

Aus dem
Institut für Experimentelle Chirurgie, Medizinische Fakultät
der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

Einfluss einer mitochondrialen Dysfunktion auf Proteinglykierung und Leberschädigung

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock
2011

vorgelegt von:

Christina Trieglaff, geb. Hettwer

geboren am 05.08.1984 in Recklinghausen, Nordrhein-Westfalen

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar
Direktorin am Institut für Experimentelle Chirurgie
mit Zentraler Versuchstierhaltung der Universität Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Markus Tiedge
Direktor am Institut für Medizinische Biochemie
und Molekularbiologie der Universität Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Walther
Direktor am Institut für Medizinische Biochemie
und Molekularbiologie der Universität Greifswald

Das Promotionsverfahren wurde am 29.08.2011 eröffnet.

Die Dissertation wurde am 24.01.2012 verteidigt.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS..... 4

1 EINLEITUNG 8

 1.1 Altern..... 8

 1.1.1 Demographischer Wandel..... 8

 1.1.2 Zelluläre Dysfunktionen 9

 1.1.2.1 Mitochondrien 9

 1.1.2.1.1 Biologie der respiratorischen Entkopplung 10

 1.1.2.1.2 Uncoupling Proteine (UCPs) 10

 1.1.2.1.3 Freie Radikale und oxidativer Stress..... 11

 1.1.2.2 Advanced Glycation Endproducts (AGEs) 13

 1.1.2.3 Rezeptoren für ‚Advanced Glycation Endproducts‘ – RAGE und sRAGE 15

 1.2 Akutes septisches Leberversagen..... 18

 1.2.1 SIRS, Sepsis und MODS 19

 1.2.2 Pathophysiologie des septischen Leberversagens 20

 1.2.2.1 Inflammation 20

 1.2.2.2 Störungen der Makrozirkulation..... 21

 1.2.2.3 Störungen der Mikrozirkulation 21

 1.2.2.4 Formen des Zelltodes..... 22

 1.2.3 Therapiemöglichkeiten und Prognose 23

 1.3 Endotoxinämiemodell..... 24

 1.3.1 D-Galaktosamin (Gal) und Lipopolysaccharid (LPS) 24

 1.4 Ziele der Arbeit und Fragestellung..... 26

2 MATERIAL UND METHODEN.....	27
2.1 Versuchstiere.....	27
2.2 Tierexperimentelles Modell.....	27
2.2.1 Tierexperimentelle Gruppen und Behandlung	27
2.3 Untersuchungstechniken.....	29
2.3.1 Entnahme von Blut und Gewebe.....	29
2.3.2 Vollblut- und Serumanalytik.....	29
2.3.2.1 Bestimmung von Glukose	29
2.3.2.2 Bestimmung der leberspezifischen Enzyme	29
2.3.2.3 Bestimmung der GSH/GSSG Ratio.....	30
2.3.2.4 Bestimmung von Malondialdehyd.....	32
2.3.2.5 Bestimmung der Glyoxalase-I-Aktivität.....	35
2.3.3 Molekularbiologische Untersuchungen	36
2.3.3.1 Bestimmung der AGE-, RAGE- und cleaved Caspase-3-Expression mittels Western Blot Analyse.....	36
2.3.3.2 Bestimmung von sRAGE mittels ‚Enzyme Linked Immunosorbent Assay‘ ...	38
2.3.4 Histologie und Immunhistochemie.....	39
2.3.4.1 Hämotoxylin-Eosin.....	39
2.3.4.2 sRAGE	40
2.4 Experimentelle Gruppen und experimentelles Protokoll	42
2.5 Statistik	43
3 ERGEBNISSE	44
3.1 Vollblut- und Serumanalysen	44
3.1.1 Glukose	44
3.1.2 Malondialdehyd und GSH/GSSG-Ratio als Indikatoren des oxidativen.....	45

Stresses	45
3.1.3 Glyoxalase-I-Aktivität	46
3.1.4 Leberspezifische Enzyme als Marker des akuten Leberversagens	47
3.2 Molekularbiologie	49
3.2.1 Nachweis von AGEs.....	49
3.2.2 Nachweis der RAGE-Expression	50
3.2.3 Nachweis der cleaved Caspase-3-Expression	51
3.3 Histologie und Immunhistochemie	52
3.3.1 Hämatoxylin-Eosin.....	52
3.3.2 Nachweis der sRAGE-Expression.....	54
3.4 Überlebensstudien	57
3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse	59
4 DISKUSSION.....	60
4.1 Diskussion von Material und Methoden.....	60
4.1.1 Diskussion des Modells	60
4.1.2 Diskussion der Altersstudie	63
4.2 Diskussion der Ergebnisse	64
4.2.1 Mitochondriale Dysfunktion	64
4.2.2 Interaktion von AGEs und RAGE.....	67
4.2.3 Vulnerabilität gegenüber Inflammation.....	69
4.2.4 Protektion durch körpereigenes sRAGE und Applikation von rRAGE bei.....	72
4.3 Zusammenfassung und Schlussfolgerung	74
4.4 Perspektiven.....	75
5 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	77
6 TABELLENVERZEICHNIS	80

7 HÄUFIG VERWENDETE ABKÜRZUNGEN	81
8 LITERATUR	83
9 ANHANG.....	102
11.1 Selbstständigkeitserklärung	102
11.2 Thesen zu Dissertation.....	103

1 EINLEITUNG

1.1 Altern

1.1.1 Demographischer Wandel

Mit dem demographischen Wandel wird eine Entwicklung der Bevölkerung beschrieben, die durch Veränderungen der Bevölkerungszahl, der Altersstruktur, der Sozialstruktur und der ethnischen Struktur gekennzeichnet ist. Die wesentlichen Ursachen dieses Verlaufes liegen in der Abnahme der Geburtenrate sowie in der Zunahme der Lebenserwartung (Bundesinstitut für Bevölkerungsforschung, 2008, S. 6). Beide Phänomene sind konstant in der industrialisierten Gesellschaft zu beobachten und beruhen auf dem stetigen Rückgang der Säuglings- und Kindersterblichkeit, dem technologischen Fortschritt in der Medizin, sowie der Verbesserung der ökonomischen Lebensverhältnisse.

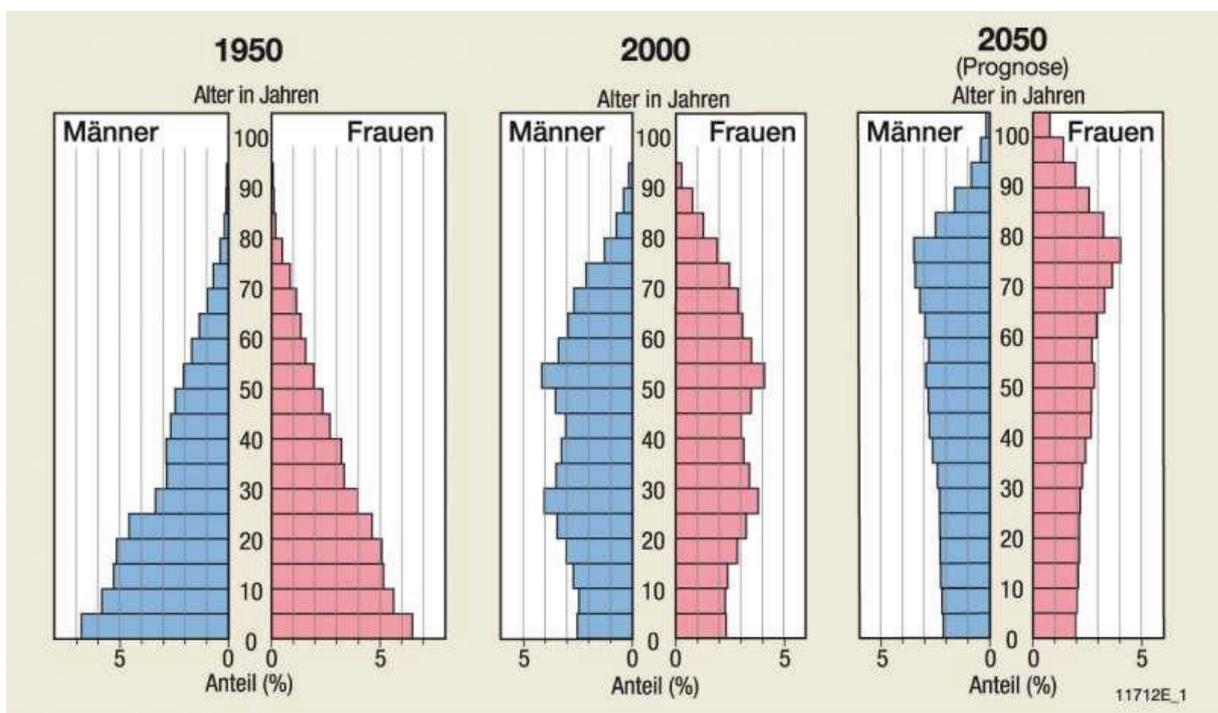


Abb. 1: Entwicklung der Altersstruktur.

(Quelle: http://www.diercke.de/bilder/omeda/800/11712E_1.jpg)

Die Lebenserwartung beträgt inzwischen fast 82 Jahre bei Frauen und über 76 Jahre bei Männern. Damit ist sie fast neun Jahre höher als noch vor 35 Jahren (Tivig & Hetze, 2007). Die Abb. 1 zeigt die Entwicklung der Bevölkerung zwischen 1950 und 2050. Aus der Pyramide im Jahr 1950 formiert sich in Jahrzehnten über die Glockenform eine Urnenform. Neben den Prozentanteilen der verschiedenen Altersgruppen an der Gesamtbevölkerung liefert der Altenquotient ein objektives Maß für den Grad der demographischen Alterung. Darunter wird die Anzahl der über 60-Jährigen, die auf 100 Menschen im Alter zwischen 20 und 60 Jahren kommen, verstanden. Lag dieser Quotient 1998 noch bei 38, so wird er 2050 92 betragen (Anstieg um den Faktor 2,4) (Jamour, 2008). Für die sozialen Sicherungssysteme und das Gesundheitswesen bedeutet diese Entwicklung eine enorme Herausforderung. Besonders der Behandlung der Multimorbidität der über 80-Jährigen zusammen mit der Behinderungsprävention dieser Altersgruppe wird eine wachsende Bedeutung zukommen müssen.

1.1.2 Zelluläre Dysfunktionen

Infektionen, Ischämien, Hypoxie und Noxen führen zu Störungen der Homöostase der Zellen und konsekutiv zu Veränderungen im Stoffwechsel. Aus der Verschiebung von Ionenkonzentrationen und Bildung von freien Radikalen resultieren die Beeinflussung der Integrität des Genoms, der Proteinsynthese, der Integrität von Zellmembranen und der Zellatmung. Eine Störung der Zellatmung, die in den Mitochondrien stattfindet, ist besonders folgenschwer.

1.1.2.1 Mitochondrien

Die ersten Aufzeichnungen über die Existenz von Mitochondrien stammen ungefähr aus dem Jahr 1840 (Henle, 1841). Erst 1898 wurde von Benda jedoch der Name Mitochondrium geprägt (Benda, 1898). Der Ursprung des Wortes kommt aus dem Griechischen. Hier bedeutet *mitos* Faden und *chondros* Körnchen. Diese Namensgebung geht auf das Auftauchen in der Spermiogenese zurück. Schon Anfang des 20. Jahrhunderts sah Kingsbury einen Zusammenhang zwischen Mitochondrien und zellulärer Respiration (Kingsbury, 1912). Trotzdem wurde erst 1953 die Hypothese der oxidativen Phosphorylierung aufgestellt (Slater, 1953). Ungefähr zur gleichen Zeit wurden auch Erkenntnisse zur Histologie der Doppelmembran gewonnen.

Es dauerte wiederum weitere zehn Jahre bis der Nachweis von mitochondrialer DNA erbracht werden konnte (Nass & Nass, 1963).

1.1.2.1.1 Biologie der respiratorischen Entkopplung

Es ist bekannt, dass Zellatmung und mitochondriale Adenosintriphosphat-Synthese (ATP-Synthese) aneinander gekoppelt sind. Die Beobachtung, dass eine verminderte ATP-Verwertung den Sauerstoffverbrauch inhibiert und dass die Respirationsrate steigt, wenn viel ATP synthetisiert wird, führte zu dem Konzept der Adenosindiphosphat (ADP)-Phosphorylierungs-kontrollierten Atmung. Die chemiosmotische Theorie von Peter Mitchell (1961) demonstrierte, dass der mitochondriale elektrochemische Protonengradient, der dadurch generiert wird, dass Elektronen durch die verschiedenen Komplexe der Atmungskette geschleust werden, die primäre Quelle für die ATP-Synthese ist. Die Atmungskette besteht aus fünf Komplexen. Die Komplexe I, III und IV pumpen Protonen aus der Matrix heraus, wobei Coenzyme reoxidiert werden und ein Gradient aufgebaut wird, welcher von Komplex V, der die ATP-Synthese katalysiert, verbraucht wird. Laut Mitchell führt jeder Prozess, bei dem Protonen unabhängig von der ATP-Synthese in die Matrix gelangen, zu einer Entkopplung („Uncoupling“) der Atmungskette und zu Thermogenese. Dies ist ein physiologischer Vorgang, denn Coenzyme können so kontinuierlich reoxidiert werden. Zusätzlich werden zu hohe ATP-Konzentrationen, welche die Zellatmung inhibieren, vermieden (Rousset et al., 2004).

1.1.2.1.2 Uncoupling Proteine (UCPs)

Uncoupling Proteine (UCPs) sind mitochondriale Transporter der inneren Membran (Mitochondrial Anion Carrier Proteins = MACP), die bei der Entkopplung der Atmungskette, das heißt dem Rücktransport von Protonen zurück in die Matrix, eine wichtige Rolle spielen (Rafael et al., 1968). Die Abb. 2 zeigt den Aufbau eines Mitochondriums und die Rolle von UCPs in der Atmungskette. Sie befinden sich nicht nur in den Mitochondrien von Tieren und Pflanzen, sondern wurden auch bei Pilzen und Protozoen nachgewiesen (Jarmuszkiewicz et al., 1999). Die molekulare Masse beträgt zwischen 31kDa und 34kDa (Ledesma et al., 2002). Charakteristisch ist die dreigliedrige Struktur mit drei Wiederholungen von ungefähr 100 Aminosäuren, wobei jede der Wiederholungen zwei hydrophobe Domänen besitzt, die über

einen hydrophilen Ring miteinander verbunden sind (Saier, 2000). UCP1 wird nur von braunem Fettgewebe exprimiert. Seine Funktion ist die durch Fettsäuren aktivierte Entkopplung der Atmungskette, welche die Grundlage der Thermogenese darstellt. Im braunen Fettgewebe entsprechen acht Prozent des Gesamtproteins eines Mitochondriums UCP1. UCP2 und UCP3 unterscheiden sich deutlich von UCP1. Sie haben keinen Einfluss auf die Thermogenese. UCP3 beeinflusst den Metabolismus der Skelett- und Herzmuskulatur (Nabben & Hoeks, 2008; Rousset et al., 2004).

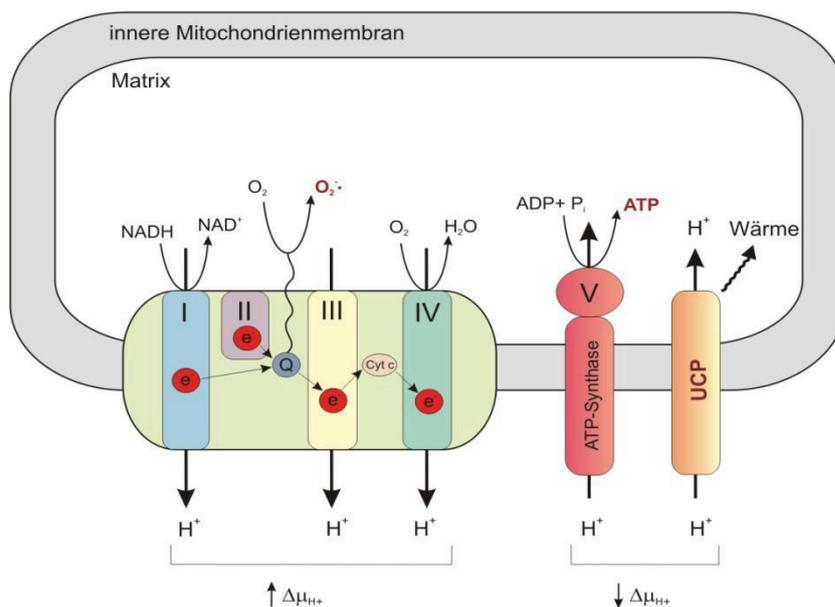


Abb. 2: Aufbau eines Mitochondriums.

Die Existenz von UCP2 wurde erst 1997 entdeckt (Fleury et al., 1997). Dabei handelt es sich um ein ubiquitäres Uncoupling Protein, das hauptsächlich im lymphatischen System, in Makrophagen und in Pankreaszellen exprimiert wird. Die Expression von UCP2 hängt vom Gewebe und von der physiologischen Situation ab. UCP2 spielt eine wichtige Rolle bei der Prävention der Plaquebildung bei Arteriosklerose, in der Ätiologie des Diabetes mellitus Typ II, bei der Inflammation, bei der Gewichtsregulation und Prävention der Formation von reaktiven Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species, ROS) (Jezek & Garlid, 1998).

1.1.2.1.3 Freie Radikale und oxidativer Stress

Sauerstoff reagiert in der Atmungskette der Zellen mit Wasserstoffionen zu Wasser. Dies geschieht, da jedes Atom die Edelgaskonfiguration anstrebt. Eine solche Konfiguration ist für

Sauerstoff mit acht Elektronen und für Wasserstoff mit zwei Elektronen auf der äußeren Elektronenschale gegeben. Da Sauerstoff selbst dort nur sechs Elektronen und Wasserstoff ein Elektron besitzt, gehen beide eine Verbindung miteinander ein. Im entstandenen Wasser ist für alle drei Atome die Edelgaskonfiguration erreicht. Ein Großteil des Wassers wird über die Nieren ausgeschieden. Trotz ausgiebiger Schutzmechanismen ist dieser Prozess in ein bis zwei Prozent der Fälle fehlerhaft (Raha & Robinson, 2000), dann nämlich, wenn sich nur ein Wasserstoffion mit einem Sauerstoffion verbindet. Es entsteht das Superoxidanion (O_2^-), welches aufgrund fehlender Edelgaskonfiguration nach potenziellen Reaktionspartnern sucht. Die Halbwertszeit dieses Superoxides beträgt weniger als $1\mu s$, da aus ihm eine Fülle verschiedener Radikale und auch nicht-radikale Komponenten entstehen. Diese Komponenten sind bekannt als ROS. Zu ROS gehören die Radikale O_2^- , Hydroxyl (OH), Peroxyl (RO_2), Alkooxyl (RO), Hydroperoxyl (HO_2), sowie auch nicht-radikale Komponenten wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder die hypochlorige Säure (HOCl). Eine weitere Gruppe stellen die reaktiven Stickstoffspezies (Reactive Nitrogen Species, RNS) dar, zu denen Stickstoffmonoxid (NO) und Peroxynitrit (ONOO) gehören. Während ein Minimum des O_2^- (1% bei pH 6,8%) zu HO_2 hydratisiert wird, wird die Mehrheit des O_2^- von der in der Matrix vorherrschenden Mn-Superoxid-Dismutase (MnSOD) oder von der im Zytosol und Intermembranpalt sitzenden Cu-Zn-Superoxid-Dismutase (CuZnSOD) zu H_2O_2 transformiert. H_2O_2 wird dann von der Glutathionperoxidase verstoffwechselt oder in von Metall katalysierten Reaktionen zu OH (Fenton-Reaktion) umgewandelt. HO_2 und OH initiieren Lipidperoxidation, welche zur Produktion von Hydroperoxy-Fettsäure-Radikalen der ungesättigten Hydrocarbonketten führt, die von der Phospholipase A2, bei Anwesenheit von Ca^{2+} , gespalten werden. Die Fettsäure-Hydroperoxide können von der Glutathionperoxidase abgebaut werden und vorher noch UCP2 aktivieren (Zackova et al., 2003), welche wiederum die ROS-Produktion vermindern. Unter physiologischen Umständen besteht im Körper ein Gleichgewicht zwischen oxidationsfördernden und antioxidativen Prozessen. Verschiebt sich das Gleichgewicht zugunsten der oxidationsfördernden Prozesse, bedeutet das für den Organismus oxidativen Stress. Um die Edelgaskonfiguration zu erreichen, greifen die freien Radikale körpereigene Proteine und Lipide an (Dröge, 2002). Die weit verbreitete Theorie des Alterns aufgrund von freien Radikalen besagt, dass altersabhängige degenerative Prozesse in großem Ausmaß auf die Schädigung durch freie Radikale zurückzuführen sind (Harman, 1956). Aber auch unabhängig vom Alter lassen sich Zusammenhänge zwischen verschiedenen Erkrankungen und oxidativem Stress finden. Freie Radikale spielen bei malignen Erkrankungen (Dreher

& Junod, 1996), Diabetes mellitus (Baynes, 1991), Arteriosklerose (Alexander, 1995), neurodegenerativen Erkrankungen (Busciglio & Yankner, 1995) und rheumatoider Arthritis (Araujo et al., 1998) eine Rolle und fördern Prozesse wie Lipidperoxidation und Glykierung, bei denen ‚Advanced Lipidperoxidation Endproducts‘ (ALEs) und ‚Advanced Glycation Endproducts‘ (AGEs) entstehen können.

1.1.2.2 Advanced Glycation Endproducts (AGEs)

AGEs spielen eine Rolle in der Pathologie verschiedener Erkrankungen wie Diabetes mellitus (Huebschmann et al., 2006), rheumatoider Arthritis, der Alzheimer’schen Erkrankung und Nephropathien (Chiarelli et al., 1999; Lee & Cerami, 1992; Bucala & Cerami, 1992). In vitro konnte nachgewiesen werden, dass AGEs in komplexen Vorgängen von großer Bedeutung sind, die kombiniert mit oxidativem Stress zu Gefäßendothelschäden, insbesondere Arteriosklerose, führen (Raj et al., 2000). Aber auch im Herzmuskel, in der Lunge und in der Leber konnten AGEs nachgewiesen werden (Sell & Monnier, 1990). Neben den endogen entstandenen AGEs existieren auch exogen formierte AGEs, deren Bildung mit Tabak (Nicholl & Bucala, 1998) und Erhitzen von Lebensmitteln (O’Brien & Morrissey, 1989) in Zusammenhang gebracht wird. Wenn Zucker wie Glukose in einer nicht-enzymatischen Reaktion mit der Aminogruppe von Proteinen reagieren, entstehen über eine Schiff’sche Base und ein Amadori-Produkt AGEs.

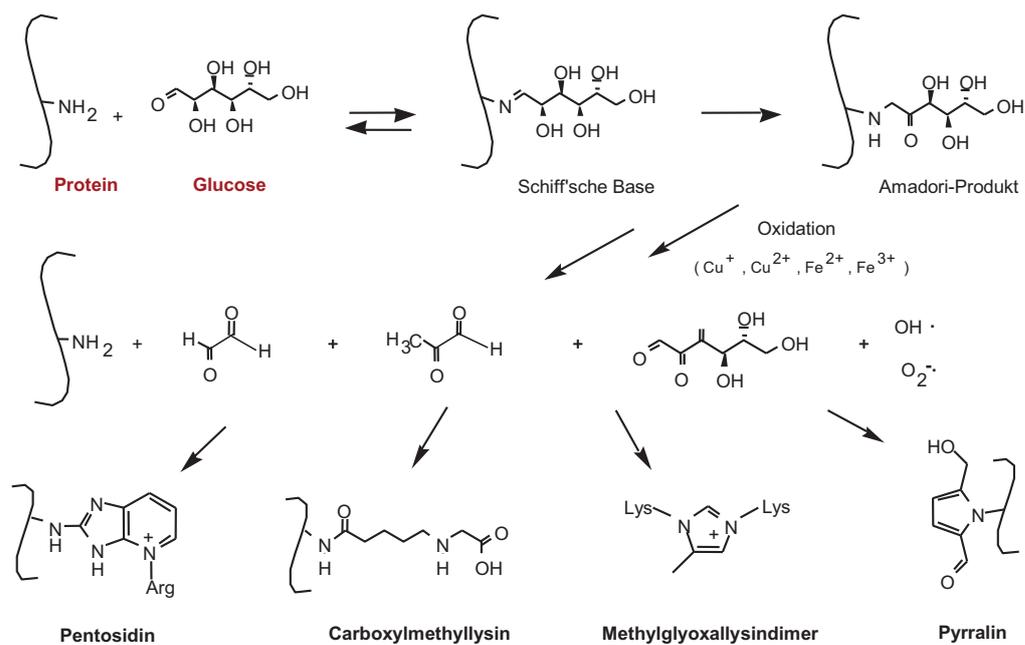


Abb. 3: Schematische Darstellung der AGE-Formation (Maillard-Reaktion).

