,01	5,83
	0,98	2,94
		1,29
30 min		1,36
	0,90	0,63
	1,09	0,32
	1,05	0,72
	0,94	0,77
	0,95	0,87
	1,04	0,88
		1,01
1 h		0,83
	0,99	0,50
	1,00	0,45
	1,00	0,41
	0,99	0,23
	1,03	0,21
	0,96	0,22
		0,20
3 h		0,27
		0,22
	0,98	3,66
	1,01	3,31
	0,84	3,32
	1,21	3,04
	0,85	3,96
	1,20	4,60
		3,91
		3,60

6 h		2,84
	1,01	0,17
	0,98	0,17
	1,10	0,19
	0,91	0,05
		0,50
		0,16

Tabelle 14 Rohdaten des qRT-Versuchs für das Gen *HTR1A*

Inkubationszeit	Kontrolle	500 µM
15 min	0,87	8,84
	0,96	8,46
	1,05	8,74
	0,89	1,69
	1,05	1,65
	0,91	1,48
	1,04	4,13
	1,03	4,36
	1,16	4,23
	1,02	0,16
30 min	0,95	0,09
	1,02	0,16
	0,98	0,54
	1,00	0,73
	1,00	0,64
	1,01	0,61
	0,98	0,62
		0,59
	1,03	0,54
	0,96	0,48
1 h	1,04	0,53
	0,95	0,33
	0,99	0,33
	1,00	0,34
		0,42

3 h		0,50
		0,47
	0,95	4,37
	1,04	4,59
	0,85	4,52
	1,14	4,56
	0,95	3,58
	1,04	3,31
		3,74
		4,68
6 h		3,71
	0,99	0,34
	1,00	0,29
	1,01	0,20
	0,98	0,23
		0,14
		0,08

Tabelle 15 Rohdaten des qRT-PCR Versuchs für das Gen *HTR1B*

Inkubationszeit	Kontrolle	500 μ M
15 min	1,12	1,71
	0,87	2,02
	0,99	2,21
	1,00	5,49
	1,04	5,49
	1,08	5,84
	0,87	1,84
		1,62
		1,49
	1,07	0,38
30 min	0,93	0,79
	0,98	0,4
	0,96	0,73
	1,03	0,71
	0,71	0,64

	1,28	0,54
		0,73
	0,99	0,38
	1,00	0,29
	0,99	0,28
1 h	1,00	0,69
	0,92	0,68
	1,07	0,82
		0,52
		0,43
	0,98	5,16
	1,02	4,28
	1,08	4,33
	0,92	6,17
3 h	0,97	6,33
	1,03	5,74
		3,78
		3,40
		4,15
	1,00	0,21
	0,99	0,26
	1,04	0,17
6 h	0,95	0,02
		0,02
		0,10

Lebenslauf

I. Ausbildungsweg

- seit Oktober 2010** Universität Wien, Masterstudium Biologische Chemie
- September 2009 – Juni 2010** Dublin Institute of Technology, BSc (Hons) Chemical Sciences with Medicinal, First Class Honors
Auszeichnungen: Student Academic Excellence award, Best Overall Performance (DT299/4) und Outstanding Project Performance (DT299/4)
- September 2008 – Juni 2009** Dublin Institute of Technology, BSc (Ord) Medicinal Chemistry and Pharmaceutical, Distinction
Auszeichnungen: Student Academic Excellence award, Best Overall Performance (DT261/3) und Outstanding Project Performance (DT261/3)
- September 2003 – Juni 2008** Höhere Bundeslehr- und Versuchsanstalt für chemische Industrie, Rosensteingasse, Matura mit ausgezeichnetem Erfolg

II. Studienbegleitende Tätigkeiten

- seit Juli 2012** Freier Dienstnehmer, Universität Wien, Institut für Ernährungsphysiologie und Physiologische Chemie
- Juli 2011 – Juli 2012** Institut für Ernährungsphysiologie und Physiologische Chemie, Universität Wien, Durchführung des experimentellen Teils der Masterarbeit
- Juni 2007 – August 2007** Allgemeines Krankenhaus der Stadt Wien, Institut für Medizinische Chemie und Labordiagnostik
Durchführung des praktischen Teils des Abschlussprojekts im Rahmen der Ausbildung an der HBLVA Rosensteingasse
- Juni 2009 – August 2009** Focas Institute, Dublin Institute of Technology, Teilnehmer des "UREKA"-Forschungspraktikums

III. Spezielle Kenntnisse

- Sprachen** Englisch Level C1 (CAE, Grade B)
- EDV** MS Office, ChemDraw