Dieser Prozess, der auch als Maillard-Reaktion (Abb. 3) bekannt ist, wurde schon Anfang des 20. Jahrhunderts beschrieben, als man feststellte, dass Aminosäuren beim Erhitzen mit reduzierenden Zuckern eine charakteristische gelb-braune Farbe entwickelten (John & Lamb, 1993; Raj et al., 2000). Die Formation der AGEs ist unter anderem von der Glukosekonzentration im Blut und Gewebe abhängig. Glukose selbst hat die langsamste Glykierungsrate, während intrazelluläre Zucker wie Glukose-6-Phosphat oder Fruktose eine weitaus höhere Rate aufweisen (Bierhaus et al., 1998). Wenn es neben der Glykierung auch noch zu einer Oxidierung kommt, spricht man von Glykoxidation. Produkte sind zum Beispiel Pentosidin oder N^ε-Carboxymethyl-Lysin (CML) (Bierhaus et al., 1998; Miyata et al., 1997). Von Bedeutung sind auch die während der Maillard-Reaktion entstehenden reaktiven Intermediate. Die Intermediate sind als α -Dicarbonyle und Oxoaldehyde bekannt. Zu ihnen gehören Produkte wie 3-Desoxyglukoson (3-DG) oder Methylglyoxal (MGO) (Skovsted et al., 1998; Wells-Knecht et al., 1996; Baynes & Thorpe, 1999). Beide Produkte werden in nicht-oxidativen Reaktionen gebildet, wobei MGO auch beim oxidativen Abbau von mehrfach ungesättigten Fettsäuren entstehen kann (Baynes & Thorpe, 1999; Thornalley, 1996; Thornalley et al., 1995). Obwohl die Bildung von 3-DG und MGO meist nicht oxidativ erfolgt, scheinen sie paradoxerweise oxidativen Stress und Apoptose zu induzieren (Okado et al., 1996). Die heute bekannten AGEs liegen meist gebunden an Proteine wie Albumin, Hämoglobin, Krystallin der Linse oder Low-Density-Lipoprotein (LDL) vor. Im Blut sind 90% des Pentosidin und CML an Albumin gebunden und nur 10% zirkulieren in freier Form (Miyata et al., 1996). Die Stabilität der AGEs ist auf die Formation eines kovalenten Crosslinkings zurückzuführen. Die Kovalenz dieser Bindung führt zu einer erhöhten Steifigkeit der Proteinmatrix und damit zu einer erschwerten Elimination durch proteasomalen Abbau. Diese Prozesse sind im Alter verstärkt und bei Diabetes mellitus akzeleriert (McCance et al., 1993; Dyer et al., 1993; Paul & Bailey, 1999). Konsequenzen des kovalenten Crosslinkings sind Sklerose der renalen Glomeruli, Verdickung der Basalmembran von Kapillaren und Arteriosklerose (Monnier et al., 1996). Die Verdickung der Gefäßwand führt auch zu einer verminderten Endothelpermeabilität, was wiederum zur Akkumulation von Lipoproteinen in der Gefäßwand führt (Chappey et al., 1997). Die Intermediate, bei denen der kovalente Crosslink noch nicht besteht, können über ein Enzymsystem, bestehend aus Glyoxalase I und II abgebaut werden. Die Glyoxalase I katalysiert die Isomerisation eines Hemithioacethals aus α -Oxoaldehyd und Glutathion in S-2-Hydroxyacylglutathion-Derivate. Die Glyoxalase II katalysiert daraufhin die Konversion

von S-2-Hydroxyacylglutathion-Derivaten in α -Hydrohyazide und reproduziert Glutathion. Als Endprodukt dieser Reaktionen entsteht Laktat, welches über Pyruvat weiteren metabolischen Prozessen zugeführt werden kann (Thornalley, 2003). Die Eliminierung der AGEs erfolgt renal und hepatisch. AGEs werden über Rezeptoren auf Makrophagen im Gewebe aufgenommen, werden zu kleinen löslichen Peptiden umgebaut, dann ins Blut freigesetzt und über die Nieren eliminiert. Hierbei wird deutlich, dass eine normale Nierenfunktion erforderlich ist, um AGE-Akkumulationen zu vermeiden (Makita et al., 1991; Bierhaus et al., 1998). Neben der renalen Elimination können die AGEs Endozytose-vermittelt über einen Scavenger-Rezeptor aus den sinusoidalen, endothelialen und Kupffer'schen Zellen der Leber aus dem Plasma aufgenommen werden (Smedsrød, 1997). Defekte dieses Systems führen also unabhängig von der Nierenfunktion zur Akkumulation (Sano et al., 1998). Die nicht eliminierten AGEs können an den Rezeptor für AGEs (RAGE) binden und so intrazelluläre Kaskaden aktivieren.

1.1.2.3 Rezeptoren für ‚Advanced Glycation Endproducts‘ – RAGE und sRAGE

Der Rezeptor für Advanced Glycation Endproducts ist ein zellmembranständiger Rezeptor mit einem Molekulargewicht von 30-35kD und gehört zur Superfamilie der Immunglobuline (Schmidt et al., 1993; Hudson et al., 2003; Sugaya et al., 1994). Der Rezeptor besteht aus drei den Immunglobulinen ähnlichen Komponenten: einer Domäne vom V-Typ und zwei Domänen vom C-Typ (extrazellulär), einer kurzen transmembranalen Komponente und einer aus 43 Aminosäuren bestehenden intrazellulären Domäne (Neeper et al., 1992; Schmidt et al., 1992; Schmidt et al., 1994). Die Domäne vom V-Typ agiert als Ligandenbindungsstelle, während die zytosolische Komponente für die Entstehung der intrazellulären Signalkaskade verantwortlich ist. Neben dem membranständigen RAGE existiert eine lösliche RAGE-Isoform (soluble RAGE, sRAGE), welche auch AGEs binden kann und zur Detoxifikation von AGEs beiträgt. Die Abb. 4 zeigt die verschiedenen RAGE-Isoformen.

RAGE ist ein Multiligandenrezeptor, welcher eher dreidimensionale Strukturen, so wie β -Faltblätter und Fibrillen, als spezifische Aminosäuren (Bucciarelli et al., 2002; Schmidt et al., 2001) erkennt. Diese mustererkennenden Rezeptoren werden als ‚pattern recognition receptors‘ (PRR) bezeichnet (Schmidt et al., 2001; Chavakis et al., 2003). Neben AGEs binden auch Amyloid- β -Peptide, die in der Alzheimer'schen Krankheit akkumulieren (Yan et

al., 1996 und 1997), und Amyloid A, welches sich bei der systemischen Amyloidose anhäuft (Yan et al., 2000), an RAGE.

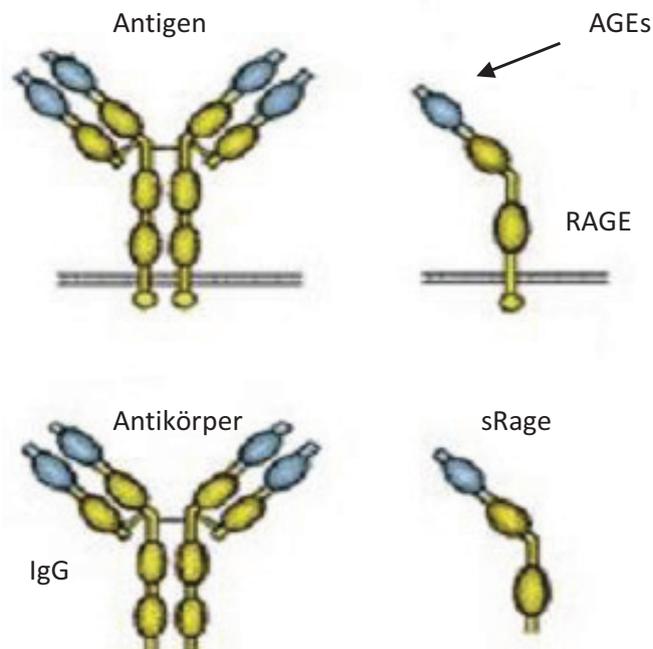


Abb. 4: Isoformen von RAGE.

Weitere Liganden für RAGE sind S100/Calgranuline, eine Gruppe von verwandten Calcium-bindenden Polypeptiden, die extrazellulär bei chronischer Inflammation in bedeutenden Konzentrationen auftreten (Hofmann et al., 1999; Marenholz et al., 2004) und das DNA-bindende Protein High-Mobility-Group-Box-1 (HMGB1, Amphoterin), das von nekrotischen Zellen freigesetzt wird (Wang et al., 1999). Außerdem wurden Interaktionen von RAGE mit Oberflächenmolekülen auf Bakterien (Chapman et al., 2002), Prionen (Sasaki et al., 2002) und Leukozyten (Chavakis et al., 2003) beobachtet. Es wird also deutlich, dass ein großes Repertoire an Liganden gebunden wird, von denen aber alle die Eigenschaft haben, in Geweben im Alterungsprozess, bei chronischen degenerativen Erkrankungen oder Inflammation zu akkumulieren (Treutiger et al., 2003). Das Binden eines Liganden an RAGE (Abb. 5) führt zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, die ERK-1/2-Kinasen (Ishihara et al., 2003), die p38 MAPK, die Stress-aktivierte Protein-Kinase/c-jun-N-Kinase (SAPK/JNK) (Hori et al., 1995; Sorci et al., 2004), rho-GTPasen, die Phosphoinositid-3-Kinasen, JAK/STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription) (Thornalley, 1998a; Taguchi et al., 2000; Huang et al., 2001), sowie TGF- β /Smad (Fukami et al., 2004) beinhalten und unter anderem in die Aktivierung von NF- κ B münden (Bierhaus et

al., 2005). Der NF- κ B-Signalweg involviert die Aktivierung der p21ras/MAP-Kinase (Lander et al., 1997). In ruhenden Zellen befindet sich NF- κ B im Zytoplasma inaktiviert und gebunden an sein Inhibitorprotein I κ B α . Bei Aktivierung wird I κ B α phosphoryliert, abgebaut und es kommt zu einer Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Zellkern (Barnes & Karin, 1997). Daraufhin bindet NF- κ B im Nukleus an ein spezifisches DNA-Motiv von etwa zehn Basenpaaren, das sogenannte κ B-Motiv, und aktiviert die Transkription von NF- κ B-regulierten Genen wie Zytokinen, Adhäsionsmolekülen, prothrombotischen und vasokonstriktorisches Genprodukten, RAGE selber und I κ B α (Barnes & Karin, 1997).

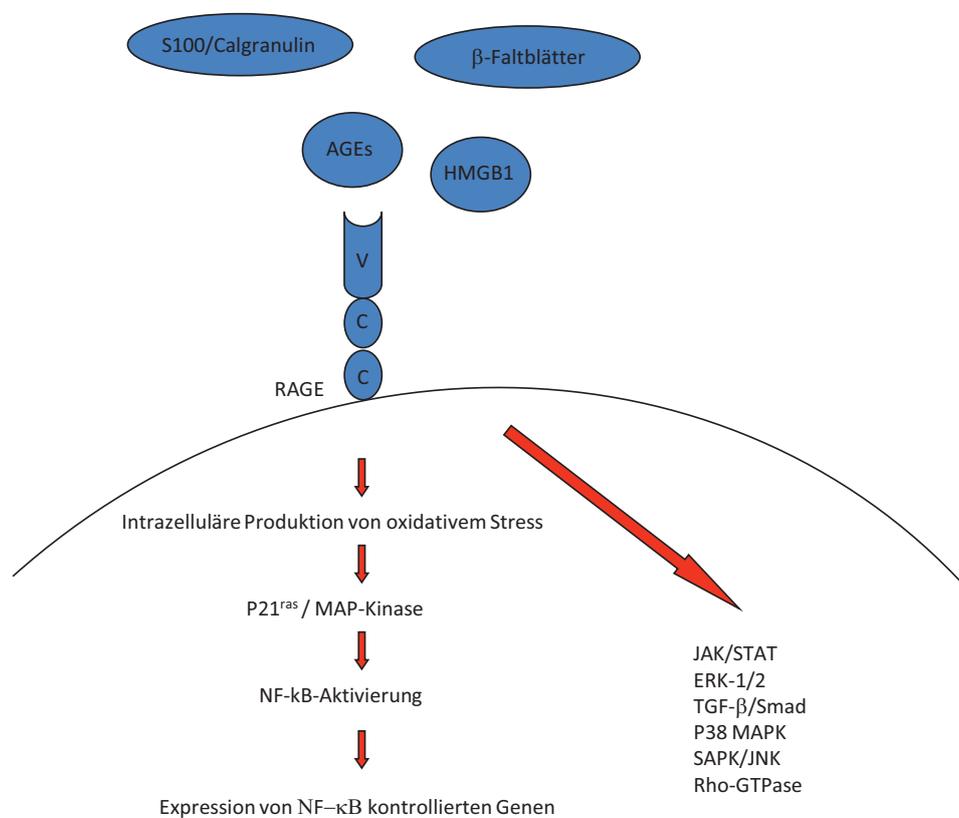


Abb. 5: Signalkaskade, welche durch RAGE-Aktivierung ausgelöst wird.

(AGEs = Advanced Glycation Endproducts, C = Immunglobulinkomponente vom C-Typ, ERK-1/2 = Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2, HMGB1 = High-Mobility-Group-Box-Protein, JAK = Janus Kinase, JNK = c-jun N-terminal Kinase, MAP = Mitogen-activated Protein, NF- κ B = Nuclear Factor kappa B, SAPK = Stress-activated Protein Kinase, STAT = Signal Transducer and Activator of Transcription, TGF- β = Tissue Growth Factor, V = Immunglobulinkomponente vom V-Typ)

Des Weiteren führt die Aktivierung von NF- κ B zu einer Hochregulierung von RAGE und Erhaltung und Verstärkung des Signals (Bierhaus et al., 2005). Außerdem induziert die

Interaktion zwischen RAGE und seinen Liganden via NADPH-Oxidase die Bildung von ROS (Lander et al., 1997; Wautier et al., 2001). Aber auch eine Vielzahl von antiapoptotischen Genen wie Bcl-X_L, Bcl-2 und das Bcl-2-homologe A1 stehen unter der Kontrolle von NF-κB (Barnes & Karin, 1997; Bierhaus et al., 2000). Gleichzeitig führt die Bindung von AGEs an RAGE dazu, dass die zelluläre Abwehr herunter reguliert wird, weil es zu einer Suppression von reduziertem Glutathion (GSH) und Ascorbinsäure kommt. Dies resultiert wiederum in erhöhtem oxidativem Stress (Lander et al., 1997; Bierhaus et al., 1997). Die Depletion von GSH hat ein vermindertes Glyoxalase-I-Recycling und eine verminderte Glyoxalase-I-Aktivität zur Folge (Thornalley, 1998a). Es wird deutlich, dass teilweise gegensätzlich wirkende Kaskaden aktiviert werden. Die Klärung dieses Antagonismus ist Gegenstand aktueller Forschung.

Wie schon erwähnt, existiert aber nicht nur der zellmembranständige RAGE, sondern auch eine lösliche Isoform sRAGE. Da diese Form frei zirkuliert und somit keine intrazellulären Kaskaden aktiviert, dient eine Bindung von Liganden an sRAGE als Schutz vor einer proinflammatorischen Antwort (Buccirelli et al., 2002; Schmidt et al., 2001).

1.2 Akutes septisches Leberversagen

Die Leber kann heute als zentrales Organ beim septischen Schock und beim Multiorgandysfunktionssyndrom (MODS) angesehen werden, da akutes Leberversagen und Sepsis häufig in einem synergistischen Zusammenhang stehen. Einerseits kann das akute Leberversagen als Fokus einer Sepsis fungieren, andererseits geht eine Sepsis häufig mit einem akuten Leberversagen einher. Eine Störung der Leberfunktion wird bei etwa 20 – 25% der Patienten im Rahmen einer schweren Entzündungsreaktion beobachtet (Kapral et al., 2005) und 60% der Patienten mit Leberversagen erfüllen die Kriterien eines ‚Systemischen Inflammatorischen Response-Syndroms‘ (SIRS) (Schmidt & Larsen, 2006). Obwohl ein Anstieg des Bilirubins im Rahmen einer schweren Sepsis im Durchschnitt erst 7 – 20 Tage nach den ersten Zeichen der Infektion beobachtet wird (Pirovino et al., 1989), zeigen sehr sensitive Nachweismethoden einer hepatischen Dysfunktion wie die Indozyangrunclearance, dass die Leberbeteiligung bei der Sepsis ein sehr frühes Ereignis darstellt (Wang et al., 1991). Dieses sehr frühe Einsetzen der Leberfunktionsstörung, mit der vor allem in den Kupffer’schen Zellen vermehrte Freisetzung von Zytokinen (Poeze et al., 2002), gab Anlass

zu der Hypothese, SIRS als Lebererkrankung bzw. als ‚Motor‘ des Multiorganversagens zu bezeichnen (Kapral et al., 2005).

1.2.1 SIRS, Sepsis und MODS

Nach neuesten Erhebungen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Kompetenznetzwerkes Sepsis (SepNet) erkranken in Deutschland pro Jahr 75 000 Menschen (110 von 100 000) an einer schweren Sepsis bzw. an einem septischen Schock und 79 000 (116 von 100 000) an einer Sepsis. Mit ca. 60 000 Todesfällen stellen septische Erkrankungen die dritthäufigste Todesursache dar. Die direkten anteiligen Kosten, die allein für die intensivmedizinische Behandlung von Patienten mit schwerer Sepsis anfallen, liegen jährlich bei ca. 1,77 Milliarden Euro. Dies entspricht 30% des intensivmedizinischen Budgets (Reinhart et al., 2006).

Die systemische inflammatorische Reaktion stellt eine uniforme Reaktion des menschlichen Organismus auf verschiedene Arten von Schädigung dar. Die häufigsten Ursachen für das SIRS sind nosokomiale Infektionen, z. B. ausgelöst durch Beatmung oder Harnwegskatheter, Pankreatitis, Schock, Polytrauma und großflächige Verbrennungen. Als Diagnosekriterien für das SIRS gelten eine Körpertemperatur $>38^{\circ}\text{C}$ oder $<36^{\circ}\text{C}$, eine gesteigerte Herzfrequenz ($>90/\text{min}$), eine Tachypnoe ($>20/\text{min}$) oder Hypokapnie ($\text{pCO}_2 <32\text{mm Hg}$) und eine Leukozytose ($>12.000\text{ Zellen}/\text{mm}^3$) bzw. Leukopenie ($<3.800\text{ Zellen}/\text{mm}^3$). Wenn mindestens zwei dieser Kriterien erfüllt sind und eine Infektion nachgewiesen werden kann, handelt es sich um eine Sepsis. Vom septischen Schock spricht man, wenn neben der Sepsis eine Hypotension mit systolischem Blutdruck $<90\text{mm Hg}$ oder mittlerem arteriellen Blutdruck $<70\text{mm Hg}$ besteht. Beim septischen Schock unterscheidet man zwischen einer hyperdynamen und einer hypodynamen Form. Die hyperdynamen Form ist charakterisiert durch sinkenden peripheren Widerstand, verminderte arteriovenöse Differenz des O_2 -Gehaltes, warme, trockene Haut, rosiges Aussehen sowie kaum veränderten Blutdruck und zentralen Venendruck (ZVD). Im Gegensatz dazu stehen bei der hypodynamen Form ein erhöhter peripherer Gefäßwiderstand, eine vermehrte arteriovenöse Differenz des O_2 -Gehaltes, eine Tachykardie und blasse feucht-kühle Haut im Vordergrund. Blutdruck, ZVD und Diurese sinken. Die schwerwiegendste Komplikation der Sepsis ist das MODS, d.h. eine Sepsis mit schweren Organdysfunktionen bis hin zum Organversagen. Als besonders

schwerwiegend gelten das akute Lungenversagen/Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) v.a. bei gramnegativer Sepsis, das akute Nierenversagen, das akute Leberversagen, die disseminierte intravasale Koagulopathie (DIC), die akute ZNS-Schädigung und die gastrointestinale Stressblutung (Herold, 2007).

1.2.2 Pathophysiologie des septischen Leberversagens

Aufgrund der ätiologischen Heterogenität und den häufig fulminanten Verläufen ist das akute Leberversagen ein komplexes Syndrom, das auch hinsichtlich der Pathophysiologie noch viele Fragen offenlässt.

1.2.2.1 Inflammation

Unabhängig von der Ursache führt eine Schädigung der Leber zu einer inflammatorischen Antwort (Ostapowicz, 2002). Sepsis und/oder Endotoxämie (Eipel et al., 2004), Ischämie/Reperfusion (Vollmar et al., 1995), Hepatotoxizität induziert durch Drogen (Lawson et al., 2000) oder Chemikalien wie Cadmium (Mousa, 2004) provozieren eine lokale und systemische Inflammation mit Aktivierung von Kupffer'schen Zellen, anderen Makrophagen und Neutrophilen, sowie Endothelzellen (Rolando et al., 2000). Die Kupffer'schen Zellen haben drei Funktionen: 1.) Phagozytose, 2.) Präsentation von Antigenen und 3.) die Freisetzung von zytotoxischen Substanzen wie ROS und proinflammatorischen Mediatoren wie TNF- α , Interleukin-1 (IL-1), die Komplementkomponente C5a und CXCL und die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen (Bilzer et al., 2006, Jaeschke et al., 2002, Rolando, 2000), welche wiederum die Chemotaxis verstärken. Die von den Kupffer'schen Zellen produzierten proinflammatorischen Mediatoren aktivieren Endothelzellen und Leukozyten. Die an den Gefäßwänden adhären Leukozyten reagieren ihrerseits mit einer gesteigerten ROS-Produktion (Vollmar & Menger, 2009). Der entstandene oxidative Stress induziert eine mitochondriale Dysfunktion, die häufig in Apoptose oder onkotischer Nekrose endet (Nieminen et al., 1997). Zusätzlich verfügen die Leukozyten in ihren zytosolischen Granula über hydrolytische Enzyme (Faurischou & Borregaard, 2003), die eine zytotoxische Wirkung auf den Hepatozyten haben (Ho et al., 1996).

1.2.2.2 Störungen der Makrozirkulation

Abgesehen von der Terminalphase ist das Leberversagen durch einen hyperdynamen Zustand gekennzeichnet. Es kommt zu einer gesteigerten Durchblutung des Splanchnikusgebietes und damit auch zu einer Steigerung der Leberperfusion. Dahn et al. fanden bei Patienten mit Sepsis eine 72%ige Zunahme des Leberblutflusses und 60%ige Zunahme des Sauerstoffverbrauches im Splanchnikusgebiet vor (Dahn et al., 1990). Allerdings besteht auch ein erhöhter Sauerstoffbedarf (Dahn et al., 1995) und daher kann es durch Zunahme des Sauerstoffbedarfes der Leber im Rahmen des septischen Geschehens im zentrolobulären Bereich zu einem kritischen Abfall der Sauerstoffkonzentration kommen, wodurch trotz Steigerung des Sauerstofftransportes eine Hypoxämie in einzelnen Abschnitten nicht ausgeschlossen werden kann (Dahn et al., 1990).

1.2.2.3 Störungen der Mikrozirkulation

Lange Zeit ging man davon aus, dass Störungen der Mikrozirkulation hauptsächlich aus einer Störung der Makrozirkulation und aus vermindertem Blutfluss durch hydroptische Endothelzellen und thrombotisches Material resultierten. Später stellte sich heraus, dass der sinusoidale Blutfluss aktiv auf der Ebene der Mikrozirkulation reguliert werden kann (Pannen, 2002). Die insuffiziente Sauerstoffversorgung der Hepatozyten führt zu einer Hemmung der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien und somit zu einer stark herabgesetzten ATP-Produktion. Fehlendes ATP führt zur Inhibition der ATP-abhängigen Na^+/K^+ -ATPase und damit zu Störungen des transmembranalen Ionentransportes und konsekutiv zu Verschiebungen des Natrium- und Chlorideinstromes. Dies wiederum führt zu dramatischen Veränderungen der Calciumhomöostase, speziell zu Hydrops und Zelltod (Belzer & Southard, 1988). Das Zusammenspiel zwischen Hypoxie und mitochondrialer Depression wurde 2005 von Ince und Mitarbeitern als ‚Microcirculatory and Mitochondrial Distress Syndrome‘ (MMDS) bezeichnet (Ince et al., 2005). Verschiedene vasoaktive Mediatoren haben Einfluss auf den Gefäßtonus, wobei Endothelin und Stickstoffmonoxid (NO) eine wichtige Rolle spielen. Endothelin kann direkt von sinusoidalen Endothelzellen, Kupffer'schen Zellen und Sternzellen als Antwort auf Hypoxie, oxidativen Stress, Zytokine und bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) freigesetzt werden und führt zur Vasokonstriktion (Urakami et al., 1997). Als Gegenspieler der Endotheline führt NO zu einer Vasodilatation (Shah & Kamath, 2003) einhergehend mit Hypotension (Vallance, 1997). Somit trägt NO zu

verschiedenen Manifestationen des septischen Schocks wie Vasoplegie, Verminderung der kardialen Kontraktilität, vaskulärer und intestinaler Hyperpermeabilität und Malperfusion im zentrolobulären Bereich der Leber bei (Spronk et al., 2004). Nach dem ‚Prinzip der letzten Wiese‘ kann die Ischämie hier zum Zelluntergang führen.

1.2.2.4 Formen des Zelltodes

Der Untergang von Hepatozyten und anderen Zellen der Leber ist die charakteristische Antwort des Organs auf Verletzungen verschiedener Genese. Zelltod kann verschiedenen Wegen folgen, entweder dem der Nekrose, dem der Apoptose, dem der Aponekrose oder dem der sekundären Nekrose (Vollmar & Menger, 2009). Nekrose ist die typische Konsequenz einer metabolischen Perturbation mit ATP-Mangel. Sie tritt z. B. bei Ischämie/Reperfusion und Drogen-induzierter Hepatotoxizität auf. Bei der Apoptose handelt es sich um einen ATP-abhängigen Zelltod (Searle et al., 1987), häufig durch einen Todesliganden und dessen Rezeptor ausgelöst, wie zum Beispiel durch Fas/Fas-Ligand-Interaktionen. Die Aktivierung dieses Liganden führt zu einer Aktivierung der Caspase-Kaskade (Kuhla et al., 2008). Während bei der Nekrose der Zellhydrops im Vordergrund steht (Majno & Joris, 1995), imponiert die Apoptose durch ein Schrumpfen und die Isolierung der Zelle (Kerr et al., 1979). Es kommt zu Kernveränderungen, Fragmentierung der DNA und Abschnürung von Zytoplasmafragmenten. Hierbei entstehen apoptotische Körperchen, die phagozytiert werden und somit nur eine sehr geringe immunstimulierende Aktivität aufweisen. Bei der Aponekrose handelt es sich um eine Mischform aus Apoptose und Nekrose. Nach Beginn der Apoptose kommt es zu ATP-Depletion, die dazu führt, dass die Apoptose in Nekrose übergeht. Von sekundärer Nekrose spricht man, wenn die untergegangene Zelle nicht in apoptotische Körperchen zerfällt, sondern formiert bleibt und proinflammatorische Reaktionen hervorruft (Vollmar & Menger, 2009). Mitochondriale Dysfunktionen führen häufig zu einem Zelluntergang, welcher durch verschiedene Arten des Zelltodes geprägt ist (Jaeschke & Lemasters, 2003). Die Prävention von Zelltod spielt eine wichtige Rolle bei Therapiemöglichkeiten. Allerdings ist bei Leberversagen häufig schwierig festzustellen, welche Zelltodesart dominiert.

1.2.3 Therapiemöglichkeiten und Prognose

Die Therapie der Sepsis fußt auf den drei Säulen, nämlich der kausalen, der supportiven und der adjunktiven Therapie. Der wichtigste Punkt der kausalen Therapie ist die Fokussanierung. Hierbei ist die interdisziplinäre Zusammenarbeit zwischen Chirurg und Intensivmediziner unabdingbar. Neben der chirurgischen Intervention steht eine Antibiotikatherapie im Vordergrund. Hämodynamische Stabilisierung und ‚Airway Management‘ bilden die Basis der supportiven Therapie. Des Weiteren gehören Thromboseprophylaxe, Insulintherapie, Immunonutrition, Ulkusprophylaxe und Nierenersatzverfahren dazu. Unter adjunktiver Therapie versteht man eine zur Standardtherapie zusätzliche Behandlung. Von großer Bedeutung sind hierbei niedrigdosierte Glukokortikoide und rekombinantes aktiviertes Protein C (Reinhart et al., 2006).

Liegt ein akutes Leberversagen vor, sollten die Patienten frühzeitig in ein Transplantationszentrum verlegt werden, da 50% der Patienten auf einen Lebertransplantation angewiesen sind (Lo, 2008; Herold, 2007). Die Indikation zur Transplantation wird mit Hilfe spezieller Prognosescores gestellt. Bei potenziell reversiblen akuten Leberversagen sollte ein temporärer Ersatz der Leberfunktion erfolgen, bis die Leber sich regeneriert hat. Eine Möglichkeit stellt die auxiliäre partielle orthotope Lebertransplantation (APOLT) dar. Hierbei wird der linke Leberlappen des Patienten durch ein Spendertransplantat ersetzt (Jaeck et al., 2002). Eine Überbrückungsmaßnahme bis zur Lebertransplantation, die noch in klinischer Erprobung ist, stellt die Hepatozytentransplantation dar (Strom et al., 1997). Die Prognose ist von der Ätiologie, dem Alter und den Vorerkrankungen abhängig. Fulminante Verläufe haben eine bessere Prognose als protrahierte und leichte Enzephalopathiegrade wirken sich günstig aus. Indiz für eine bessere Prognose sind unter anderen ein Abfall des Hepatozyten-Wachstumsfaktors (HGF) und ein Anstieg des α -Fetoproteins. Trotz der Therapiemöglichkeiten liegt die Letalität des akuten Leberversagens auch heute noch bei > 70%. Häufigste Todesursache ist das Hirnödem (Herold, 2007).

1.3 Endotoxinämiemodell

Das durch die Kombination von Galaktosamin (Gal) und Lipopolysaccharid (LPS) induzierte akute Leberversagen ist ein anerkanntes und vielversprechendes Modell zur Aufklärung von inflammatorischen Lebererkrankungen und für die Evaluation der Effizienz von hepatoprotektiven Medikamenten (Hase et al., 1999).

1.3.1 D-Galaktosamin (Gal) und Lipopolysaccharid (LPS)

LPS ist ein Bestandteil der bakteriellen Zellwand. Es ist eine häufig verwendete Substanz, um ein septisches Leberversagen zu initiieren. Da Nagetiere 100mal weniger sensibel auf LPS reagieren als Menschen, werden sie häufig mit dem Aminozucker Galaktosamin (Gal) vorbehandelt (Redl et al., 1993). Die Kombination von Gal/LPS führt zu einem 10.000fach höheren Anstieg des Zytokins TNF- α im Vergleich zur alleinigen Gabe von Galaktosamin (Leist et al., 1995). Da Gal in Nagetieren ausschließlich von der Leber eliminiert wird (Decker & Keppler, 1974), führt es zu einer selektiven Depletion von Uridinnukleotiden im Organ und damit zu einer hepatischen Transkriptions- und Translationsblockade (Anukarahanonta et al., 1973). Hohe Dosen des Aminozuckers führen zu einer fulminanten Hepatitis, die einer viralen Hepatitis gleicht (Keppler et al., 1968). Da die Blockade der Proteinsynthese alleine nicht das Leberversagen zu erklären vermag (Farber, 1971), wurde die Hypothese aufgestellt, dass Gal auch für die Anfälligkeit gegenüber anderen inflammatorischen Stimuli sensibilisiert, zum Beispiel für intestinale Endotoxine. Diese These beruht darauf, dass Gal zu einer portalen Endotoxämie führt (Grün et al., 1976) und dass einer Gal-Hepatitis durch Kolektomie (Grün et al., 1976), Neutralisation der Endotoxine mit Polymyxin B (Mihas et al., 1990), mit anti-LPS-Antikörpern (Czaja et al., 1994) oder durch Induktion einer Toleranz gegenüber Endotoxinen in Nagetieren (Grün et al., 1976) vorgebeugt werden konnte.

LPS ist eine Komponente der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien. Es gehört zu den Toxinen, die in Lage sind, eine Kaskade von pathophysiologischen Reaktionen auszulösen, die in einem sogenannten Endotoxin-Schock enden. Im Blut wird LPS durch das LPS-bindende Protein (LBP) transportiert (Nakamura et al., 2000), welches von Hepatozyten

gebildet wird und während einer Akute-Phase-Reaktion um das 100fache ansteigen kann (Berczi, 1998). Beim LPS handelt es sich um ein hitzestabiles, amphiphiles Glykolipid, das aus einem hydrophoben Lipidanteil (sog. Lipid A) und einer kovalent gebundenen hydrophilen Polysaccharidregion besteht. Es bildet eine für die Stabilität der Bakterienzelle essentielle Permeabilitätsbarriere. Der Lipid A-Anteil fungiert als entscheidendes Zentrum zur Stimulation des Immunsystems (Alexander & Rietschel, 2001). Auf der Oberfläche von Neutrophilen, Monozyten, Lymphozyten und Makrophagen bindet LPS an CD14 und den Toll-like-Rezeptor (TLR4), was zu einer Produktion von inflammatorischen Zytokinen, bioaktiven Molekülen wie TNF- α , IL-1 und IL-6, Proteasen und NO führt. Die exzessive Produktion von Zytokinen ist ausschlaggebend für die Initiierung des endotoxischen Schocks (Underhill & Ozinsky, 2002; Medzhitov, 2001). Der hepatotoxische Effekt bei Gal/LPS wird durch Makrophagen vermittelt (Shiratori et al., 1990). Es konnte nachgewiesen werden, dass das Ausmaß des Leberversagens und die Letalität von durch Makrophagen freigesetztem TNF- α abhängig ist (Lehmann et al., 1987). Die alleinige Gabe von Gal führt zu einer moderaten Granulakondensation des Zytoplasmas und zu einer hepatozellulären Steatosis. Auch die alleinige Gabe von LPS führt im Wesentlichen nur zu einer Steatosis hepatis mit einer milden Infiltration von Granulozyten, während hingegen die Kombination aus Gal/LPS zu einer signifikanten Erhöhung der intrazellulären DNA-enhaltenden apoptotischen Körperchen, sowie zu einer Erhöhung der Nuklei mit Chromatinkondensation führt. Diese für Apoptose sprechenden Zeichen werden von milder Nekrose mit Karyorrhesis und Kernpyknose sowie einer leichten Infiltration von Neutrophilen begleitet. Nach acht Stunden überwiegt die Nekrose mit massiver Neutrophileninfiltration und der Agglutination von Erythrozyten (Leist et al., 1995).

1.4 Ziele der Arbeit und Fragestellung

Ziel dieser experimentellen Studie war es zu untersuchen, welche Rolle oxidativer Stress auf die Glykierung von Proteinen und das Binden an deren Rezeptoren und dessen Detoxifikation in einem in vivo Modell des akuten Leberversagens spielt und die Frage zu klären, inwieweit hierbei eine Altersabhängigkeit besteht.

Folgende wesentliche Fragestellungen wurden untersucht:

- Inwieweit beeinflusst die Defizienz von UCP2 die Bildung von oxidativem Stress?
- Hat die Höhe des oxidativen Stresses Einfluss auf die Bildung von AGEs?
- Spielen AGEs und der Rezeptor RAGE eine Rolle im septischen Leberversagen?
- Wenn ja, führt die Blockierung von RAGE durch rRAGE zu einem protektiven Effekt und zu einem verbesserten Überleben im septischen Leberversagen?
- Nimmt oxidativer Stress im Alter zu und wenn ja, verändert sich auch die Expression von AGEs und RAGE?
- Verändert der Alterungsprozess die hepatische Vulnerabilität gegenüber inflammatorischen Stimuli?
- Nimmt die Menge von sRAGE im Alter ab und wenn ja, ist Substitution eine therapeutische Option?
- Kann rRAGE als Therapieansatz im septischen Leberversagen diskutiert werden?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden weibliche juvenile (6-8 Wochen), adulte (36-38 Wochen) und senescente (72-76 Wochen) UCP2-kompetente (UCP2 +/+) und UCP2-defiziente (UCP2 -/-) Tiere (zur Verfügung gestellt von Daniel Ricquier und Bruno Miroux, CNRS UPR 9078, Medical Faculty Necker-Enfants-Malades, Paris, Frankreich) verwendet. Die Tiere wurden vor Beginn der Untersuchungen für einige Tage in einem klimatisierten Raum (Temperatur 22-24°C, Luftfeuchtigkeit ca. 60%) der Versuchstierhaltung des Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock unter Bereitstellung von Wasser und Standardlaborfutter (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) ad libitum gehalten. Sämtliche Tierversuche wurden entsprechend dem Tierschutzgesetz und der Nutzerordnung der Zentralen Versuchstierhaltung der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock durchgeführt.

2.2 Tierexperimentelles Modell

2.2.1 Tierexperimentelle Gruppen und Behandlung

Das Experiment beinhaltete drei Versuchsabschnitte mit verschiedenen Gruppen je sieben Tiere. Bei den Überlebensstudien befanden sich in jeder Gruppe zehn Tiere.

1. Versuchsabschnitt:

Der Gruppe der UCP2 +/+ und der Gruppe der UCP2 -/- Tieren wurde sechs Stunden nach intraperitonealer Gabe von 0,9%iger-Kochsalzlösung Blut abgenommen. Des Weiteren wurde Lebergewebe asserviert, um den Phänotyp von UCP2 -/- und UCP2 +/+ zu charakterisieren.

2. Versuchsabschnitt:

Zur Induktion eines akuten Leberversagens erhielten die Tiere sechs Stunden vor Blutentnahme und Gewebeasservierung eine intraperitoneale Injektion von D-Galaktosamin (Gal; 720 mg/kg KG, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und des Lipopolysaccharids von *Escherichia coli* (LPS; 10µg/kg KG; Serotyp 0128:B12, Sigma-Aldrich).

Einer weiteren Gruppe wurde 12 Stunden vor Induktion eines Leberversagens 10 µg recombinant mouse rRAGE (R&D Systems, Wiesbaden Nordenstadt, Deutschland) intraperitoneal verabreicht.

3. Versuchsabschnitt:

Beim dritten Versuchsabschnitt handelt es sich um eine Altersstudie. Juvenile, adulte und seneszente Tiere wurden miteinander verglichen. Hier wurden die Tiere den gleichen Behandlungen wie in Versuchsabschnitt 1 und 2 unterzogen.

Des Weiteren wurden Überlebensstudien mit den gleichen Gruppen wie in Versuchsabschnitt 2 und 3 durchgeführt. Den Tieren, die 24 Stunden nach Induktion des akuten Leberversagens nicht verstorben waren, wurde unter Kombinationsnarkose aus 75 mg/kg KG Ketamin (Ketamin[®], Betapharm GmbH & Co. KG, Vechta, Deutschland) und 25 mg/kg KG Xylazin (Rompu[®], Bayer Vital GmbH, Bayer HelathCare, Deutschland) Blut abgenommen und die Leber wurde asserviert.

2.3 Untersuchungstechniken

2.3.1 Entnahme von Blut und Gewebe

Durch Punktion der Vena cava inferior wurde den Mäusen Blut abgenommen und in Ca²⁺-EDTA-beschichtete Röhrchen gefüllt. Nachdem ein Blutbild angefertigt worden war, wurde die Probe für zehn Minuten mit 3400 x g in einer GS15 Zentrifuge (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) zentrifugiert, das Plasma abpipettiert und bei -20°C gelagert. Die Leber wurde entnommen, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C aufbewahrt. Für die Anfertigung des Blutbildes wurde der Blutanalyseautomat Sysmex KX21 (Sysmex Corporation, Japan) verwendet. Die folgenden drei Hauptparameter wurden erhoben: Erythrozyten (red blood cells, RBC), Leukozyten (white blood cells, WBC, Lymphozyten, Neutrophile) und Thrombozyten. Die Angaben erfolgten in Internationalen Einheiten.

2.3.2 Vollblut- und Serumanalytik

2.3.2.1 Bestimmung von Glukose

Die Blutzuckermessung dient der Bestimmung der Glukose im Blut, die für die Formation von AGEs essentiell ist. Hierfür wurde den Mäusen mit einer Kapillare (No./REF 19447 20µl K2 EDTA, SARSTEDT Aktiengesellschaft & Co, Nümbrecht, Deutschland) retrobulbär Blut abgenommen und in ein EDTA-beschichtetes Röhrchen gefüllt. Dann wurde die Glukosekonzentration mit einem Glukometer (Glucometer Elite, Bayer Diagnostics GmbH, München, Germany) bestimmt. Die Angaben erfolgten in mmol/l.

2.3.2.2 Bestimmung der leberspezifischen Enzyme

Zur Messung verschiedener laborchemischer Parameter wurde der Hitachi 704 Automatic Analyzer verwendet (Boehringer, Mannheim, Deutschland). Die Alaninaminotransferase (ALAT), die Glutamat-Pyruvat-Transaminase, die Aspartataminotransferase (ASAT) und auch die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase gehören zu einer Gruppe von Transaminasen, die die Umwandlung verschiedener Aminosäuren in die dazugehörigen α -Ketosäuren durch den

Transfer von Aminogruppen katalysieren. Die Plasmaaktivität dieser Transaminasen gilt als Indikator für eine hepatozelluläre Schädigung. ALAT und ASAT wurden photometrisch bestimmt. Die Angaben erfolgten in U/l. Alle nötigen Reagenzien wurden von einem Produzenten bezogen (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland).

2.3.2.3 Bestimmung der GSH/GSSG Ratio

Glutathion (GSH) gehört zu den wichtigsten Antioxidanzien im Organismus von Säugetieren. Seine Funktion ist es, zelluläre Makromoleküle wie Proteine und Membranlipide vor reaktiven Sauerstoffspezies zu schützen. Dabei wird Glutathion oxidiert und geht von seiner monomeren Form in das GSH-Dimer (GSSG) über. Durch das Enzym Glutathion-Reduktase können aus GSSG unter Verbrauch von NADPH wieder zwei reduzierte GSH entstehen. Wenn Zellen oxidativem Stress ausgesetzt sind, sinkt das Verhältnis GSH/GSSG aufgrund der GSSG-Akkumulation. Die GSH/GSSG-Ratio ist somit ein Marker für oxidativen Stress. Zur Bestimmung des Verhältnisses von GSH/GSSG wurde ein vorgefertigter Kit verwendet (BIOXYTECH GSH/GSSG-412, OxisResearch, California, USA).

Verwendete Materialien:

- Assay Puffer (NaPO₄ mit EDTA)
- GSSG Puffer (NaPO₄ mit EDTA)
- Enzym [Glutathion-Reduktase (GR) in NaPO₄ mit EDTA]
- NADPH (Nikotinamidadenindinukleotidphosphat mit Tris Base und Mannitol)
- Scavenger [1-Methyl-2-Vinyl-Pyridium-Trifluoromethan-Sulfonat (M2VP)] in HCl
- Chromogen [5,5-Dithiobis-2-Nitrobenzoic Säure (DTNB)] in NaPO₄ mit EDTA und Ethanol
- Standards (GSSG in KPO₄-Puffer mit EDTA)
- 5% Metaphosphoric Acid (MPA, Metaphosphor-Säure)
- Spektrophotometer
- Zentrifuge
- 96-Kavitäten-Platte
- Tubes
- Pipetten

MATERIAL UND METHODEN

Für die GSSG-Probe wurden 10 µl M2VP und 100 µl Vollblut im Verhältnis 1:10 gemischt. Diese Probe wurde bei -80°C eingefroren, aufgetaut und dann für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 290 µl 5%igem MPA wurde die Probe für 15 Sekunden vermischt und bei 1000 x g 10 Minuten zentrifugiert. Vom Überstand wurden 50 µl entnommen und mit 700 µl GSSG-Puffer vermischt.

Für die GSSG-Leerprobe wurden 50 µl MPA mit 700 µl GSSG-Puffer vermischt. Für die GSH-Probe wurden 50 µl Vollblut bei -80°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde die Probe mit 350 µl 5% MPA versetzt, mit dem Blut vermischt und, vergleichbar der GSSG-Probe, zentrifugiert. Danach wurden 50 µl der Probe mit 3 ml Assay Puffer vermischt.

Für den Assay wurden jeweils 50 µl des Standards, der Leerprobe oder einer Probe auf eine 96-Kavitäten-Platte pipettiert. Danach wurden jeweils 50 µl Chromogen und 50 µl Enzym hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten bei Raumtemperatur wurde jeder Kavität noch 50 µl NADPH beigefügt. Danach wurde die Absorption bei 412 nm für drei Minuten bestimmt.

Die Berechnung der GSH- und GSSG-Konzentrationen und der GSH/GSSG-Ratio erfolgte in vier Schritten:

1. Bestimmung der Reaktionsrate
2. Erstellung der Kalibrierungskurven
3. Berechnung der Analysekonzentrationen
4. Berechnung der GSH/GSSG-Ratio

Bei der Bestimmung der Reaktionsrate gilt, dass die Veränderungen in der Absorption bei 412 nm (A_{412}) eine lineare Funktion der GSH-Konzentration ergeben,

$$A_{412} = \text{Steigung} * \text{Minuten} + \text{y-Achsenabschnitt}$$

wobei die Steigung der Regressionsgleichung mit der Reaktionsrate identisch ist.

Für die generelle Gleichung der Kalibrierungskurve gilt:

$$\text{Netto-Rate} = \text{Steigung} * \text{GSH} * \text{y-Achsenabschnitt}$$

Daraus folgt also, dass für die Berechnung der Analysekonzentrationen der GSH-Kalibrierungskurve gilt:

$$\text{GSH} = \frac{\text{Netto-Rate} - \text{y-Achsenabschnitt}}{\text{Steigung}} * \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die GSH/GSSG-Ratio wird dann durch Division der Differenz von GSH- und 2 GSSG-Konzentrationen durch die GSSG-Konzentration berechnet.

$$\text{Ratio} = \frac{\text{GSH} - 2 \text{GSSG}}{\text{GSSG}}$$

2.3.2.4 Bestimmung von Malondialdehyd

Malondialdehyd (MDA) ist ein Endprodukt des oxidativen Fettsäureabbaus und damit ein labordiagnostischer Marker für die Lipidperoxidation. Zur Lipidperoxidation kommt es, wenn freie Radikale die körpereigenen Schutzmechanismen überwinden und mit ungesättigten Fettsäuren reagieren. Die Bestimmung wurde mit dem BIOXYTECH MDA-586-Assay (Spectrophotometric Assay for Malondialdehyde, Oxis Research, California, USA) durchgeführt. Die MDA-586 Methode basiert auf der Reaktion des chromogenen Reagenz N-Methyl-2-Phenylindon (R1, NMPI) mit MDA bei 45°C. Ein Molekül MDA reagiert mit zwei Molekülen NMPI und bildet einen stabilen Carbocyaninfarbkomplex mit einer maximalen Absorption bei 586 nm.

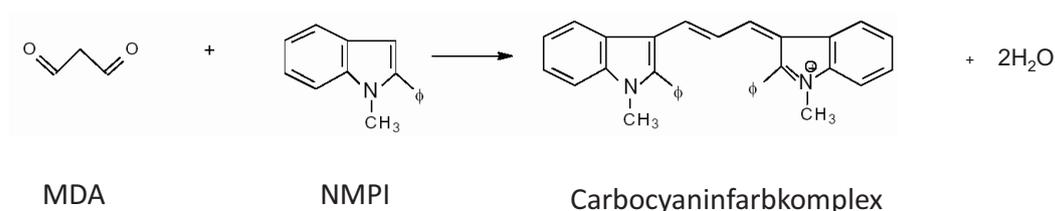


Abb. 6: Reaktionsgleichung von MDA mit NMPI.

Verwendete Materialien:

- Reagenz R1 N-Methyl-2-Phenylindol, in Acetonitril
- Reagenz R2 konzentrierte Salzsäure
- MDA Standard 1,1,3,3-Tetramethoxypropan (TMPO) in Tris-HCl
- BHT BHT (butylated hydroxytoluene) in Acetonitril
- ProbucoI ProbucoI in Methanol
- Methanol
- Spektrophotometer
- Küvetten
- Zentrifuge

Tab. 1: Volumina für das Erstellen einer Standardkurve.

Standardvolumen bei 20 µM, µL	0	25	50	100	150	200
Wasservolumen, µL	200	175	150	100	50	0
Endkonzentration, µM	0	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0

Zunächst wurde eine Standardkurve angelegt (Tab. 1). Für das Anlegen einer Standardkurve wurden die oben angegebenen Volumina des Standards und von Wasser in ein Tube pipettiert. In jedes Tube wurden 10 µl ProbucoI pipettiert und 200 µl der Probe (Plasma) hinzugefügt. Nach Zugabe von 640 µl des verdünnten Reagenz R1 wurde die Probe stark geschüttelt. Daraufhin wurden 150 µl R2 hinzugefügt. Nach wiederholtem Mischen wurden die Proben für 1 Stunde bei 45°C inkubiert, dann 10 Minuten bei 10000 x g zentrifugiert und der klare Überstand wurde in eine Küvette transferiert. Die Absorption wurde bei 586 nm gemessen.

Unter Verwendung der Daten des Standards wurde eine Regressionsgerade erstellt:

$$A_{586} = a[\text{MDA}] + b$$

Danach wurde die Konzentration des Analysats in der Probe bestimmt:

$$[\text{MDA}] = \frac{A_{586} - b * \text{df}}{a}$$

Hierbei gilt:

[MDA] = Konzentration von MDA in der Probe

A_{586} = Absorption der Probe bei 586 nm

a = Regressionskoeffizient (Steigung)

b = y-Achsenabschnitt (intercept)

df = Verdünnungsfaktor der Probe (dilution factor)

2.3.2.5 Bestimmung der Glyoxalase-I-Aktivität

Die Glyoxalase-I ist ein Enzym, das in der Lage ist, Vorstufen von AGEs zu Laktat und dann zu Pyruvat zu verstoffwechseln. Zur Messung der Glyoxalase-I-Aktivität im Lebergewebe wurde das Hemithioacetal Methylglyoxal als Substrat verwendet.

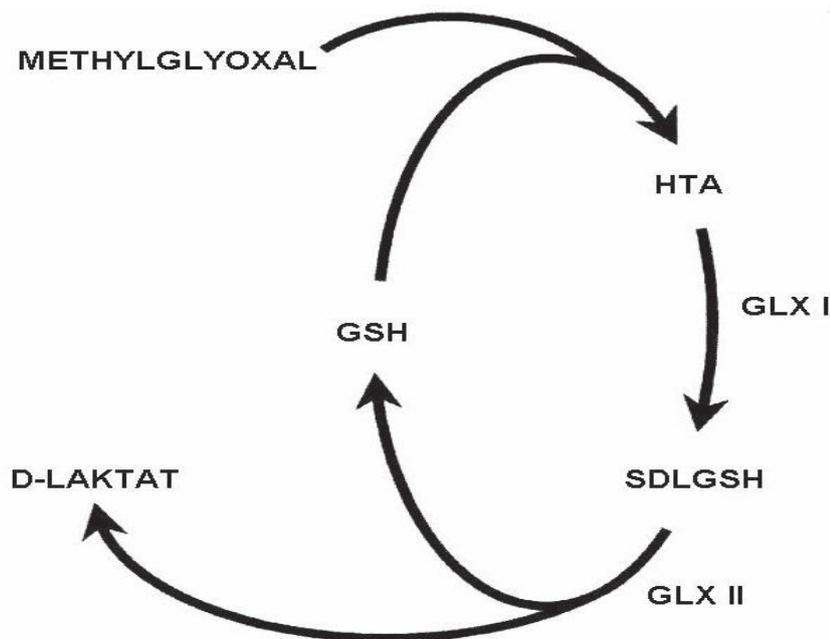


Abb. 7: Zusammenspiel zwischen den Glyoxalasen und Glutathion.

(GLX I = Glyoxalase I, GLX II = Glyoxalase II, GSH = Glutathion, HTA = Hemithioacetal, SDLGSH = S-D-Laktoylglutathion)

(Modifiziert nach <http://www.biochemsoctrans.org/bst/031/1409/bst0311409a02.gif>)

2 μmol MGO und 2 μmol Glutathion, beide in Natrium-Phosphat-Puffer (50 mM, pH 6,6, 995 μl) vorliegend, wurden bei 37°C für 10 Minuten inkubiert, um das Hemithioacetal zu bilden. 5 μl Gewebeeextrakt, das auf Eis aufgetaut worden waren, wurden hinzugefügt und nach Vermischen in eine Quarz-Küvette überführt. Dann wurde im Spektrophotometer der Anstieg der Absorption bei 240 nm ($\Delta\varepsilon = 2,86 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) gemessen. Die spezifische Aktivität der Glyoxalase-I wurde durch Division der totalen Glyoxalase-I Aktivität durch die verwendete Proteinmenge berechnet.

2.3.3 Molekularbiologische Untersuchungen

2.3.3.1 Bestimmung der AGE-, RAGE- und cleaved Caspase-3-Expression mittels Western Blot Analyse

Die Western Blot Analyse stellt eine Methode zur Detektion von Proteinen dar. Um AGEs, RAGE und die cleaved Caspase-3 in Lebergewebe nachzuweisen, wurde das bei -80°C gelagerte Gewebe in Lysispuffer homogenisiert (10 mM Tris pH 7,5, 10 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,5% Triton-X 100, 0,02% NaN_3 , 0,2 mM PMSF), für 30 Minuten auf Eis inkubiert und für 15 Minuten bei $10000 \times g$ zentrifugiert. Das Gewebepellet wurde verworfen und die Proteinkonzentration im Überstand mittel BCA-Kits (Pierce, Rockeford, USA) bestimmt. Bei dieser Methode kommt es zur Reaktion von Cu^{2+} -Ionen in Gegenwart von Proteinen in alkalischer Lösung, wobei die gebildeten Cu^{2+} -Ionen mit Bicinchoninsäure (BCA) einen farbigen Komplex bilden. Je 10 μl einer Proteinlösung und 100 μl des BCA-Reagenzes wurden in einer 96-Kavitäten-Platte 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend wurde die Absorption bei 562 nm / 620 nm gemessen. Aus dem Mittelwert einer Dreifachbestimmung wurden die Proteinkonzentrationen ermittelt. Als Standard wurde bovines Serumalbumin (BSA) in den Konzentrationen von 2-0,1 mg/ml verwendet.

Im Rahmen der Western Blot Analyse werden Proteine auf eine Trägermembran übertragen („geblottet“), um sie mittels Antikörper detektierbar zu machen. Hierzu wird das Proteingemisch der eingesetzten Proben zunächst mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Membran transferiert. Der Proteinnachweis erfolgt schließlich durch das Aufbringen spezifischer Primär- und Sekundärantikörper. Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach ihrer Größe mit Hilfe der Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Grundlage dieser Methode ist eine aus Acrylamid und Bisacrylamid bestehende Gelmatrix, in der Acrylamid unter Anwesenheit von Radikalen in einer Kettenreaktion lange Polymere bildet, die durch Bisacrylamid vernetzt werden. Als reaktionsbeschleunigend wirken hierbei N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) und das Radikal Ammoniumperoxodisulfat (APS). Das im Überschuss zugefügte Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat) bindet an die Proteine, die so negativ geladen und im angelegten elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Um eine optimale Bandenschärfe im untersuchten Größenbereich zu erzielen, wird die Elektrophorese diskontinuierlich durchgeführt. Hierzu wird die Gelmatrix in zwei horizontal getrennte Bereiche, das weitporige Sammelgel und das engporige Trenngel, eingeteilt. Für die

Herstellung von SDS-PAGE-Gelen wurden zwei unterschiedlich große Glasplatten mit 1,5 mm Abstandhalter verwendet und in eine Apparatur zum Gelgießen eingespannt. Nach dem Gießen der Trenngele wurden diese mit Isopropanol überschichtet und eine Stunde zum Polymerisieren bei Raumtemperatur belassen. Isopropanol wurde durch intensives Spülen mit Aqua dest. entfernt. Anschließend wurden die Trenngele mit der Sammelgellösung überschichtet und Taschenschablonen zwischen die Glasplatten gesetzt. Die Gele wurden in die mit SDS-Elektrophoresepuffer gefüllte Elektrophoreseapparatur (Mini-PROTEAN 3 Cell, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) eingebaut und anschließend die Taschenschablonen aus den Sammelgelen entfernt. Es wurden jeweils 40 µg Zelllysat mit einem gleichen Volumen SDS-Probenpuffer vermischt. Die Proben wurden auf 95°C für 10 min erhitzt, so dass die Proteine denaturierten, abgekühlt und in die Geltaschen gefüllt. Ein Proteinmarker, der den jeweiligen kDa-Bereich abdeckt und zur Größenbestimmung der Proteine dient, wurde jeweils in die erste Geltasche pipettiert. Die Proteine wurden für ca. 1,5 Stunden bei 120 V nach ihrer Größe aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mittels Semi-Dry-Blot auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (Immobilon-P, Millipore, Eschborn, Deutschland) transferiert. Das Blotten im Blotpuffer erfolgte bei 0,25 A für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit einer Blotapparatur (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland). Nach dem Transfer wurden die Membranen in Tris-Buffered Saline and Tween (TBST) gründlich gespült und für eine Stunde in Blockierlösung (2,5%igem bovinem Serumalbumin (BSA), Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) inkubiert. Die Membranen wurden mit dem jeweiligen Antikörper (Tab. 2 und 3), der in Blockpuffer verdünnt wurde, über Nacht bei 4°C auf dem Taumler (Heidolph Duomax 2030, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland) inkubiert. Die Membranen wurden mit Waschpuffer dreimal für zehn Minuten gespült und mit dem sekundären Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für fünf Minuten mit TBST gewaschen und mit „enhanced“ Chemolumineszenz-Lösung (ECL plus, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) inkubiert und mit dem ChemiDoc™ XRS System (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) digitalisiert. Die Signale wurden densitometrisch gemessen (Quantity One; Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) und mit den der β -Aktin-Signale (Monoklonaler Maus-Anti- β -Aktin-Antikörper; 1:20000; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) verglichen.

Tab. 2: Verwendete primäre Antikörper für die Western Blot Analysen.

Primäre Antikörper	Verdünnung	Firma
Maus-polyklonaler-anti-AGE-Antikörper	1:2000	AGE612HRP; Biologo, Kronshagen, Deutschland
Kaninchen-polyklonaler-anti-cleaved-Caspase-3-Antikörper	1:1000	Asp 175; Stressgen Biotech, San Diego, CA, USA
Ziege-polyklonaler-anti-RAGE-Antikörper	1:500	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland

Tab. 3: Verwendete sekundäre Antikörper und Konjugate für die Western Blot Analysen.

Sekundäre Antikörper	Konjugat	Verdünnung	Firma
Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (bei cleaved Caspase-3)	HRP	1:2000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Esel-anti-Ziege-Antikörper (bei RAGE)	HRP	1:5000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

2.3.3.2 Bestimmung von sRAGE mittels ‚Enzyme Linked Immunosorbent Assay‘

Bei der ‚Enzyme Linked Immunosorbent Assay‘ (ELISA) handelt es sich um eine Methode zur Bestimmung der Konzentration von Antigenen oder Antikörpern. Das Prinzip der Methode besteht darin, dass die zu untersuchende Substanz (z.B. ein Antigen) an einer festen Oberfläche, die mit einem spezifischen Antikörper besetzt ist, gebunden und konzentriert wird. Danach wird ein zweiter Antikörper zugegeben, der mit einem Enzym markiert ist, das für einen colorimetrischen Nachweis benutzt werden kann. Üblicherweise verwendet man alkalische Phosphatase oder Peroxidase. Durch einen entsprechenden Farbnachweis kann die Konzentration der zu untersuchenden Substanz ermittelt werden, wobei auch sehr geringe Mengen erfasst werden können.

Zur Bestimmung von sRAGE wurde ein vorgefertigtes Kit verwendet (R&D Systems Europe, Ltd., Abingdon, UK).

Verwendete Materialien:

- Capture Antikörper
- Detektions-Antikörper

- Standard
- Streptavidin-HRP (horseradish-peroxidase)
- PBS
- Waschpuffer
- Verdünnungsreagenz (Reagent Diluent)
- Substratlösung
- Stopplösung
- 96-Kavitäten-Platte
- Pipetten

Nachdem 100 µl verdünnter Capture Antikörper (1 µg/ml PBS) auf einer 96-Kavitäten-Platte über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert worden war, wurde jede Kavität abgesaugt und dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Mit 300 µl Verdünnungsreagenz wurde jede Kavität geblockt und für eine Stunde inkubiert. Danach wurden die Kavitäten erneut abgesaugt und dreimal gewaschen. In jede Kavität wurden 100 µl Standard oder Probe pipettiert, mit einem Klebestreifen abgedeckt und bei Raumtemperatur für zwei Stunden inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde jeder Kavität 100 µl verdünnter Detektions-Antikörper hinzugefügt. Die Platte wurde wieder zwei Stunden inkubiert und gewaschen. Als nächstes erfolgte eine 20minütige Inkubation mit verdünntem Streptavidin-HRP und nach wiederholtem Waschen eine weitere 20minütige Inkubation mit 100 µl Substratlösung. Als letzten Schritt wurden 50 µl Stopplösung zu jeder Kavität hinzugefügt. Danach wurde die Absorption bei 450 nm bestimmt. Anhand einer Standardkurve wurden die Ergebnisse kalkuliert.

2.3.4 Histologie und Immunhistochemie

2.3.4.1 Hämatoxylin-Eosin

Das Lebergewebe wurde in 4%igem Formalinphosphatpuffer fixiert und nach zwei bis drei Tagen in Paraffin eingebettet. Von diesen in Paraffin eingebetteten Gewebelöcken wurden 4 µm breite Schnitte abgetrennt und mit Hämatoxylin und Eosin (HE) eingefärbt. Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff aus dem Blauholzbaum. Um seine färbende Eigenschaft zu entwickeln, muss er zu Hämalaun (basischer Hämalaun) aufbereitet werden. Hämalaun

färbt alle sauren beziehungsweise basophilen Strukturen blau, insbesondere Zellkerne mit der darin enthaltenen DNA und das mit Ribosomen angereicherte raue endoplasmatische Retikulum. Eosin ist ein synthetischer saurer Farbstoff und färbt alle azidophilen beziehungsweise basischen (eosinophilen) Strukturen rot, was vor allem die Zellplasmae Proteine umfasst. Morphologische Kriterien wie Vakuolisierungen, angeschwollenes Zytoplasma mit rupturierten Zellmembranen sowie Lyse des Zellkerns oder der gesamten Zelle dienten als Indikator für Nekrose. Zur Analyse wurden die Schnitte mit 10facher Vergrößerung mikroskopiert (Olympus BX 51, Hamburg, Germany) und mit der Color View II FW Camera (Color View, Munich, Germany) fotografiert. Diese wurden planimetrisch analysiert (Adobe Photoshop, Adobe Systems, Uxbridge, UK). Die Angabe der Nekrosefläche erfolgte in Prozent zum gesamten Gesichtsfeld.

2.3.4.2 sRAGE

Das Verfahren der Immunhistochemie dient dem Proteinnachweis und der –lokalisierung im histologischen Schnittpräparat. Hierzu werden spezifische, gegen das gesuchte Protein gerichtete Antikörper, verwendet. Diese sind an ein Detektionssystem gekoppelt, das die immunochemische Reaktion und somit das Protein im Präparat sichtbar macht. Durch immunhistochemische Methoden sollte zunächst die pathophysiologische Relevanz der AGEs und ihres Rezeptors RAGE im akuten Leberversagen geklärt werden. Die - wie oben beschrieben - hergestellten histologischen Schnitte wurden mit einem Ziege-polyklonalen anti-RAGE-Antikörper (R&D Systems) inkubiert. Universal LSAB® Kits (System-HRP; DakoCytomation, Dako, Hamburg, Deutschland) wurden, wie vom Hersteller beschrieben, für die Zusammenführung von sRAGE und Diaminobenzidin (DAB) Chromogen verwendet.

Tab. 4: Verwendete primäre Antikörper für die Immunhistochemie.

Primärer Antikörper	Verdünnung	Firma
Anti-Maus-rRAGE-Antikörper	1:50	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland

Zur Entfernung des Paraffins wurden die Schnitte für zehn Minuten in X-TRA getaucht und dann in einer absteigenden Alkoholreihe (100%iger Alkohol, 96%iger Alkohol, 80%iger Alkohol und 70%iger Alkohol und Aqua dest. für jeweils fünf Minuten) rehydratisiert.

Um die durch Formalinfixierung teilweise vorhandene Maskierung antigener Determinanten aufzuheben, wurde eine Hitzebehandlung mit nachfolgender Renaturierungsphase während

des Abkühlens durchgeführt. Dadurch konnte eine Verstärkung der spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion erzielt werden. Die Schnitte wurden in Citratpuffer (pH 6) für acht Minuten bei 700 Watt in einer Mikrowelle erhitzt und danach für eine Stunde bei Raumtemperatur abgekühlt. Die Aktivität endogener Proteasen kann zu unspezifischen Hintergrundfärbungen führen. Peroxidasen setzen molekularen Sauerstoff aus Peroxiden frei. Um diese Aktivität zu minimieren, wurden die Präparate mit einem Peroxidaseblock für fünf Minuten behandelt. Danach wurde dreimal mit Aqua dest. gespült. Unter Verwendung einer blockierenden Proteinlösung können nichtspezifische Bindungen zwischen Gewebsproteinen und Antikörpermolekülen reduziert werden. Nachdem die Objektträger trockengetupft worden waren und der Proteinblock aufgetragen war, erfolgte die Inkubation in einer abgedunkelten Feuchtkammer für 30 Minuten.

Als Antikörper wurde rRAGE (rekombinates RAGE, Tab. 4) in einer Verdünnung 1:50 verwendet. Jeder Schnitt wurde mit 100 µl Antikörperlösung bedeckt und bei 4°C über Nacht inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Schnitte zweimal in Wasser und einmal in Aqua dest. gespült. Unter Nutzung des LSAB Kits (Dako North America, Inc., Carpinteria, California, USA) und 15minütiger Inkubation mit DAB + 15 µl Peroxidaseblock erfolgte die Detektion von rRAGE. Anschließend wurden die Leberschnitte in Hämalaun gefärbt und danach zehn Minuten im lauwarmen Wasser gebläut. Zur Fixierung folgte die aufsteigende Alkoholreihe. Unter Nutzung von Mounting Medium wurden die Präparate eingedeckelt. Die Schnitte wurden mit einem Lichtmikroskop (Olympus BX51, Hamburg, Deutschland) analysiert. Positive Zellen wurden in 50 konsekutiven Feldern gezählt und als Zellen pro mm² angegeben.

2.4 Experimentelle Gruppen und experimentelles Protokoll

Wie unter 2.2.1 beschrieben wurde das experimentelle Vorhaben in 3 Versuchsabschnitte unterteilt:

I.

- UCP2 +/+ : NaCl (10µg/kg KG), (n=7)
- UCP2 -/- : NaCl (10µg/kg KG), (n=7)

II.

- UCP2 +/+ : Gal/LPS (720mg/10µg/kg KG), (n = 7)
- UCP2 -/- : Gal/LPS (720mg/10µg/kg KG), (n = 7)
- UCP2 +/+ : rRAGE (10µl) -12h + Gal/LPS (720mg/10µg/kg KG), (n = 7)
- UCP2 -/- : rRAGE (10µl) -12h + Gal/LPS (720mg/10µg/kg KG), (n = 7)

III.

- Altersstudie (juvenil, adult, seneszent): Gal/LPS (720mg/10µg/kg KG), (n = 7)



1.Vorbehandlung	2.Vorbehandlung	Ruhepause	
rRAGE	12h später NaCl oder Gal/LPS	6 Stunden	Entnahme von Blut und Gewebe

Es wurden außerdem sowohl mit UCP2-kompetenten als auch mit UCP2-defizienten Tieren Überlebensstudien (n = 10) durchgeführt und die Überlebenszeiten miteinander verglichen:

- juvenil Gal/LPS
- adult Gal/LPS
- seneszent Gal/LPS
- juvenil rRAGE + Gal/LPS
- adult rRAGE + Gal/LPS
- seneszent rRAGE + Gal/LPS

2.5 Statistik

Die aus den Untersuchungen von Blut und Gewebe gewonnenen Daten wurden im Microsoft Excel gesammelt, geordnet und verarbeitet. Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (SEM) wurden berechnet.

Für das Zeichnen der Graphen wurden die Daten aus Microsoft Excel in das Programm SigmaPlot Version 9.0 (Jandel Corp., San Rafael, CA, USA) importiert. Alle Daten werden angegeben als Mittelwert \pm SEM.

Nach Testung der Normalverteilung der Werte wurde für den Gruppenvergleich der Student-t-Test durchgeführt.

Nach Überprüfung der Normalverteilung wurden die signifikanten Unterschiede zwischen den drei Altersgruppen bzw. zwischen den einzelnen Behandlungen innerhalb eines Stammes mit dem ‚One Way ANOVA‘, gefolgt von einem gepaarten Vergleich (Bonferroni-Methode), ermittelt. Zusätzlich wurden separat die signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Stämmen UCP2 +/+ und UCP2 -/- zu dem jeweiligen Alter mit einem ungepaarten T-Test bestimmt.

Ein Unterschied galt dann als signifikant, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit weniger als 5% ($p < 0,05$) betrug.

3 ERGEBNISSE

3.1 Vollblut- und Serumanalysen

3.1.1 Glukose

Oxidativer Stress und erhöhte Blutzuckerwerte sind Voraussetzung für die Glykierung von Proteinen. Aufgrund dieses Sachverhaltes wurden zunächst die Blutglukosewerte bestimmt. Die Abbildung 8A zeigt, dass die UCP2-defizienten Tiere signifikant höhere Glukosekonzentrationen im Vergleich zu den UCP2-kompetenten Tieren aufwiesen. Während bei den UCP2-kompetenten Tieren der Alterungsprozess zu kaum veränderten Blutglukosewerten führte, zeigten die Glukosekonzentrationen der UCP2-Knock-out-Tiere einen deutlichen Anstieg in der Seneszenz (Abb. 8B).

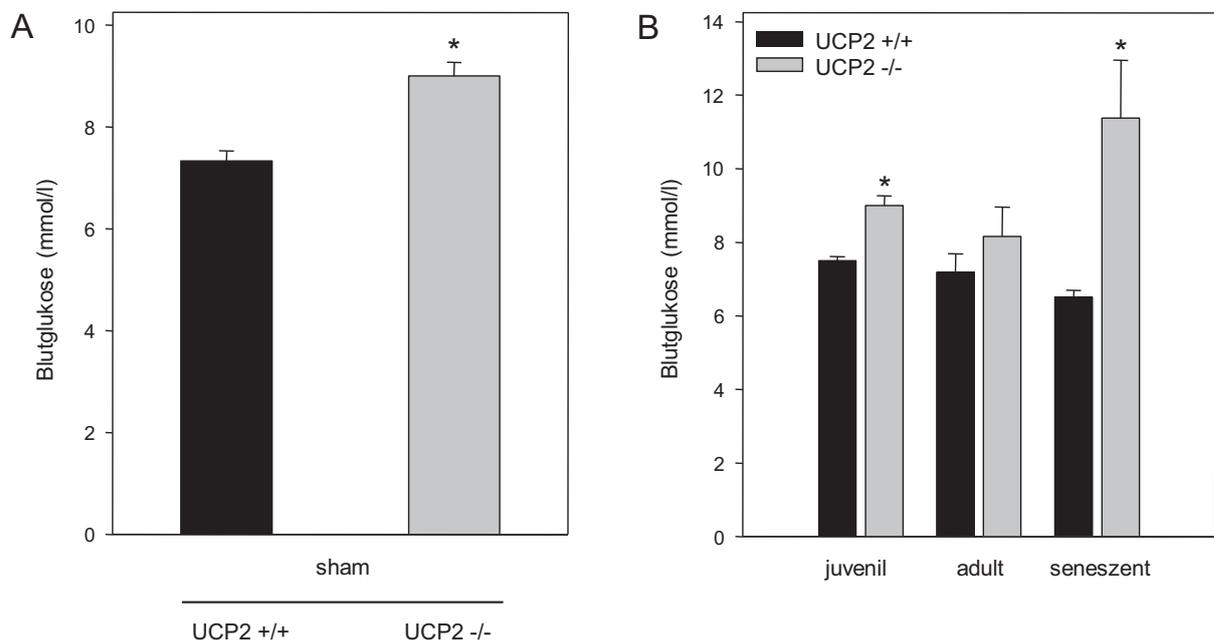


Abb. 8: Ergebnisse der Glukosemessung im Blut von UCP2 +/+ (n = 7) und UCP2 -/- Mäusen (n = 7) (A), sowie in juvenilen, adulten und seneszenten UCP2 +/+ (n = 7) und UCP2 -/- Mäusen (n = 7) (B). Mittelwert ± SEM, ungepaarter Student-t-test: *p < 0,05 vs. UCP2 +/+ Mäuse.

3.1.2 Malondialdehyd und GSH/GSSG-Ratio als Indikatoren des oxidativen Stresses

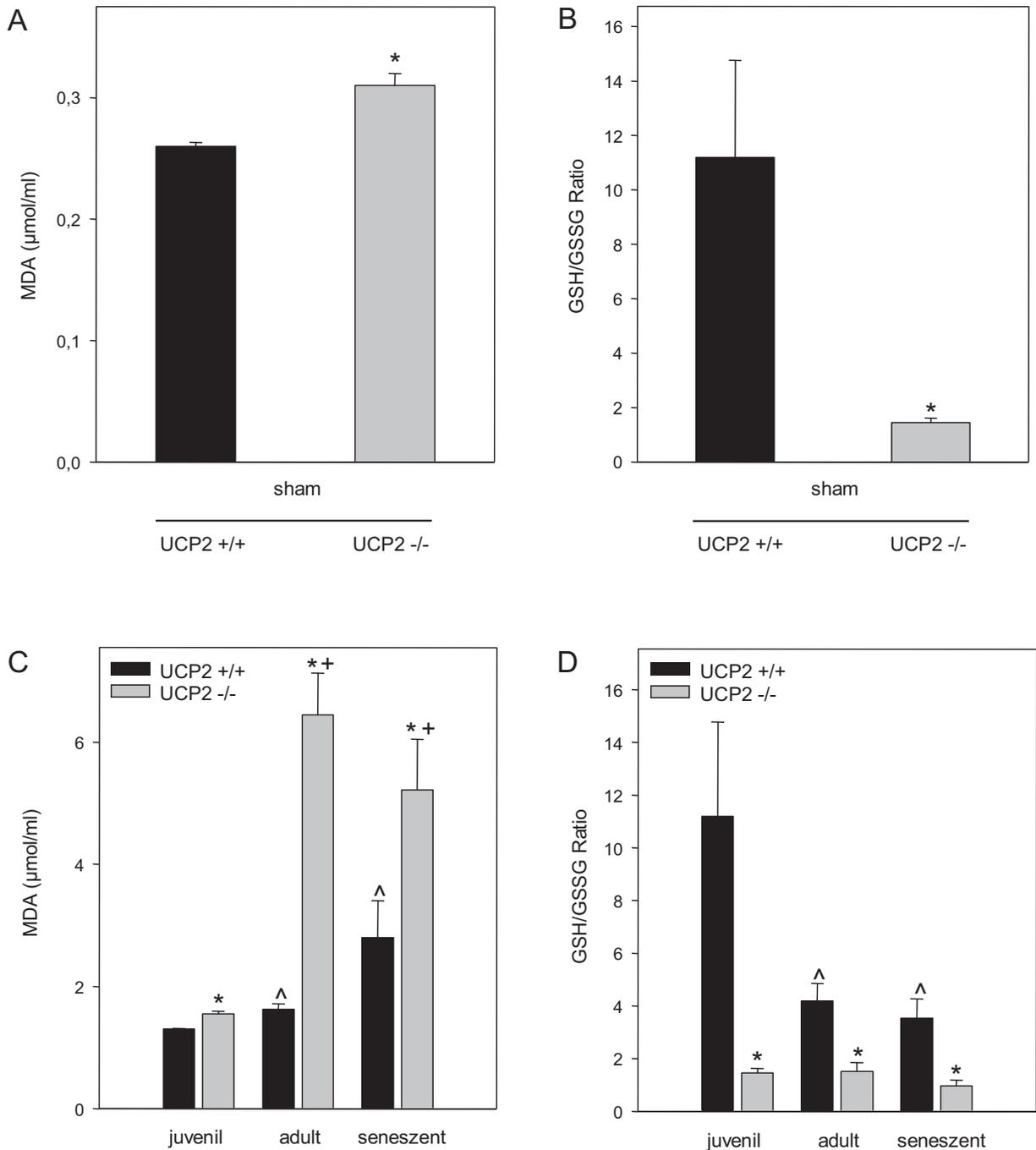


Abb. 9: Analyse der MDA-Konzentration bei UCP2 +/+ (n = 7) und UCP2 -/- Mäusen (n = 7) (A), sowie im Vergleich bei juvenilen, adulten und seneszenten UCP2 +/+ (n = 7) und UCP2 -/- Mäusen (n = 7) (C) und Analyse der GSH/GSSG Ratio bei UCP2 +/+ (n = 7) und UCP2 -/- Mäusen (n = 7) (B), sowie im Vergleich bei juvenilen, adulten und seneszenten UCP2 +/+ (n = 7) und UCP2 -/- Mäusen (n = 7) (D). Mittelwert \pm SEM, ungepaarter Student-t-test: *p < 0,05 vs. UCP2 +/+ Mäuse; ANOVA: ^p < 0,05 vs. juvenile UCP2 +/+ Mäuse, +p < 0,05 vs. juvenile UCP2 -/- Mäuse.

Malondialdehyd (MDA) ist ein Produkt der Lipidperoxidation, welche bei erhöhtem oxidativen Stress auftritt. Die Abbildung 9A zeigt, dass die UCP2 ^{-/-} Tiere eine signifikant erhöhte MDA-Konzentration gegenüber den UCP2-kompetenten Tieren aufwiesen. Mit Hilfe des Quotienten GSH/GSSG ist es möglich, eine Aussage über antioxidative Mechanismen zu treffen. Wie bereits beschrieben, ist GSH eines der wichtigsten Antioxidanzien im Organismus. Seine freie Thiolgruppe ermöglicht eine Übertragung von Elektronen auf freie Radikale und damit deren Detoxifikation. Bei dieser Reaktion geht GSH selbst in seine dimere Form GSSG über. Daraus lässt sich schließen, dass eine hohe GSH/GSSG-Ratio für einen geringeren oxidativen Stress spricht. Wie erwartet, zeigt die Abbildung 9B eine signifikant verringerte GSH/GSSG-Ratio bei den UCP2-defizienten Tieren gegenüber den UCP2-kompetenten Tieren.

Die Untersuchung von MDA in einer Altersstudie zeigte, dass oxidativer Stress, unabhängig vom Knock-out, mit dem Alter zunimmt. Allerdings geschieht dieses auf einem unterschiedlich hohen Niveau. Bei den adulten UCP2-defizienten Tieren waren die MDA-Konzentrationen gegenüber den UCP2-kompetenten Tieren verdreifacht, in der Seneszenz nur noch verdoppelt (Abb. 9C). Auch die GSH/GSSG-Ratio wurde in einer Altersstudie bestimmt. Bei den UCP2-kompetenten Tieren führte der Alterungsprozess zu einer Halbierung der GSH/GSSG-Ratio im Vergleich zu den juvenilen Tieren. Bei UCP2 ^{-/-} Tieren dagegen wiesen schon die juvenilen Tiere einen Quotienten < 2 auf, der mit dem Alter sogar noch weiter sank (Abb. 9D).

3.1.3 Glyoxalase-I-Aktivität

Die Glyoxalase-I ist in der Lage, AGE-Vorstufen abzubauen, solange diese noch keine Cross-link-Formation aufweisen. Während bei den UCP2-kompetenten Tieren hohe Glyoxalase-I-Konzentrationen nachgewiesen werden konnten, waren diese in den Tieren mit UCP2-Knock-out signifikant erniedrigt (Abb. 10A). Voranschreitendes Alter führte bei den UCP2 ^{+/+} Tieren zu einer stetigen Senkung der Glyoxalase-I-Aktivität. Bei den UCP2 ^{-/-} Tieren, die per se geringe Glyoxalase-I-Level besaßen, wirkte sich das Alter kaum auf die Glyoxalase-I-Aktivität aus (Abb. 10B).

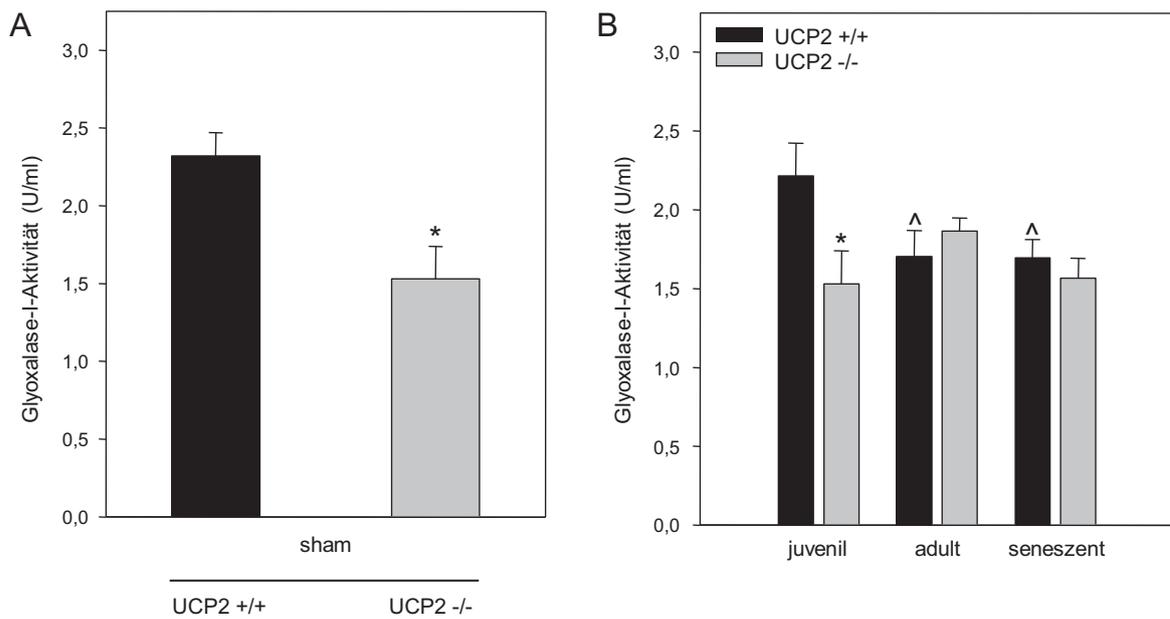


Abb. 10: Analyse der Glyoxalase-I-Aktivität bei UCP2 +/+ (n = 7) und UCP2 -/- Mäusen (n = 7) (A) und bei juvenilen, adulten und seneszenten UCP2 +/+ (n=7) und UCP2 -/- Mäusen (n = 7) (B). Mittelwert ± SEM, ungepaarter Student-t-test: *p < 0,05 vs. UCP2 +/+ Mäuse; ANOVA: ^p < 0,05 vs. juvenile UCP2 +/+ Mäuse.

3.1.4 Leberspezifische Enzyme als Marker des akuten Leberversagens

Die Aspartataminotransferase (ASAT) und die Alaninaminotransferase (ALAT) sind leberspezifische Enzyme, deren Erhöhung für eine Leberschädigung spricht. Bei der ASAT handelt es sich um ein mitochondriales Enzym, bei der ALAT um ein überwiegend zytosolisches Enzym. Es ist bekannt, dass die Induktion eines akuten Leberversagens durch Gal/LPS zu einem deutlichen Anstieg der Lebertransaminasen führt. Die Abbildung 11A zeigt die Plasmaaktivität der ASAT, die Abbildung 11B die der ALAT. In allen Abbildungen repräsentieren die schwarzen Säulen die sham-Gruppe der UCP2 +/+ Tiere, die hellgrauen Säulen zeigen die Werte der sham-Gruppe der UCP2 -/- Tiere. Dargestellt durch die weißen Säulen sind jeweils die Tiere mit einem akuten Leberversagen. Die dunkelgrauen Säulen entsprechen den Transaminaseaktivitäten der Tiere, die prophylaktisch den rekombinanten Antikörper rRAGE erhalten hatten. Wie erwartet, führte die Induktion eines Leberversagens in beiden Tierstämmen zu einem signifikanten Anstieg der Transaminasen gegenüber den Kontrollgruppen.

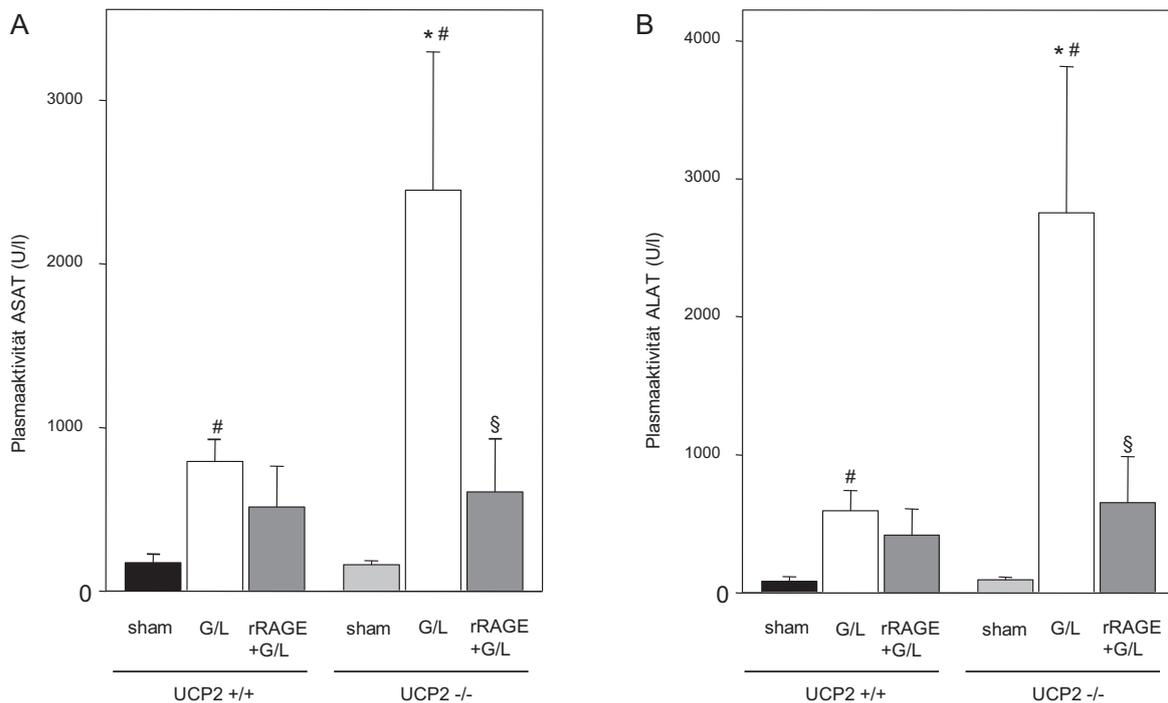


Abb. 11: Plasmaaktivität von Aspartataminotransferase (A) und Alaninaminotransferase (B) in UCP2 +/+ (n = 7) und UCP2 -/- Mäusen (n = 7) nach Behandlung mit NaCl (sham), G/L und rRAGE + G/L. Mittelwert ± SEM, ungepaarter Student-t-test: [#]p < 0,05 vs.sham, ^{*}p < 0,05 vs. UCP2 +/+ Mäuse, [§]p < 0,05 vs. G/L.

Bei den UCP2-defizienten Tieren fiel der Anstieg sehr viel deutlicher aus. Während bei den UCP2-kompetenten Tieren die Transaminasekonzentrationen deutlich unter 1000 U/l lagen, stiegen die Werte bei den Knock-out Tieren auf über 2000 U/l. Die prophylaktische Gabe von rRAGE, 12 Stunden vor Induktion des Leberversagens, führte in beiden Stämmen zu einer beträchtlichen Senkung der Transaminasen. Bei den UCP2-defizienten Tieren zeigte sich der Abfall deutlicher und erwies sich als signifikant gegenüber der Gal/LPS-Gruppe. Die ALAT-Konzentrationen konnte auf ein Viertel reduziert werden. Obwohl bei den UCP2-Knock-out Tieren das Leberversagen fulminanter ausgeprägt war, konnten die Transaminasekonzentrationen durch rRAGE-Applikation auf das Level der UCP2-kompetenten Tiere, ebenfalls nach rRAGE-Applikation, reduziert werden.

3.2 Molekularbiologie

3.2.1 Nachweis von AGEs

Wie bereits erläutert, gelten erhöhte Blutglukosewerte und erhöhter oxidativer Stress als Voraussetzung für die Glykierung von Proteinen, das heißt für die Bildung von AGEs. Daher wurden die AGE-Level in den zwei verschiedenen Tierstämmen und in Abhängigkeit zum Alter untersucht. Zunächst wurden die beiden Tierstämme miteinander verglichen. Die Abbildung 12A zeigt einen signifikanten Unterschied der AGE-Level zwischen den UCP2-kompetenten und UCP2-defizienten Tieren. In den Knock-out Tieren konnten fast doppelt so viele AGEs wie in den UCP2 +/+ Tieren nachgewiesen werden.

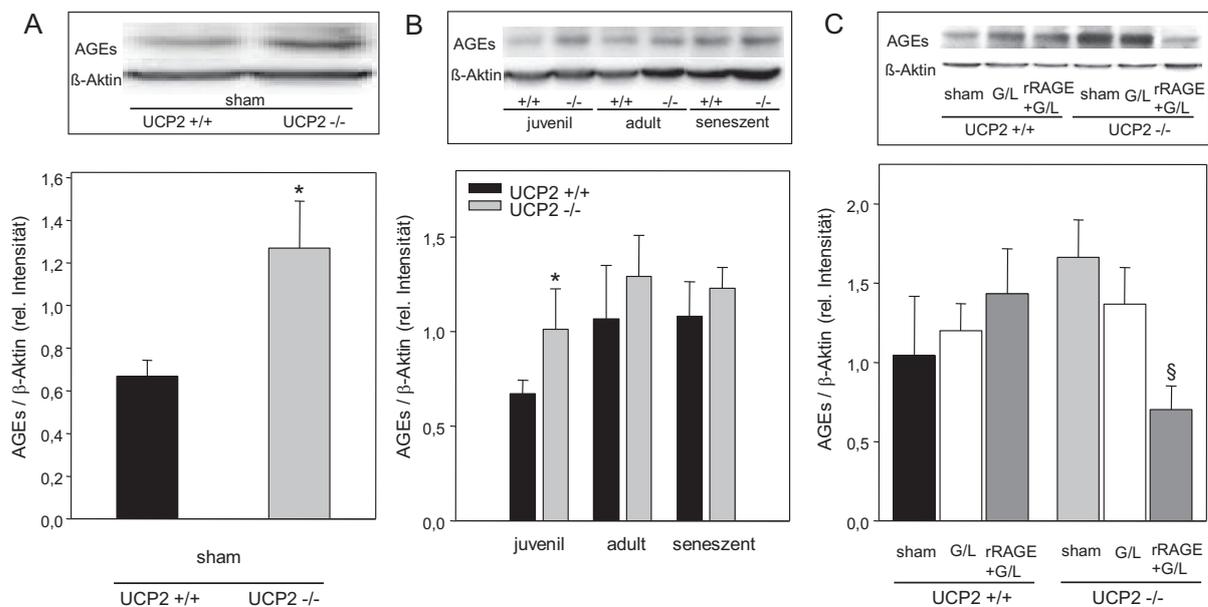


Abb. 12: Repräsentative Western Blot und densitometrische Analyse von AGEs in Lebern von NaCl-behandelten UCP2 +/+ (n = 7) und UCP2 -/- Mäusen (n = 7) (A), von juvenilen, adulten und seneszenten UCP2 +/+ (n = 7) und UCP2 -/- Mäusen (n = 7) (B), sowie nach Behandlung mit NaCl (sham), G/L und G/L + rRAGE in UCP2 +/+ (n = 7) und UCP2 -/- Mäusen (n = 7) (C). Mittelwert ± SEM, ungepaarter Student-t-test: *p < 0,05 vs. UCP2 +/+ Mäuse, §p < 0,05 vs. G/L.

Der Alterungsprozess führte in beiden Tierstämmen zu einer Amplifikation der AGE-Formation (Abb. 12B). Während die juvenilen UCP2-kompetenten Tiere signifikant geringere AGE-Konzentrationen gegenüber der UCP2-defizienten Tieren aufwiesen, fand man bei den adulten Tieren keine signifikanten Differenzen. Des Weiteren wurden auch die AGE-

Konzentrationen im akuten, septischen Leberversagen untersucht (Abb. 12C). Bei den UCP2-kompetenten Tieren führte die Induktion eines Leberversagens zu einer leichten Erhöhung der AGE-Formation. Diese konnte durch Applikation des Antikörpers nicht gesenkt werden, sondern führte zu einer weiteren diskreten Erhöhung. Bei den UCP2-defizienten Tieren zeigten sich nach Induktion des Leberversagens leicht erniedrigte AGE-Konzentrationen. Diese konnten durch rRAGE-Gabe noch weiter signifikant gesenkt werden.

3.2.2 Nachweis der RAGE-Expression

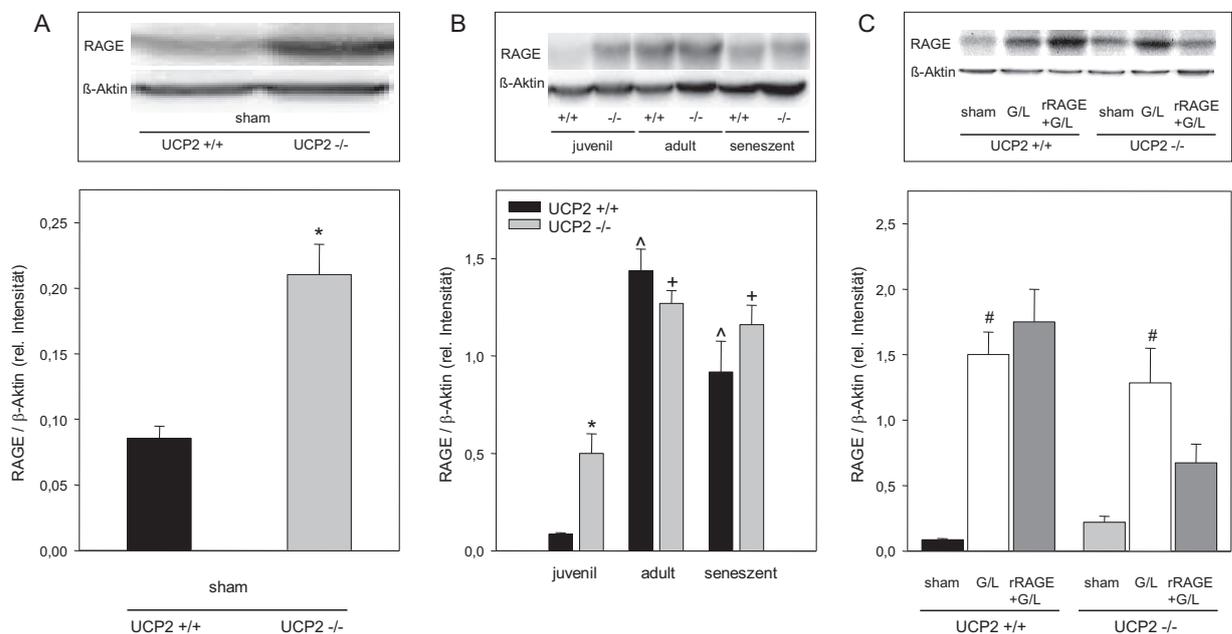


Abb. 13: Repräsentative Western Blot und densitometrische Analyse von RAGE in Lebern von NaCl-behandelten UCP2 +/+ (n = 7) und UCP2 -/- Mäusen (n = 7) (A), von juvenilen, adulten und seneszenten UCP2 +/+ (n = 7) und UCP2 -/- Mäusen (n = 7) (B) sowie nach Behandlung mit NaCl (sham), G/L und G/L + rRAGE in UCP2 +/+ (n = 7) und UCP2 -/- Mäusen (n = 7) (C). Mittelwert \pm SEM, ungepaarter Student-t-test: *p < 0,05 vs. UCP2 +/+ Mäuse, #p < 0,05 vs. sham; ANOVA: ^p < 0,05 vs. juvenile UCP2 +/+ Mäuse, +p < 0,05 vs. juvenile UCP2 -/- Mäuse.

Es besteht eine deutliche Korrelation zwischen dem Anstieg von AGEs und dem Anstieg von RAGE. Diese Tatsache unterstreicht die Abbildung 13A, in der deutlich wird, dass die RAGE-Expression in den UCP2-defizienten Tieren im Vergleich zu den UCP2-kompetenten Tieren stark erhöht ist. Während die Expression in den adulten Tieren in beiden Tierstämmen im Vergleich zu den juvenilen anstieg, war zwischen den adulten und den seneszenten Tieren

in beiden Stämmen eine leichte Reduktion zu verzeichnen (Abb. 13B). Des Weiteren wurde die RAGE-Expression beim septischen Leberversagen im Lebergewebe quantifiziert (Abb. 13C). Bei den UCP2-kompetenten Tieren wurden nach Induktion eines Leberversagens signifikant erhöhte RAGE-Level gegenüber der sham-Gruppe nachgewiesen. Die prophylaktische Gabe von rRAGE vermochte diese aber nicht senken. Die Induktion eines Leberversagens führte bei den UCP2-defizienten Tieren zu einem vierfachen Anstieg der RAGE-Expression gegenüber der sham-Gruppe. Durch Applikation von rRAGE konnte diese stark erhöhte Expression wiederum halbiert werden.

3.2.3 Nachweis der cleaved Caspase-3-Expression

Für das durch Gal/LPS-induzierte Leberversagen ist neben nekrotischem Zelltod auch die hepatozelluläre Apoptose charakteristisch. Als Indikator für die Apoptose wurde die Expression der cleaved Caspase-3 bestimmt (Abb. 14). In beiden Stämmen führte die Induktion des akuten Leberversagens zu einem signifikanten Anstieg der cleaved Caspase-3 gegenüber der sham-Gruppe. Deutlicher ausgeprägt war der Anstieg bei den UCP2-defizienten Tieren. Die Applikation von rRAGE konnte die cleaved Caspase-3-Konzentration in beiden Tierstämmen fast auf das Niveau der sham-Gruppe senken.

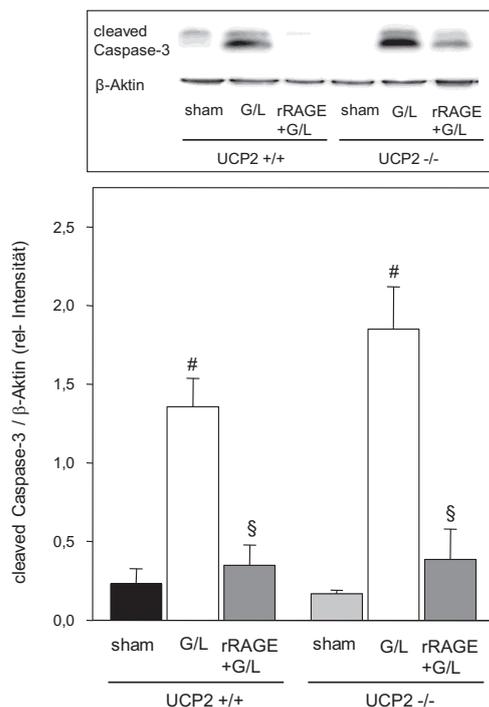


Abb. 14: Repräsentative Western Blot Analyse der cleaved Caspase-3 nach Behandlung mit NaCl (sham), G/L und G/L + rRAGE in UCP2 +/+ (n = 7) und UCP2 -/- Mäusen (n = 7). Mittelwert ± SEM, ungepaarter Student-t-test: #p < 0,05 vs.sham, §p < 0,05 vs. G/L.

3.3 Histologie und Immunhistochemie

3.3.1 Hämatoxylin-Eosin

Kommt es zur ATP-Depletion, steht der nekrotische Zelltod im Vordergrund. Dieser konnte durch Färbung von Lebergewebeschnitten mit Hämatoxylin-Eosin nachgewiesen werden. (Abb. 15A).

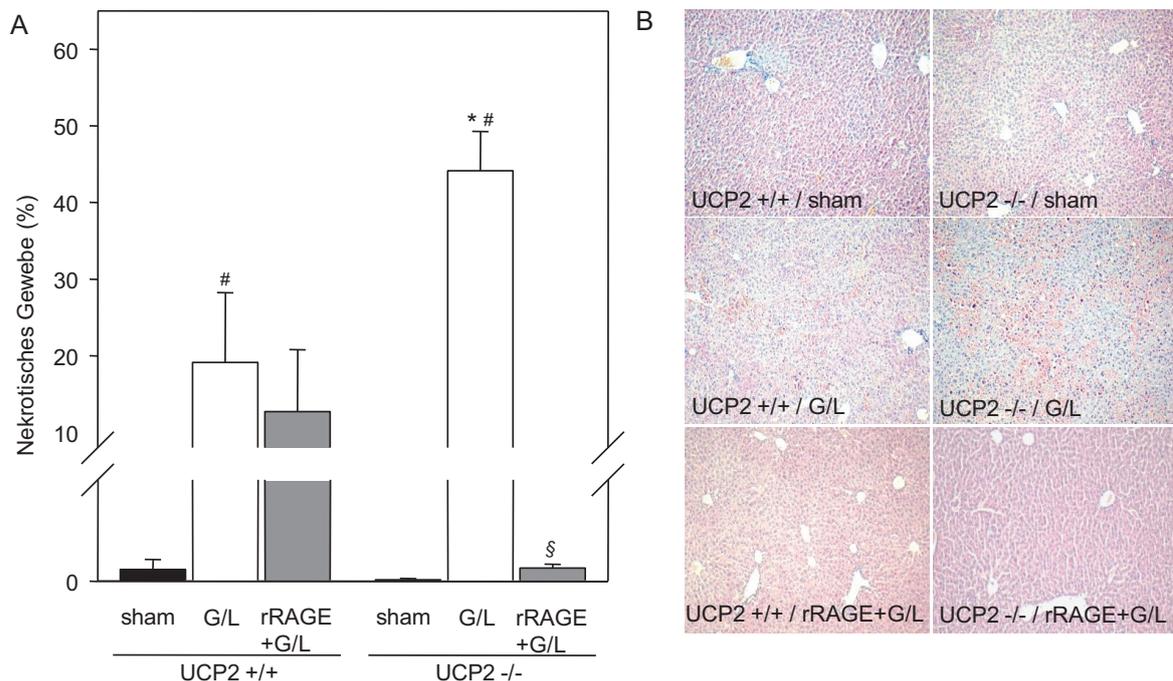


Abb. 15: Quantifizierung des nekrotischen Gewebes der Leber nach Behandlung mit NaCl (sham), G/L und sRAGE + G/L in UCP2 +/+ (n = 7) und UCP2 -/- Mäusen (n = 7) (A) und repräsentative histologische Bilder nach HE-Färbung. Behandlung mit NaCl (sham), G/L und rRAGE + G/L in UCP2 +/+ (n = 7) und UCP2 -/- Mäusen (n = 7) (B). Mittelwert ± SEM, ungepaarter Student-t-test: #p < 0,05 vs.sham, *p < 0,05 vs. UCP2+/, §p < 0,05 vs. G/L.

Unter physiologischen Bedingungen liegt der Anteil an nekrotischen Gewebearealen unter einem Prozent. Nach Induktion des Leberversagens kam es zu einem immensen Anstieg der Nekrose in beiden Tierstämmen. Bei den UCP2 +/+ Tieren stieg die Nekrose auf circa 20%, bei den UCP2 -/- Tieren auf über 40%. Durch die Applikation von rRAGE konnte die Nekrose deutlich gesenkt werden. Besonders profitierten die UCP2-defizienten Tiere, bei

denen die Nekrose von $> 40\%$ auf ungefähr 1% minimiert werden konnte. Die histologischen Bilder verdeutlichen die Untersuchungsergebnisse (Abb. 15B).

3.3.2 Nachweis der sRAGE-Expression

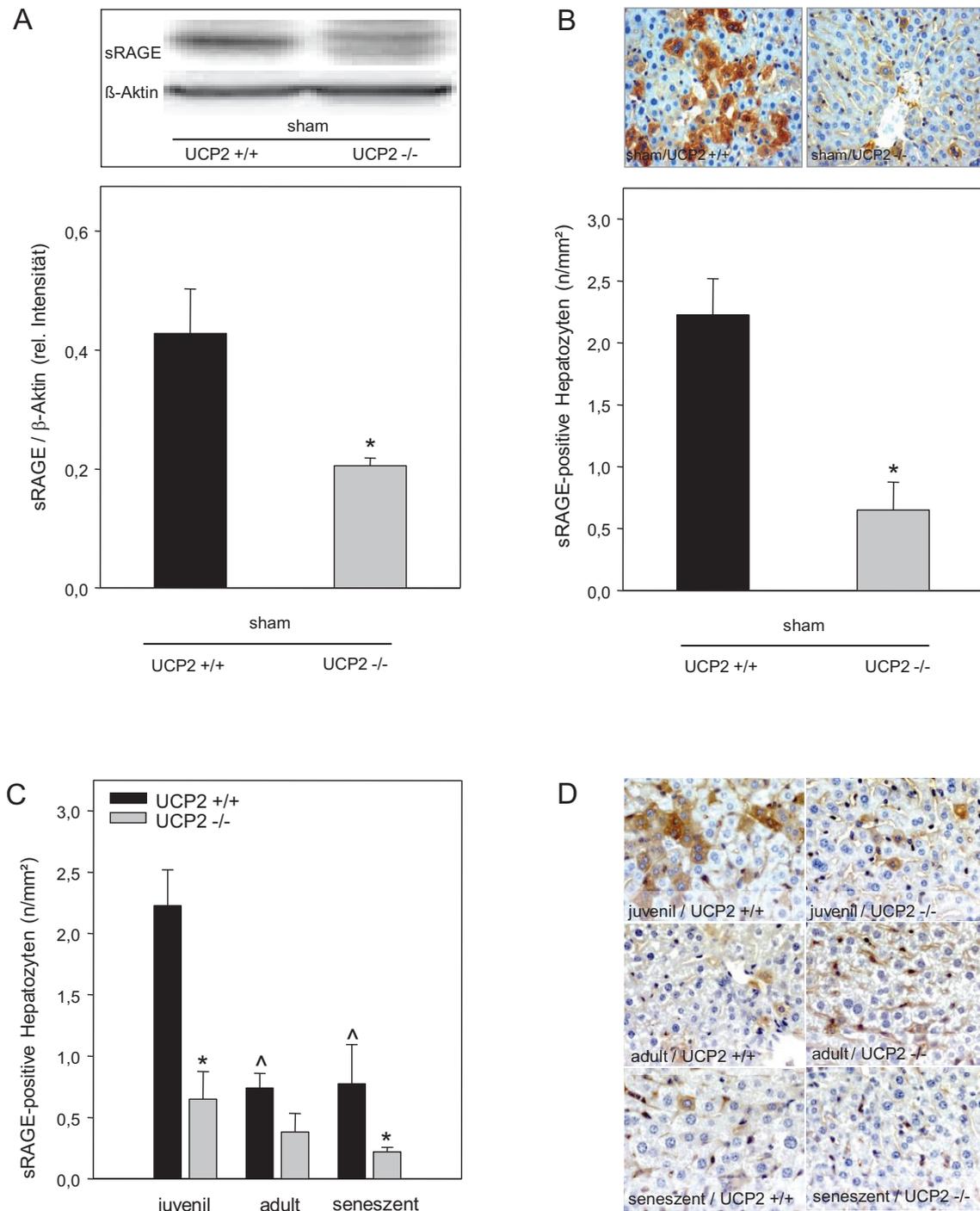


Abb. 16: Repräsentative Western Blot Analyse von sRAGE in Lebern von UCP2 +/+ (n = 7) und UCP2 -/- Mäusen (n = 7) (A) und quantitative Analyse von sRAGE (B) in Lebern von NaCl-behandelten UCP2 +/+ (n = 7) und UCP2 -/- Mäusen (n = 7) sowie quantitative Analyse von sRAGE (C) in Lebern von NaCl-behandelten juvenilen, adulten und seneszenten UCP2 +/+ (n=7) und UCP2 -/- Mäusen (n=7) mit dazugehörigen repräsentativen Immunhistologien (D). Mittelwert \pm SEM, ungepaarter Student-t-test: *p < 0,05 vs. UCP2 +/+ Mäuse; ANOVA: ^p < 0,05 vs. juvenile UCP2 +/+ Mäuse.

Eine hohe sRAGE-Expression wirkt sich positiv, im Sinne einer möglichen Protektion, gegenüber inflammatorischen Stimuli aus. sRAGE ist in der Lage, AGEs zu binden und diese zu detoxifizieren. Des Weiteren kann sRAGE auch direkt an RAGE binden und somit die Bindungsstelle für sämtliche Liganden blockieren. Die Abbildungen 16A und B zeigen, dass bei UCP2-defizienten Tieren ein signifikanter Mangel an sRAGE im Vergleich zu UCP2-kompetenten Tieren vorliegt. Bei beiden Tierstämmen ging der Alterungsprozess mit einer massiven Reduktion der sRAGE-positiven Hepatozyten einher (Abb 16C). Während bei juvenilen UCP2-kompetenten Tieren noch mehr als zwei sRAGE-positive Hepatozyten pro mm² vorzufinden waren, minimierte sich die Anzahl bei den seneszenten Tieren auf weniger als einen. Bei UCP2-defizienten Tieren dagegen fanden sich schon bei den juvenilen Tieren weniger als ein sRAGE-positiver Hepatozyt. Bei den seneszenten Tieren lag die Anzahl sRAGE-positiver Hepatozyten bei weniger als 0,5 pro mm² Lebergewebe.

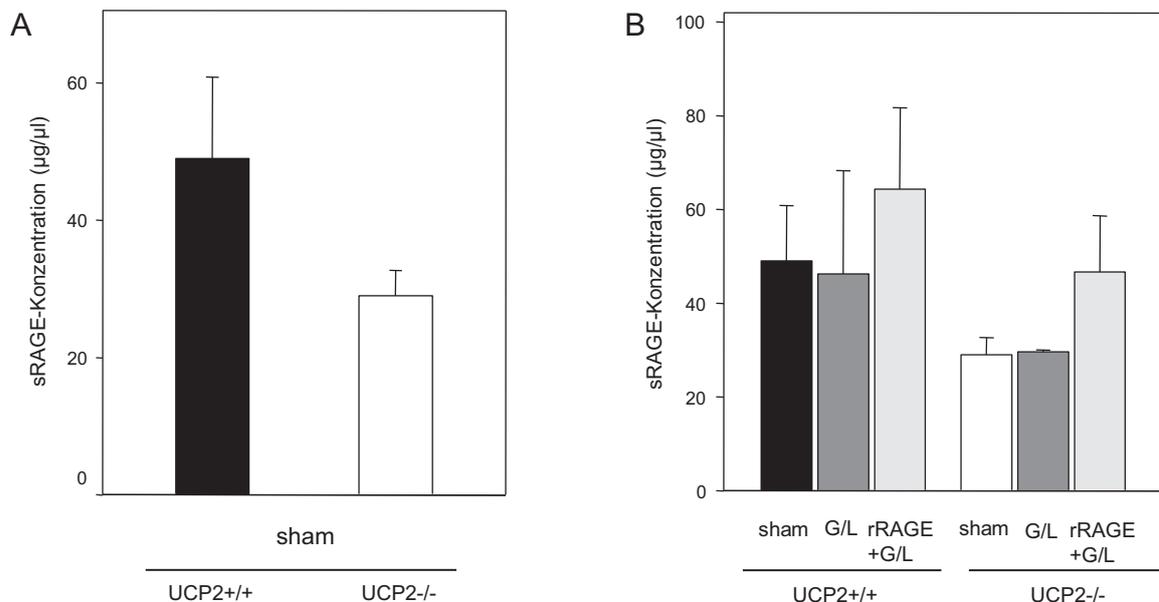


Abb. 17: ELISA-Analyse von sRAGE in Lebergewebe von UCP2 ^{+/+} (n = 7) und UCP2 ^{-/-} Mäusen (n = 7) (A), sowie nach Behandlung mit NaCl (sham), G/L und rRAGE + G/L in UCP2 ^{+/+} und UCP2 ^{-/-} Mäusen (n = 7) (B). Mittelwert ± SEM, ungepaarter Student-t-test.

Verifiziert wurden diese Aussagen durch die Analyse von systemischem sRAGE im ELISA (Abb. 17). Es zeigte sich, dass UCP2-kompetente Tiere höhere sRAGE-Konzentrationen im Vergleich zu den UCP2-defizienten Tieren aufweisen (17A). Die Abb. 17B zeigt zusätzlich den Vergleich der beiden Tierstämmen im septischen Leberversagen. Während sich die alleinige Induktion eines Leberversagens nicht auf die sRAGE-Konzentrationen im Vergleich

zur sham-Gruppe auswirkte, führte die zusätzliche Applikation von rRAGE zu gesteigerten Konzentrationen von sRAGE. Allerdings konnten keine statistisch signifikanten Veränderungen beobachtet werden.

3.4 Überlebensstudien

Neben den Untersuchungen von Blut und Gewebe wurden Überlebensstudien durchgeführt. Zunächst wurde untersucht, ob sich die Induktion eines Leberversagens mit Gal/LPS unterschiedlich auf das Überleben beider Tierstämme auswirkt. Hierbei stellte sich heraus, dass die UCP2-Defizienz zu keiner erhöhten Mortalität führte. In beiden Tierstämmen überlebten 20% der Tiere die Induktion eines Leberversagens. Danach wurde überprüft, ob die prophylaktische Gabe von rRAGE 12 Stunden vor Induktion des Leberversagens sich auf das Überleben auswirkt. Die Abbildung 18A zeigt, dass das Überleben bei den UCP2-kompetenten Tieren nicht deutlich gesteigert werden konnte, während bei den UCP2-defizienten Tieren das Überleben durch die Gabe von rRAGE von 20% auf 50% anstieg (Abb. 18B).

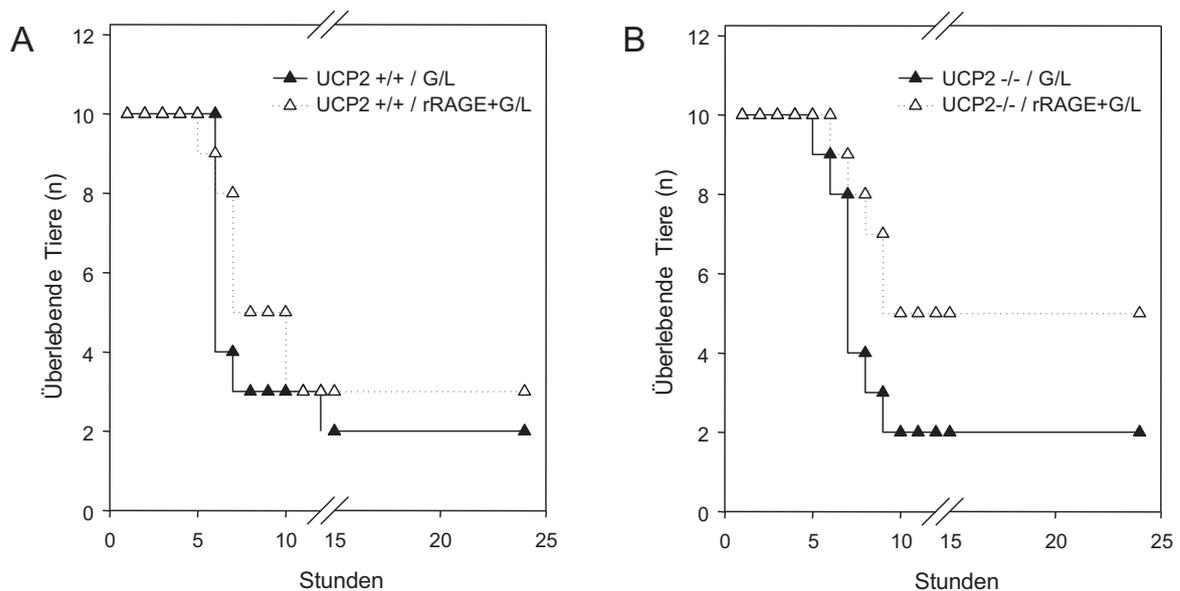


Abb. 18: Überlebensrate von UCP2 +/+ (n = 10) (A) und UCP2 -/- Mäusen (n = 10) (B) nach Gal/LPS-Exposition mit und ohne prophylaktischer rRAGE-Applikation.

Des Weiteren wurde in Überlebensstudien überprüft, ob unterschiedliche Altersgruppen verschieden sensibel auf Gal/LPS reagieren. Abbildung 19A zeigt das Überleben von juvenilen, adulten und seneszenten UCP2-kompetenten Tieren nach Gal/LPS-Gabe. Abbildung 19B veranschaulicht das Überleben mit prophylaktischer Gabe von rRAGE 12 Stunden vor Induktion des Leberversagens. Die Gabe von rRAGE hatte keinen Einfluss auf das Überleben von UCP2-kompetenten Tieren.

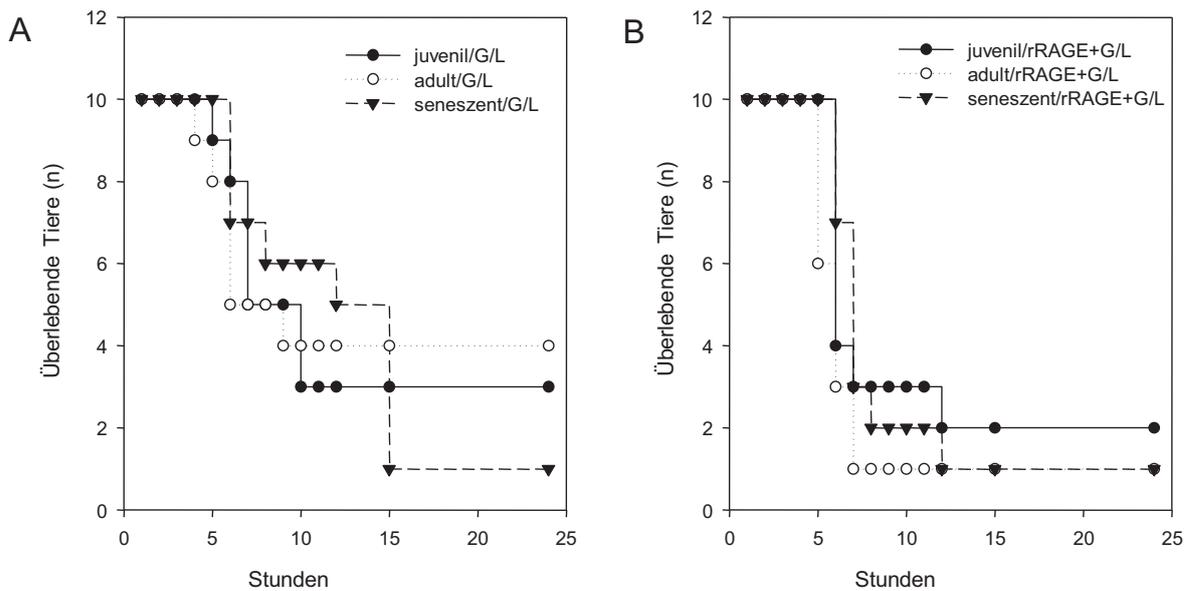


Abb. 19: Überlebensrate von juvenilen, adulten und seneszenten UCP2 +/+ Mäusen (n = 10) nach Gal/LPS-Exposition (A) und Gal/LPS-Exposition nach prophylaktischer Gabe von rRAGE (B).

Bei der Untersuchung der Altersabhängigkeit von UCP2-defizienten Tieren im akuten Leberversagen zeigte sich, dass Alter keinen wesentlichen Einfluss auf das Überleben nach Gal/LPS-Gabe hat. Wie schon beschrieben, konnte das Überleben bei den juvenilen Tieren von 20% auf 50% gesteigert werden. Bei den adulten und seneszenten Tieren konnte durch rRAGE-Gabe keine Protektion bewirkt werden (Abb. 20).

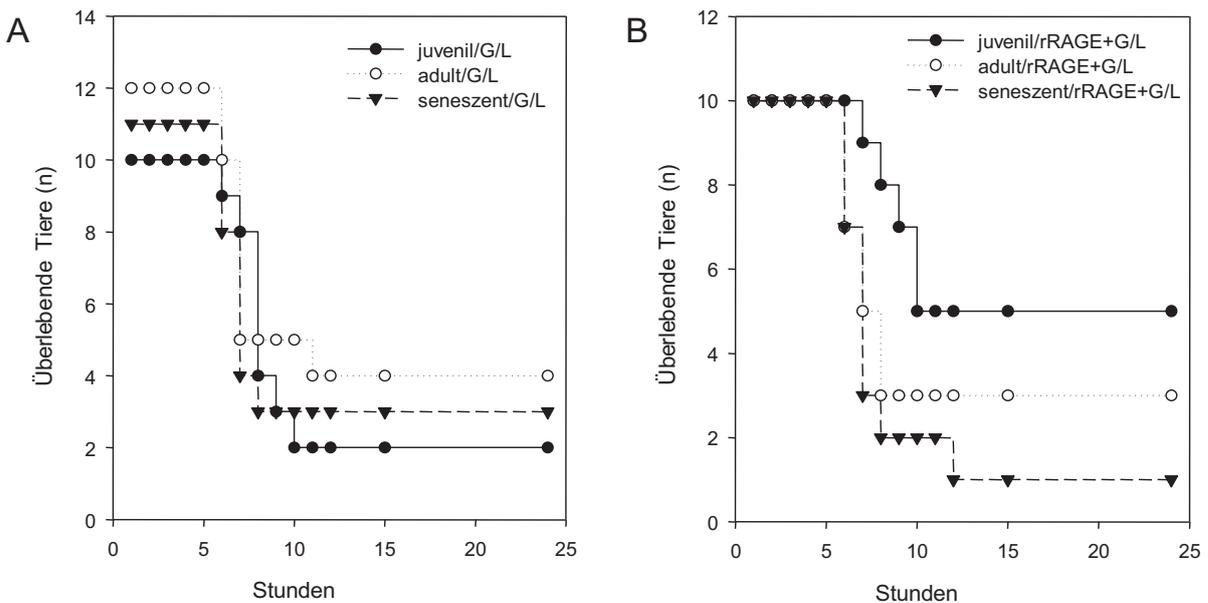


Abb. 20: Überlebensrate von juvenilen, adulten und seneszenten UCP2 -/- Mäusen (n = 10) nach Gal/LPS-Expositin (A) und Gal/LPS-Exposition nach prophylaktischer Gabe von rRAGE (B).

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Mit der vorliegenden experimentellen Studie wurde untersucht, welche Rolle oxidativer Stress auf die Glykierung von Proteinen und das Binden an deren Rezeptoren, sowie dessen Detoxifikation in einem in vivo Modell des akuten Leberversagens spielt. Des Weiteren wurde die Frage geklärt, inwieweit unterschiedliches Alter Einfluss auf die Vulnerabilität gegenüber Gal/LPS nimmt.

Zusammenfassend wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- Die Defizienz von UCP2 führt zu einer signifikanten Erhöhung der Blutglukose und des oxidativen Stresses.
- Es besteht eine enge Korrelation zwischen der Höhe des oxidativen Stresses und dem Ausmaß der Glykierung.
- AGEs und RAGE spielen eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie des septischen Leberversagens.
- Hohe sRAGE-Level wirken bei akutem Leberversagen protektiv.
- RAGE und sRAGE verhalten sich in Bezug auf ihre Expression reziprok.
- Die Blockade von RAGE durch rRAGE wirkt sich positiv auf das Überleben bei akutem Leberversagen aus. Besonders ausgeprägt ist dieser protektive Effekt bei juvenilen UCP2-defizienten Tieren.
- Das Ausmaß an oxidativem Stress nimmt mit dem Alter zu und korreliert mit dem Anstieg von AGEs und RAGE.
- Die hepatische Vulnerabilität gegenüber inflammatorischen Stimuli steigt mit dem Alter.
- Die sRAGE-Konzentrationen sinken mit dem Alterungsprozess deutlich.
- rRAGE könnte eine supportive Therapiemaßnahme im akuten Leberversagen darstellen.

4 DISKUSSION

4.1 Diskussion von Material und Methoden

4.1.1 Diskussion des Modells

Das akute Leberversagen resultiert aus dem funktionellen Verlust von Leberparenchym und führt u.a. zu Enzephalopathie, Veränderungen der Hämodynamik, disseminierter intravasaler Gerinnung und häufig in der Folge zu zerebralen Ödemen und zu Niereninsuffizienz (O'Grady, 2005). Da trotz beachtlicher Fortschritte im Bereich des Intensivmanagements die Mortalität im septischen Leberversagen sehr hoch ist (Du et al., 2010), sind standardisierte Tierversuche nötig, um zum einen die Pathophysiologie des akuten Leberversagens besser zu verstehen und zum anderen Therapieansätze zu überprüfen (Newsome et al., 2000). Deshalb ist es eine notwendige Herausforderung, ein Modell des akuten Leberversagens zu entwickeln, das dem menschlichen Leberversagen möglichst ähnlich ist. Hierfür haben Terblanche und Hickman (1991) Voraussetzungen vorgeschlagen, die ein optimales Modell erfüllen sollte: Reversibilität, Reproduzierbarkeit, Tod durch Leberversagen, ein überschaubares therapeutisches Fenster, eine repräsentative Anzahl an Versuchstieren und eine Minimierung der Gefahr für das Personal. Dass bis heute ein solches Modell, das alle Kriterien lückenlos erfüllt, nicht geschaffen werden konnte, unterstreicht die Komplexität dieses Krankheitsbildes (Newsome et al., 2000).

Verschiedene Modelle imitieren die klinischen Zeichen und Laborparameter eines akuten Leberversagens. Diese Modelle können in drei Untergruppen untergeteilt werden: Leberversagen durch chirurgische Intervention (partielle Hepatektomie, I/R), toxisches Leberversagen (z. B. durch Paracetamol oder Galaktosamin) und infektiöses Leberversagen (virale Hepatitiden). Die meisten Modelle basieren auf chirurgischen Techniken oder der Applikation von toxisch wirkenden Substanzen. Da die infektiösen Ansätze das menschliche Leberversagen nicht ausreichend imitieren (Tuñón et al., 2009), werden diese in der nachfolgenden Diskussion vernachlässigt. Bei den chirurgischen Ansätzen kann zwischen Hepatektomien, transientscher Ischämie und Kombinationen von beiden unterschieden werden. Als Beispiel soll hier die partielle Hepatektomie genannt werden, die die Hepatektomie simuliert, wie sie beim Menschen zur Entfernung von Lebertumoren vorgenommen wird. Studien konnten zeigen,

dass eine 95%ige Leberresektion zu einem akuten Leberversagen in Ratten führt und letal endet (He et al., 2003; Makino et al., 2005). Werden dagegen weniger als 90% reseziert, kann das Lebergewebe regenerieren. Vorteile dieses Modells werden in der Reproduzierbarkeit gesehen. Als nachteilig gilt die Irreversibilität, die Abhängigkeit von den chirurgischen Fähigkeiten des Operateurs und der häufig fehlende Anstieg von biochemischen Parametern (Tuñón et al., 2009). Diese Probleme können durch Induktion eines toxischen Leberversagens vermieden werden. Dazu zählt u.a. das Paracetamol-induzierte Leberversagen, welches die häufigste Ursache für ein akutes Leberversagen in den USA und in Großbritannien darstellt (Lee, 2008). Paracetamol wird in der Leber einerseits durch Konjugation mit Glucuronsäure und Sulfat biotransformiert, andererseits entsteht durch Oxidation über Cytochrom P das toxische Zwischenprodukt N-Acetyl-p-benzochinonimin (NAPQI). NAPQI kann bei therapeutischen Dosen durch Konjugation mit Glutathion entgiftet werden. Bei einer Überdosierung erschöpft sich aber die Entgiftungskapazität des GSH und NAPQI bindet an SH-Gruppen hepatischer Proteine. Dies führt zu einer Unterbrechung des mitochondrialen Kalziumflusses und nachfolgend - durch entstandene Hydroxyradikale, Nitrite und Nitrate - zu Apoptose und Nekrose von Hepatozyten (Sakai et al., 1992). Positiv an diesem Modell ist zu bewerten, dass es auf Grund von häufig auftretenden Paracetamolintoxikationen beim Menschen von großer klinischer Relevanz ist. Auf der anderen Seite ist als problematisch anzusehen, dass der hepatische Metabolismus und somit die Detoxifikation von Paracetamol spezies- und altersabhängig ist (Gregus et al., 1988; Rahman et al., 2002). Des Weiteren fehlt die Standardisierung von Dosis, Applikationsart und die fragliche Induktion des Cytochrom-P-Systems durch weitere Medikamente (Miller et al., 1976; Francavilla et al., 1989). Dies führt zu häufig fehlender Reproduzierbarkeit und einer Gradwanderung zwischen Leberschaden und Tod des Versuchstieres (Newsome et al., 2000; Terblanche & Hickman, 1991).

Ein weiteres Modell zur toxischen Leberschädigung stellt die Gabe von Galaktosamin dar. Galaktosamin wirkt leberspezifisch und wird in Nagetieren ausschließlich von der Leber eliminiert (Decker & Keppler, 1974), was zu einer selektiven Depletion von Uridinukleotiden in diesem Organ und damit zu einer hepatischen Transkriptions- und Translationsblockade führt (Anukarahanonta et al., 1973). Narkotisierte Hunde zeigen nach Galaktosamin-Applikation typische Symptome eines humanen akuten Leberversagens. Dazu zählen der Anstieg von Leberenzymen, Bilirubin, Laktat und Ammoniak, sowie eine disseminierte intravasale Gerinnung, Hypoglykämie, hepatisches Koma und der Anstieg des intrakraniellen Druckes. Ohne Anästhesie sind diese Effekte weniger ausgeprägt (Keppler et

al., 1968). Schwierigkeiten dieses Modells liegen in der unterschiedlichen Sensibilität gegenüber Galaktosamin bei verschiedenen Spezies und im divergierenden Intervall zwischen Auftreten des Leberschadens und Exitus des Tieres. Des Weiteren ist Galaktosamin teuer und birgt ein gesundheitliches Risiko für das Personal (Tuñón et al., 2009). Häufig wird Galaktosamin mit der Gabe von LPS kombiniert. LPS ist eine Komponente der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien, die im Blut durch das von Hepatozyten gebildete LPS-bindende Protein (LBP) transportiert wird (Nakamura et al., 2000; Berczi, 1998). Die Bindung des LBP/LPS-Komplexes an CD14 und den Toll-like Rezeptor-4 (TLR4) aktiviert die Produktion inflammatorischer Zytokine und führt somit zur Aktivierung einer Immunreaktion. Dies geschieht über verschiedene Signalmoleküle (unter anderem MyD88, IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase (IRAK), TNF-assoziiierter Faktor-6 (TRAF6)) und die I κ B-Kinase, welche den Abbau von I κ B und somit die Translokation des Transkriptionsfaktors NF κ B in den Nukleus bewirken. Hierbei werden Monozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten stimuliert, immunregulatorische und proinflammatorische Zytokine wie z. B. TNF- α und IL-1 zu produzieren, wodurch die Kaskade, die zum endotoxischen Schock führen kann, in Gang gesetzt wird (Ulevitch & Tobias, 1995; Nakamura et al., 2003).

Endotoxinämie-Modelle gewinnen immer mehr an Bedeutung, da in den letzten Jahren dem Zusammenhang zwischen Lebererkrankungen und Endotoxinämie immer mehr Aufmerksamkeit gewidmet wurde. In Tierstudien konnte gezeigt werden, dass verschiedene Lebererkrankungen mit Endotoxinämie einhergehen. Auch klinische Beobachtungen unterstützen diesen Zusammenhang (Han, 2002). Als problematisch erweist sich bei einer durch LPS induzierten Endotoxinämie häufig die schwierige Reproduzierbarkeit und das schmale zeitliche Fenster bis zum Exitus der Versuchstiere (Tuñón et al., 2009). Des Weiteren vernachlässigt das LPS-Modell die Vermehrung von Bakterien und deren Bekämpfung und Elimination durch das Immunsystem. Daher wird an diesem Modell immer wieder kritisiert, dass es die klinische Situation der humanen Endotoxinämie nicht ausreichend imitieren kann (Remick & Ward, 2005). Die Kombination von Gal/LPS dagegen, die ein weit verbreitetes Modell zur Induktion eines Endotoxin-Schocks präsentiert, stellt eine Möglichkeit dar, sich dem humanen septischen Leberversagen zu nähern (Rothe et al., 1993). Neben der Endotoxinämie führt die Kombination mit dem leberspezifisch wirkenden Galaktosamin zu einem fulminanten hepatozellulären Schaden in Mäusen (Bohlinger et al., 1996).

Allen diskutierten Modellen ist gemeinsam, dass sie einige Symptome des akuten Leberversagens widerspiegeln, aber die Komplexität dieser Erkrankung nicht vollständig erfassen

können. In Tiermodellen wird nur selten berücksichtigt, dass Patienten, die ein septisches Leberversagen entwickeln, häufig geriatrische Patienten mit vielen Komorbiditäten sind und auf Intensivstationen Antibiotika und unterstützende Therapien, wie Volumensubstitution und Beatmung, erhalten. Dies ist ein weiterer Grund dafür, dass effektive Therapiestrategien nicht direkt von erfolgreichen tierexperimentellen Ergebnissen abgeleitet werden können (Esmon et al., 2004; Rittirsch et al., 2007).

In der vorliegenden Studie wurde das durch Gal/LPS-induzierte Modell des akuten Leberversagens angewendet. Durch die Kombination beider Substanzen kann sicher gestellt werden, dass neben der Endotoxinämie (vorrangig durch LPS) auch ein fulminanter hepatischer Schaden (vorrangig durch Galaktosamin) auftritt. Besonders von Vorteil für die vorliegende Studien erweisen sich das kurze und gut reproduzierbare Zeitintervall bis zum Eintreten des Leberversagens (Remick et al., 2000) und die Möglichkeit, das Ausmaß des Leberversagens anhand der Konzentration der Lebertransaminasen zu kontrollieren (Eipel et al., 2007). Ein weiterer Aspekt für die Wahl des Gal/LPS-Modells ist die geplante Durchführung der Altersstudie. Da geriatrische Patienten häufiger als junge Patienten an einem septischen Leberversagen erkranken und die Mortalität bei ihnen deutlich erhöht ist (Nomellini et al., 2009), bietet sich dieses Modell an, um Therapieansätze zu prüfen.

4.1.2 Diskussion der Altersstudie

Es gibt nur wenige Studien zur Lebenserwartung verschiedener Geno- und Phänotypen von Mausstämmen. Für die vorliegenden Untersuchungen wurden juvenile (6-8 Wochen), adulte (36-38 Wochen) und seneszente (72-76 Wochen) UCP2 $+/+$ und UCP2 $-/-$ Mäuse verwendet. Das Alter der juvenilen Tiere wurde so gewählt, dass die Tiere noch heranwachsend, aber frei von neonatalen Charakteristika und von den Muttertieren abgesetzt (nach ca. drei Wochen) waren (Vollmar et al., 2000). Da die UCP2-Defizienz zu vermehrtem oxidativen Stress führt (Horimoto et al., 2004), lag die Frage nahe, ob dies Auswirkungen auf die Lebenserwartung hat. Andrews und Horvath konnten nachweisen, dass die Lebenserwartung bei UCP2 $-/-$ Tieren auf 19 Monate begrenzt ist, während die UCP2-kompetenten Tiere im Durchschnitt 28 Monate leben (Andrews & Horvath, 2009). Aufgrund dessen wurden für die vorliegende Studie 72-76 Wochen alte Tiere als seneszent angesehen.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der vorliegenden Studie diskutiert. Der Schwerpunkt liegt hierbei auf den Wechselwirkungen der AGE/RAGE-Interaktion. Im Mittelpunkt steht die mitochondriale Dysfunktion (UCP2-Defizienz), die mit gesteigertem oxidativen Stress, einer verminderten Glyoxalase-I-Aktivität und somit einer vermehrten AGE-Akkumulation einhergeht. Gleichzeitig führt die UCP2-Defizienz zu erhöhter RAGE- und verminderter sRAGE-Expression, was das Überleben bei akutem Leberversagen negativ beeinflusst. Da der Alterungsprozess zu vermehrtem oxidativen Stress führt, relativiert sich eine UCP2-Defizienz im Alter.

4.2.1 Mitochondriale Dysfunktion

Schon frühzeitig in der Evolution zeigten sich Sauerstoff und seine reaktiven Metabolite als Bedrohung für die primitive eukaryote Zelle. Der reaktive Charakter von ROS führte zur Notwendigkeit Abwehrmechanismen zu entwickeln, um zelluläre Makromoleküle vor der ROS-bedingten Schädigung zu schützen. Bei einer gesteigerten ROS-Produktion scheitern diese Abwehrmechanismen. Es kommt zu einer Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion und konsekutiv zu Zellschäden (Ott et al., 2007). Folgen dieser mitochondrialen Dysfunktion können Pathologien wie Krebserkrankungen, Diabetes Typ II, Arteriosklerose, chronische inflammatorische Prozesse und viele neurodegenerative Erkrankungen sein (Droge, 2002). Paradoxe Weise sind Mitochondrien selbst an einem großen Anteil der intrazellulären ROS-Produktion, verursacht durch die Komplexe I und II der Atmungskette, beteiligt, können aber gleichzeitig durch ‚mildes Uncoupling‘ die Formation von ROS vermindern. Die Defizienz von UCP2 führt zu einer gravierenden Beeinträchtigung des milden Uncouplings. So konnten Arsenijevic et al. nachweisen, dass Makrophagen von UCP2 ^{-/-} Mäusen nach Infektion mit *T. gondii* deutlich mehr ROS als Mäuse vom Wildtyp produzieren (Arsenijevic et al., 2000). Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch ohne Infektion und ohne jegliche Vorbehandlung die Defizienz von UCP2 zu signifikant erhöhten MDA-Konzentrationen gegenüber den UCP2 ^{+/+} Tieren führt. Einen Schutzmechanismus gegenüber ROS stellt unter physiologischen Bedingungen Glutathion (GSH) dar (Kondo et al., 2009). Aufgrund seiner freien Thiolgruppe kann GSH Elektronen

auf ROS übertragen und diese so detoxifizieren (Forman et al., 2009). Dabei wird Glutathion oxidiert und geht von seiner monomeren Form in das GSH-Dimer (GSSG) über. Durch das Enzym Glutathion-Reduktase können aus GSSG, unter Verbrauch von NADPH, wieder zwei reduzierte GSH entstehen. Neben diesem Recycling-Mechanismus ist der Organismus auch zur de-novo Synthese von GSH befähigt. Katalysiert durch das Enzym γ -Glutamylcystein-Synthetase, entsteht aus den Aminosäuren Glutaminsäure und Cystein γ -Glutamylcystein. Die GSH-Synthetase formiert dann durch Verbindung von Glycin und γ -Glutamylcystein GSH (Akai et al., 2007). Dass die Depletion von GSH mit dem Leben nicht vereinbar ist, konnten Dalton et al. nachweisen. Sie konnten zeigen, dass ein γ -Glutamylcystein-Synthetase-Knockout zu massiver hepatozellulärer Apoptose mit konsekutivem Exitus der Mäuse führt (Dalton et al., 2004). Um eine Aussage über die zur Verfügung stehenden GSH-Ressourcen treffen zu können, wurde in der vorliegenden Studie die GSH/GSSG-Ratio genutzt. Es konnte gezeigt werden, dass UCP2-Defizienz nicht nur zu erhöhtem oxidativen Stress (hohe MDA-Konzentrationen), sondern gleichermaßen zum Verbrauch von Schutzmechanismen, sichtbar an der reduzierten GSH/GSSG-Ratio, führt.

Weiterhin besteht ein enger Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und dem Glukosemetabolismus. Hyperglykämie kann zur Autooxidation von Glukose und Glukosemetaboliten, der Aktivierung der NADPH-Oxidase, der Entkopplung der Stickstoffmonoxid-Synthase und dem Entweichen von Elektronen aus der mitochondrialen Atmungskette führen (Brownlee, 2001; Rösen & Du, 2000), was in der Folge in einer vermehrten Bildung von ROS resultiert (Hoppichler, 2002). Brownlee und Mitarbeitern ist es gelungen, die genannten Ursachen der ROS-Formation in einem einheitlichen Konzept zusammenzufassen (‘unifying hypothesis’) (Brownlee, 2001). Sie konnten zeigen, dass eine Überladung von Endothelzellen mit Substraten wie Glukose und Fettsäuren den mitochondrialen Elektronenfluss in einem Ausmaß ansteigen lässt, dass der kritische Grenzwert für das Membranpotenzial überschritten wird, so dass es zu einer massiven Generierung von ROS kommt. Sie wiesen sowohl die Abhängigkeit der ROS-Bildung vom Substratangebot als auch die partielle Entkopplung des mitochondrialen Elektronenflusses zwischen Komplex II und III der Atmungskette nach. Gleichzeitig war es ihnen möglich zu beweisen, dass als Folge der ROS-Bildung Diabetes-spezifische Signalwege aktiviert werden. Dazu gehören die Aktivierung der Proteinkinase C, des Hexosaminstoffwechselwegs, der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und SP-1, die Bildung von AGEs, sowie die verminderte Verfügbarkeit von NO (Brownlee, 2001). Die Aktivierung der genannten Signalwege geschieht entweder direkt durch ROS oder

indirekt durch die ROS-bedingte Hemmung der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH) (Du et al., 2003). Eine Hemmung dieses Enzyms führt zu einem Anstau von Glukosemetaboliten. Die gerade diskutierten Studien konnten zeigen, dass oxidativer Stress eine Folge der Hyperglykämie ist. Aber umgekehrt kann auch die Hyperglykämie eine Folge des oxidativen Stresses sein (Giacco & Brownlee, 2010). In der vorliegenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass der primär vorhandene oxidative Stress durch eine angeborene mitochondriale Dysfunktion zu einer Hyperglykämie führt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass oxidativer Stress mit der Signalkette des Insulins interferiert und damit zur Entwicklung einer Insulinresistenz beitragen kann. So ist z. B. die Insulin-abhängige Aufnahme von Glukose durch Adipozyten und L6-Muskelzellen gestört, wenn diese Zellen oxidativem Stress ausgesetzt sind. Sowohl die Translokation des Glukosetransporters Glut4 als auch die Aktivierung eines wichtigen Stellgliedes in der Insulinsignalkette, der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3-Kinase), sind beeinträchtigt (Rudich et al., 1997). Wird der oxidative Stress durch Antioxidanzien abgefangen, so wird die Insulin-abhängige Glukoseaufnahme durch die Zellen wieder normalisiert (Rudich et al., 1998).

Der Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und dem Alterungsprozess wird seit Jahrzehnten diskutiert (Kondo et al., 2009). Harman definiert den Alterungsprozess sogar als die Akkumulation von oxidativen Schäden an Zellen und Geweben, die mit einem progressiven Anstieg der Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Morbidität und Mortalität assoziiert sind (Beckman & Ames, 1998). Studien konnten bestätigen, dass Menschen, die besonders alt werden, sog. ‚Centenarians‘ (100jährige) eine geringere ROS-Belastung und wirksamere Schutzmechanismen aufweisen. Der altersbedingte Abfall des wichtigsten zellulären Antioxidanz GSH ist bei diesen Personen geringer ausgeprägt (Bieger, 2001). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte ein Abfall der GSH/GSSG-Ratio in der Seneszenz bei UCP2-kompetenten Tieren nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass bei Tieren mit einer mitochondrialen Dysfunktion (UCP2 -/-) die GSH/GSSG-Ratio von Geburt an bereits auf einem niedrigen Niveau liegt, während der oxidative Stress mit dem Alter ansteigt. Um den oxidativen Stress zu vermindern, ist der Alterungsprozess bei UCP2-kompetenten Tieren durch eine Steigerung der UCP2-Expression charakterisiert (Barazzoni & Nair, 2001). Als Konsequenz daraus sinken aber die ATP-Level und die Energieproduktion der Zelle wird negativ beeinflusst (Le Minh et al., 2009; Barazzoni & Nair, 2001). Somit scheinen sich die negativen Auswirkungen einer UCP2-Defizienz durch den Alterungsprozess zu relativieren.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass die Dysbalance zwischen oxidativem Stress und antioxidativen Mechanismen, die unter physiologischen Bedingungen erst im Alterungsprozess auftritt, bei UCP2-Defizienz von Geburt an vorliegt.

4.2.2 Interaktion von AGEs und RAGE

Biochemisch geht die Entstehung von AGEs auf eine nicht-enzymatische Reaktion zwischen der Aminogruppe eines Proteins und der Aldehydgruppe von Glukose zurück (Reddy et al., 2009), bei der über eine Schiff'sche Base ein sogenanntes Amadori-Produkt entsteht, das über verschiedene Intermediate in AGEs überführt wird. Beschleunigt wird dieser Vorgang durch Hyperglykämie und oxidativen Stress (Tessier, 2010). Charakteristisch für AGEs ist das Ausbilden von Cross-links mit und zwischen Aminogruppen, was dazu führt, dass die AGEs gegenüber proteasomalem Abbau resistent werden (McCance et al., 1993). Die Intermediate, die noch keine Cross-link-Formation aufweisen, können über ein Enzymsystem, bestehend aus Glyoxalase I und II, zu Laktat und Pyruvat verstoffwechselt werden (Thornalley, 2003). Die Arbeitsgruppe von Brouwers konnte den protektiven Effekt der Glyoxalase nachweisen, indem sie zeigten, dass eine Glyoxalase-I-Überexpression in diabetischen Ratten zu einer Reduktion der AGE- und MDA-Konzentrationen um 50% im Vergleich zu Kontrollgruppe führt (Brouwers et al., 2010). In der vorliegenden Studie konnte zusätzlich gezeigt werden, dass genau die Aktivität dieses Enzymsystems bei UCP2-Defizienz und im Alterungsprozess in beiden Tierstämmen vermindert ist. Die Folge ist die Akkumulation von AGEs, die sich durch den Alterungsprozess in beiden Tierstämmen (UCP2 +/+ und UCP2 -/-) potenziert. Ein weiterer Grund für die vermehrte altersabhängige AGE-Konzentration ist die im Alter verminderte Eliminierung von AGEs durch die Leber, was auf die Pseudokapillarisation von Sinusoiden sowie auf den Verlust von Fenestrae und die Formation einer Basallamina zurückzuführen ist (Ito et al., 2007). Insgesamt zeigt sich die gesteigerte Bildung bzw. verminderte Elimination von glykierten Proteinen bei den UCP2-defizienten Mäusen auf einem höheren Niveau als bei UCP2-kompetenten Tieren. Zurückzuführen ist diese Entwicklung auf den erhöhten oxidativen Stress, verbunden mit der Hyperglykämie (Reddy et al., 2009) und der verminderten Glyoxalase-I-Aktivität in den Tieren mit der mitochondrialen Dysfunktion (Brouwers et al., 2010). Die nicht eliminierten AGEs können an verschiedene Zelloberflächenrezeptoren binden und dadurch eine Signalkaskade auslösen, die zur

Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und zur entsprechenden Zielgenexpression führt. Die Rezeptoren AGE-R1, AGE-R2, AGE-R3, der Scavenger-Rezeptor II und RAGE wurden als potenzielle Rezeptoren identifiziert (Thornalley, 1998b). Speziell die Interaktion von AGEs und RAGE wird immer wieder, besonders im Zusammenhang mit Pathologien wie Diabetes mellitus, dem Alterungsprozess, chronischer Niereninsuffizienz, Inflammation und Hypoxie, diskutiert (Ramasamy et al., 2010). Dabei ist RAGE ein Multiligandenrezeptor, der neben AGEs auch Amyloid A (Yan et al., 2000), S100/Calgranuline (Marenholz et al., 2004) und HMGB1 (Wang et al., 1999) bindet. Das Binden von AGEs, aber auch anderer Liganden an RAGE, führt intrazellulär zur Generierung von ROS und vermindert gleichzeitig antioxidative Abwehrmechanismen (Lander et al., 1997; Wautier et al., 2001). Die Folge sind unter anderem verminderte Vitamin-C- und GSH-Konzentrationen. Verminderte GSH-Konzentrationen führen wiederum zu reduziertem Recycling der Glyoxalase-I und zu einer verminderten in situ Aktivität, was in der Konsequenz zur Akkumulation von AGE-Vorstufen führt (Thornalley, 1998b, Bierhaus et al., 1997). In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass UCP2-Defizienz eine erhöhte RAGE-Expression mit sich bringt. Dies ist zumindest teilweise auf die erhöhte AGE-Formation zurückzuführen, welche die Bildung von RAGE-mRNA induziert (Tanaka et al., 2000). Wie aufgrund des Nachweises des erhöhten oxidativen Stresses und der gesteigerten AGE-Formation im Alter zu erwarten war, zeigt sich mit dem Alterungsprozess eine gesteigerte RAGE-Expression in der Leber. Die Signifikanz, die sich bei den juvenilen Tieren errechnen lässt, verliert sich mit fortschreitendem Alter. Zu ähnlichen Ergebnissen kam eine Studie, welche die RAGE-Expression bei Optikusneuropathie an Nn. optici von verstorbenen Patienten mit Morbus Alzheimer mit einer gesunden Kontrollgruppe verglich. Die Arbeitsgruppe konnte feststellen, dass die RAGE-Expression bei Patienten mit Morbus Alzheimer deutlich erhöht ist. Zusätzlich zeigt sich eine erhöhte RAGE-Expression in beiden Gruppen im Alter (Wang et al., 2009).

Neben dem membranständigen RAGE existiert ein löslicher RAGE (soluble, sRAGE), der frei zirkuliert und somit keine intrazellulären Kaskaden aktivieren kann. Eine Bindung von Liganden an sRAGE dient als Schutz vor einer proinflammatorischen Antwort (Buccirarelli et al., 2002; Schmidt et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde die These aufgestellt, dass diese ‚protektive‘ Variante von RAGE bei oxidativem Stress und damit auch im Alter erniedrigt ist, was im ELISA und in den immunhistochemischen Untersuchungen bestätigt werden konnte. Die UCP2-defizienten Tiere weisen deutlich erniedrigte sRAGE-Konzentrationen auf und auch im Alter kommt es zu einer signifikanten Reduktion. Einen

Zusammenhang zwischen erniedrigtem sRAGE und verschiedenen Erkrankungen konnten Emanuele et al. am Beispiel der Alzheimer'schen Erkrankung und der vaskulären Demenz aufzeigen (Emanuele et al., 2005). Auch eine aktuelle Studie zur Rolle von RAGE bei Atherosklerose unterstützt die Daten der vorliegenden Studie. Es konnte nachgewiesen werden, dass Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung eine erhöhte Expression von RAGE und S100A12, sowie hohe Konzentrationen von hochsensitivem C-reaktivem Peptid aufweisen. sRAGE dagegen zeigt sich deutlich erniedrigt (Mahajan et al., 2009).

4.2.3 Vulnerabilität gegenüber Inflammation

Inflammation ist assoziiert mit der Generierung freier Radikale. Dieses ist ein physiologischer Prozess zur Abwehr von und zum Schutz vor fakultativ pathogenen Organismen. Da freie Radikale in physiologischen Prozessen dauerhaft anfallen, wird das Gewebe durch antioxidative Mechanismen vor Zellschäden geschützt und ausgefeilte Reparaturmechanismen können ROS-bedingte DNA-Schäden beheben. Kommt es durch Pathologien verschiedenster Genese zu einer Dysbalance zwischen freien Radikalen und antioxidativen Mechanismen, werden ROS und RNS zu Schlüsselmediatoren von Inflammation, Zellproliferation und Zelltod (Roberts et al., 2010). Diese Dysbalance zwischen freien Radikalen und antioxidativen Mechanismen konnte in der vorliegenden Studie bei UCP2-Defizienz nachgewiesen werden. Daher war es naheliegend, weiterführend die Vulnerabilität gegenüber Inflammation bei diesen Tieren zu untersuchen. Auf die Induktion eines septischen Lebersversagens reagieren beide Tierstämme mit massivem Transaminasenanstieg, sowie vermehrter Apoptose und Nekrose. Bei den UCP2-defizienten Tieren spiegelt sich das Ausmaß der Inflammation aber in signifikant höheren Transaminase-Konzentrationen und deutlich gesteigertem Zelltod im Vergleich zur UCP2 +/+-Gruppe wider. Eine mitochondriale Dysfunktion stellt sich aber nicht nur in der Akutsituation als nachteilig dar. So konnten Horimoto et al. zeigen, dass UCP2-defiziente Mäuse aufgrund von oxidativem Stress nach partieller Hepatektomie unter einer verzögerten Regeneration leiden (Horimoto et al., 2004). Im Zusammenhang mit oxidativem Stress und Inflammation wird auch immer wieder die Rolle von RAGE diskutiert. Unter physiologischen Bedingungen wird RAGE von diversen Zellen auf geringem Niveau exprimiert. Bei pathologischen Prozessen, wie bei Diabetes mellitus, neurodegenerativen Erkrankungen oder Inflammation, kommt es zu einer Steigerung

der Expression (Ramasamy et al., 2010). So untersuchten Boyd et al. die Rolle von RAGE am Herzen bei Endotoxinämie an Mäusen. Sie stellten fest, dass ein durch LPS-induzierter Schock zu einem Anstieg von S100A8 und S100A9 im Herzmuskel führt. In Abhängigkeit von RAGE kommt es zu einem verminderten Kalziumfluss, sowie zu einer verminderten Ejektionsfraktion des linken Ventrikels. In vitro kann zusätzlich eine eingeschränkte Kontraktilität beobachtet werden (Boyd et al., 2008). Die vorliegende Arbeit konnte diese Beobachtungen für das septische Leberversagen bestätigen. So kann eine signifikant erhöhte RAGE-Expression im akuten Leberversagen sowohl bei den UCP2-kompetenten Tieren als auch bei den UCP2-defizienten Tieren im Vergleich zu den sham-Gruppen nachgewiesen werden. Da RAGE ein Multiligandenrezeptor ist, erweist es sich als schwierig, die Rolle der verschiedenen Liganden zu differenzieren. Die Untersuchungen zu RAGE-Liganden bei akuten pathologischen Prozessen beschränken sich wesentlich auf HMGB1. Von diesem Protein konnte nachgewiesen werden, dass es z. B. zu einer Exazerbation des durch Concanavalin-A induzierten Leberschaden bei Mäusen führt (Gong et al., 2010). Die Studienlage zur Rolle von AGEs bei akut inflammatorischen Prozessen, speziell mit Leberbeteiligung, ist gering. Die Forschungsschwerpunkte liegen in der Regel auf der Untersuchung von chronischen Prozessen wie Diabetes mellitus und Atherosklerose (Miyazawa et al., 2010). Allerdings wird auch bei Patienten mit nicht-alkoholtoxischer Leberzirrhose erhöhtes CML in der Leber gefunden (Sebeková et al., 2002). In der vorliegenden Studie konnte erstmalig gezeigt werden, dass auch erhöhter oxidativer Stress zu einer vermehrten Formation von AGEs führt, welche über die Bindung an RAGE intrazelluläre Kaskaden auslösen und in das akute Entzündungsgeschehen eingreifen können. Inflammatorische Prozesse gehen mit einem erhöhten Sauerstoffbedarf einher und führen so häufig zu einer Hypoxie. Aktuelle Studien konnten zeigen, dass unter hypoxischen Bedingungen in Endothelzellen und Makrophagen vermehrt AGEs generiert werden und vermehrt RAGE exprimiert wird. Der Nachweis einer gesteigerten Freisetzung von HMGB1 oder S100/Calgranulin kann dagegen nicht erbracht werden (Chang et al., 2008; Xu et al., 2010). Dies betont die bedeutende Rolle der AGE/RAGE-Interaktion im akuten, septischen Leberversagen. Die Abb. 20 fasst das komplexe Zusammenspiel der verschiedenen Faktoren vereinfacht zusammen.

Unabhängig von der komplexen AGE/RAGE-Interaktion nimmt UCP2 Einfluss auf die Vulnerabilität gegenüber Inflammation und somit auf das Überleben im septischen Leberversagen. Die durchgeführten Überlebensstudien, die sowohl UCP2-kompetente als

auch UCP2-defiziente Tiere der verschiedenen Altersklassen miteinander vergleichen, zeigen, dass die UCP2-Kompetenz - trotz der verminderten ROS-Produktion - bei Inflamationsprozessen keinen Überlebensvorteil bietet. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass UCP2 zum ‚milden Uncoupling‘ und somit zu verminderten ATP-Konzentrationen führt (Le Minh et al., 2009) und der dadurch verminderte Energiehaushalt das Überleben beeinträchtigt. Unterstützt wird diese These von Evans et al., welche die Rolle von UCP2 bei I/R von Mäusen mit Steatosis hepatis untersuchten. Sie konnten zeigen, dass UCP2 zu verminderten ATP-Konzentrationen führt und somit in der Folge die Apoptose der Nekrose weicht (Evans et al., 2008).

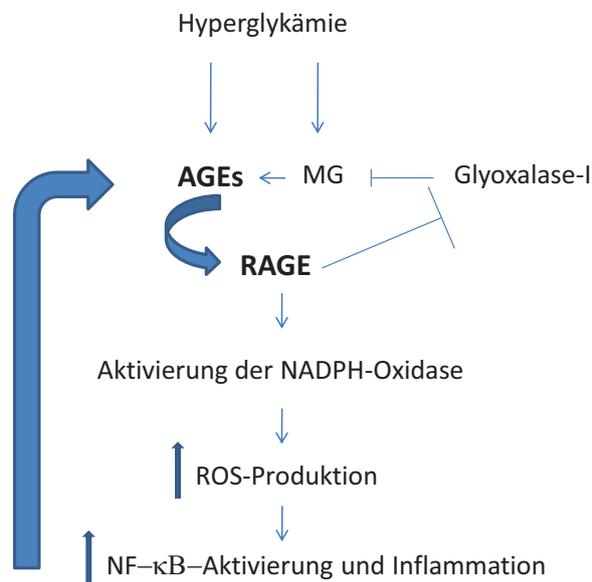


Abb. 21: Zusammenfassung der Faktoren, die Einfluss auf die AGE/RAGE-Interaktion nehmen können.

(AGEs = Advanced Glycation Endproducts, MG = Methylglyoxal, NF-κB = Nuclear Factor kappa B, ROS = Reactive Oxygen Spezies, RAGE = Receptor for Advanced Glycation Endproducts)

(Modifiziert nach Ramasamy et al., 2010)

4.2.4 Protektion durch körpereigenes sRAGE und Applikation von rRAGE bei Inflammation

Frei zirkulierendes RAGE (sRAGE) dient dem Organismus als Schutzmechanismus, indem es durch Bindung verschiedener Liganden diese inaktiviert und eine proinflammatorische Antwort dämpft (Bucciarelli et al., 2002; Schmidt et al., 2001). Um sRAGE zu generieren, stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung. Zum einen kann durch das Enzym „a disintegrin and metalloprotease 10“ (ADAM10) der membranständige Rezeptor von der Zellmembran gespalten werden, zum anderen kann sRAGE als Produkt alternativen Splicens entstehen. Die Splice-Produkte sind auch als esRAGE (endogenous RAGE) bekannt (Raucci et al., 2008; Hudson et al., 2008). Da mit der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden konnte, dass eine mitochondriale Dysfunktion - im Sinne einer UCP2-Defizienz - zu verminderten sRAGE-Konzentrationen im Vergleich zur sham-Gruppe führt, stellte sich die Frage, ob sRAGE substituierbar ist und somit die prophylaktische Gabe von rRAGE vor Induktion eines septischen Leberversagens mit Gal/LPS Einfluss auf die Inflammation und das Überleben nimmt. Schon andere Schädigungsmodelle der Leber konnten zeigen, dass die Applikation von rRAGE die Inflammation reduziert. Zeng et al. konnten dieses für das Modell der hepatischen Ischämie/Reperfusion beweisen. Sie unterzogen Mäuse einer 75-minütigen Ischämie mit darauf folgender Reperfusion der Leber. Die rRAGE-Gruppe erhielt 12 Stunden vor dem Eingriff und danach ein Mal täglich 100 µg rRAGE, die Kontrollgruppe die gleiche Menge PBS. 30% der Kontrollgruppe überlebten den siebten Tag, während 84% der Tiere, die rRAGE erhalten hatten, überlebten. Ekong et al. untersuchten die Rolle von rRAGE im Paracetamol-induzierten Leberversagen. Hierfür wurde den Mäusen 1125 mg/kg Paracetamol verabreicht. Die Applikation von 100 µg sRAGE wurde einen Tag vor Paracetamol-Gabe begonnen und dann täglich fortgeführt. Die Kontrollgruppe erhielt täglich 100 µl NaCl. 50% der mit rRAGE behandelten Tiere überlebten den siebten Tag, aber nur 10% der Kontrollgruppe (Ekong et al., 2006). In der vorliegenden Studie konnte die protektive Rolle von sRAGE bestätigt werden. So steigert die prophylaktische Applikation von rRAGE das Überleben der UCP2-defizienten Tiere um 30% im Vergleich zur Gruppe ohne rRAGE-Therapie. Bei den UCP2-kompetenten Tieren ist der therapeutische Effekt geringer. Hier kann das Überleben nur um 10% verbessert werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die Signalkaskade, die durch Binden eines Liganden an RAGE aktiviert wird, auch davon abhängig ist, ob es sich um einen akuten oder einen chronischen Prozess handelt (Ramasamy et al., 2009). Die Defizienz von UCP2 in den Knock-out-Tieren und die damit

einhergehenden Komplikationen sind chronischer Natur. Von Geburt an sind die UCP2-defizienten Tiere dem Zusammenspiel aus oxidativem Stress, AGE-Akkumulation und erhöhter RAGE-Expression ausgesetzt. Durch die Gabe von rRAGE im akuten Leberversagen wird dieser Circulus unterbrochen. Bei den UCP2-kompetenten Tieren hingegen handelt es sich um einen akuten Prozess, nämlich das septische Leberversagen. Hierbei scheinen andere Reaktionsmechanismen im Vordergrund zu stehen und so bleibt der protektive Effekt durch die Gabe von rRAGE vermindert. Dazu kommt, dass - wie schon mehrfach erwähnt - UCP2 zum ‚milden Uncoupling‘ und somit zu verminderten ATP-Konzentrationen führt (Le Minh et al., 2009) und dass der dadurch verminderte Energiehaushalt das Überleben beeinträchtigt.

Zusätzlich konnten Wang et al. während des Alterungsprozesses eine erhöhte RAGE-Expression nachweisen (Wang et al., 2009). Zu gleichem Ergebnis kam unsere Studie auch und konnte zudem noch zeigen, dass sich die RAGE-Expression und die zirkulierenden sRAGE-Konzentrationen altersabhängig reziprok zueinander verhalten. Während die Expression der membranständigen Form des Rezeptors - wie schon beschrieben - mit dem Alterungsprozess zunimmt, vermindert sich die Konzentration der löslichen, protektiven Form. Eine Substitution durch rRAGE nimmt bei seneszenten Tieren jedoch keinen Einfluss auf das Überleben im akuten Leberversagen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass im Alter von uns nicht erfassten Mediatoren ein größerer Stellenwert zukommt oder dass AGEs während des Alterungsprozesses durch Cross-linking derart in ihrer Struktur verändert werden (Desai et al., 2010), dass sie gegenüber Detoxifikation durch rRAGE resistent werden. Außerdem geht der Alterungsprozess mit einer erhöhten UCP2-Expression einher (Barazzoni & Nair, 2001), was eine Ablösung der Apoptose durch Nekrose, verbunden mit einer inflammatorischen Reaktion, mit sich bringen kann (Evans et al., 2008).

4.3 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Die vorliegende Studie wurde durchgeführt, um bei UCP2-Defizienz die Vulnerabilität gegenüber inflammatorischen Stimuli, die Rolle von AGE/RAGE-Interaktionen im akuten Lebersversagen und die Wirkung einer rRAGE-Applikation bei Gal/LPS-induziertem Lebersversagen zu untersuchen. Dies wurde in einer in-vivo-Studie mit Unterstützung von histologischen, immunhistochemischen und molekularbiologischen Techniken durchgeführt.

Schlussfolgerungen:

1. Oxidativer Stress nimmt Einfluss auf die AGE-Akkumulation.
2. Neben der erhöhten AGE-Akkumulation kommt es zu einer erhöhten RAGE-Expression.
3. Die sRAGE-Expression ist in UCP2-defizienten Tieren vermindert.
4. UCP2-Defizienz erhöht die Vulnerabilität gegenüber inflammatorischen Stimuli, was auf den erhöhten oxidativen Stress zurückzuführen ist.
5. Die Gabe von rRAGE verbessert das Überleben des akuten Lebersversagens und stellt somit eine mögliche Therapieoption dar.
6. RAGE und sRAGE verhalten sich in Bezug auf ihre Expression reziprok.
7. Oxidativer Stress, AGE-Formation und RAGE-Expression sind während der Alterung erhöht, sRAGE, Glyoxalase-I-Aktivität und GSH/GSSG-Ratio dagegen vermindert. Allerdings scheint sich eine mitochondriale Dysfunktion im Alter nicht zu aggravieren, sondern wird durch den Alterungsprozess an sich relativiert.

4.4 Perspektiven

Seit Jahrzehnten ist bekannt, dass das eigentliche Risiko der Sepsis nicht die Invasion eines Mikroorganismus, sondern die inflammatorische Antwort ist (Thomas, 1972). Kann also der Grundsatz, primär die Ursache als die Symptome einer Erkrankung zu behandeln, bei der Sepsis so gelten?

In den letzten 40 Jahren wurde eine Vielzahl an Therapieansätzen vorgeschlagen und meist wieder verworfen. Häufig lag der Grund dafür in der mit Komplikationen verbundenen Übertragung vom Tiermodell auf den Menschen (Riedemann et al., 2003). Die Blockade von RAGE bietet eine vielversprechende Option. In verschiedenen Modellen konnte eine Reduktion der Inflammation durch rRAGE-Applikation erzielt werden. Der Vorteil von rRAGE gegenüber anderen antiinflammatorischen Mediatoren liegt in seiner Blockade eines Multiligandenrezeptors (Bopp et al., 2008a). Neben den in der vorliegenden Studie aufgezeigten AGE/RAGE-Interaktionen spielen viele RAGE-Liganden bei proinflammatorischen Prozessen eine Rolle. Durch RAGE-Blockade wird nicht nur die Bindung von AGEs, sondern auch die Bindung der anderen Liganden unterbunden. Außerdem beschränkt sich die Organprotektion nicht nur auf ein Organ, sondern auf alle Zellen, die den RAGE-Rezeptor exprimieren. Hieraus folgt, dass eine Komplikation der Sepsis, nämlich das gefürchtete Multiorganversagen, positiv beeinflusst werden könnte.

Verschiedene aktuelle Studien propagieren, dass zirkulierende sRAGE-Konzentrationen reziprok die zellmembrangebundene RAGE-Expression reflektieren. Auch die Ergebnisse der vorliegenden Studie sprechen dafür. Es wird diskutiert, ob sRAGE als Biomarker bei mit RAGE in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen fungieren könnte (Santilli et al., 2009). Dafür sprechen Studien wie z. B. eine kürzlich publizierte Studie von D'Adamo et al. anhand derer gezeigt werden konnte, dass übergewichtige präpubertäre Kinder mit Steatosis hepatis gegenüber der Kontrollgruppe erniedrigte sRAGE-Konzentrationen aufweisen (D'Adamo et al., 2010). Ein weitere Untersuchung demonstrierte, dass bei diabetischen Ratten die Behandlung mit Ramipril zu gesteigerten sRAGE-Konzentrationen und einer verminderten RAGE-Expression im Vergleich zu nicht-behandelten Tieren führt (Forbes et al., 2005). Katakami et al. bestimmten sRAGE im Serum von Typ-I-Diabetikern und fanden einen Zusammenhang zwischen erniedrigten sRAGE-Konzentrationen und der Progression von Atherosklerose der Carotiden (Katakami et al., 2009). Das Verhalten von sRAGE bei akuten inflammatorischen Prozessen konnte bis heute nicht eindeutig geklärt werden. Bopp et al.

verglichen sRAGE-Konzentrationen im Serum von Patienten mit Sepsis mit einer gesunden Kontrollgruppe und kamen zu dem Ergebnis, dass die sRAGE-Konzentrationen bei Sepsis ansteigen und dass das Ausmaß des Anstiegs mit dem Mortalitätsrisiko korreliert (Bopp et al., 2008b). Dagegen vertreten Kikkawa et al. die Meinung, dass sRAGE als Inhibitor von S100A12, einem weiteren RAGE-Liganden, bei Sepsis fungiert und somit protektiv wirkt. Sie verglichen Patienten, die aufgrund einer Perforation im unteren Gastrointestinaltrakt eine Sepsis entwickelt hatten, miteinander. Das Kriterium für die Einteilung in die Gruppen war die postoperative Entwicklung eines Acute Lung Injury (ALI). Die Patienten, die an einem ALI erkrankten, zeigten postoperativ signifikant erhöhte S100A12-Konzentrationen im Vergleich zu der anderen Gruppe auf. Bei der Gruppe, die kein ALI im Verlauf entwickelten, konnten dagegen am ersten postoperativen Tag signifikant höhere sRAGE-Konzentrationen nachgewiesen werden (Kikkawa et al., 2010).

Hier wird deutlich, dass die Rolle von sRAGE trotz intensiver Forschung noch immer Fragen offen lässt. Allerdings besteht kein Zweifel daran, dass RAGE und seine Liganden in die Pathogenese von diversen Erkrankungen eingreifen (Vazzana et al., 2009). Ziel für die Zukunft könnte sein, Normwerte für humanes sRAGE zu definieren, um sich seine Fähigkeit als Biomarker für den klinischen Alltag nützlich zu machen, sowie das Herausarbeiten von Indikationen für eine rRAGE-Therapie.

5 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Entwicklung der Altersstruktur.

Abb. 2: Aufbau eines Mitochondriums.

Abb. 3: Schematische Darstellung der AGE-Formation (Maillard-Reaktion).

Abb. 4: Isoformen von RAGE.

Abb. 5: Signalkaskade, welche durch RAGE-Aktivierung ausgelöst wird.

Abb. 6: Reaktionsgleichung von MDA mit NMPI.

Abb. 7: Zusammenspiel zwischen den Glyoxalasen und Glutathion.

Abb. 8: Ergebnisse der Glukosemessung im Blut von UCP2 $+/+$ ($n = 7$) und UCP2 $-/-$ Mäusen ($n = 7$) (A), sowie in juvenilen, adulten und seneszenten UCP2 $+/+$ ($n = 7$) und UCP2 $-/-$ Mäusen ($n = 7$) (B).

Abb. 9: Analyse der MDA-Konzentration bei UCP2 $+/+$ ($n = 7$) und UCP2 $-/-$ Mäusen ($n = 7$) (A), sowie im Vergleich bei juvenilen, adulten und seneszenten UCP2 $+/+$ ($n = 7$) und UCP2 $-/-$ Mäusen ($n = 7$) (C) und Analyse der GSH/GSSG Ratio bei UCP2 $+/+$ ($n = 7$) und UCP2 $-/-$ Mäusen ($n = 7$) (B), sowie im Vergleich bei juvenilen, adulten und seneszenten UCP2 $+/+$ ($n = 7$) und UCP2 $-/-$ Mäusen ($n = 7$) (D).

Abb. 10: Analyse der Glyoxalase-I-Aktivität bei UCP2 $+/+$ ($n = 7$) und UCP2 $-/-$ Mäusen ($n = 7$) (A) und bei juvenilen, adulten und seneszenten UCP2 $+/+$ ($n=7$) und UCP2 $-/-$ Mäusen ($n = 7$) (B).

Abb. 11: Plasmaaktivität von Aspartataminotransferase (A) und Alaninaminotransferase (B) in UCP2 +/+ (n = 7) und UCP2 -/- Mäusen (n = 7) nach Behandlung mit NaCl (sham), G/L und rRAGE + G/L.

Abb. 12: Repräsentative Western Blot und densitometrische Analyse von AGEs in Lebern von NaCl-behandelten UCP2 +/+ (n = 7) und UCP2 -/- Mäusen (n = 7) (A), von juvenilen, adulten und seneszenten UCP2 +/+ (n = 7) und UCP2 -/- Mäusen (n = 7) (B), sowie nach Behandlung mit NaCl (sham), G/L und G/L + rRAGE in UCP2 +/+ (n = 7) und UCP2 -/- Mäusen (n = 7) (C).

Abb. 13: Repräsentative Western Blot und densitometrische Analyse von RAGE in Lebern von NaCl-behandelten UCP2 +/+ (n = 7) und UCP2 -/- Mäusen (n = 7) (A), von juvenilen, adulten und seneszenten UCP2 +/+ (n = 7) und UCP2 -/- Mäusen (n = 7) (B) sowie nach Behandlung mit NaCl (sham), G/L und G/L + rRAGE in UCP2 +/+ (n = 7) und UCP2 -/- Mäusen (n = 7) (C).

Abb. 14: Repräsentative Western Blot Analyse der cleaved Caspase-3 nach Behandlung mit NaCl (sham), G/L und G/L + rRAGE in UCP2 +/+ (n = 7) und UCP2 -/- Mäusen (n = 7).

Abb. 15: Quantifizierung des nekrotischen Gewebes der Leber nach Behandlung mit NaCl (sham), G/L und sRAGE + G/L in UCP2 +/+ (n = 7) und UCP2 -/- Mäusen (n = 7) (A) und repräsentative histologische Bilder nach HE-Färbung. Behandlung mit NaCl (sham), G/L und rRAGE + G/L in UCP2 +/+ (n = 7) und UCP2 -/- Mäusen (n = 7) (B).

Abb. 16: Repräsentative Western Blot Analyse von sRAGE in Lebern von UCP2 +/+ (n = 7) und UCP2 -/- Mäusen (n = 7) (A) und quantitative Analyse von sRAGE (B) in Lebern von NaCl-behandelten UCP2 +/+ (n = 7) und UCP2 -/- Mäusen (n = 7) sowie quantitative Analyse von sRAGE (C) in Lebern von NaCl-behandelten juvenilen, adulten und seneszenten UCP2 +/+ (n=7) und UCP2 -/- Mäusen (n=7) mit dazugehörigen repräsentativen Immunhistologien (D).

Abb. 17: ELISA-Analyse von sRAGE in Lebergewebe von UCP2 +/+ (n = 7) und UCP2 -/- Mäusen (n = 7) (A), sowie nach Behandlung mit NaCl (sham), G/L und rRAGE + G/L in UCP2 +/+ und UCP2 -/- Mäusen (n = 7) (B).

Abb. 18: Überlebensrate von UCP2 +/+ (n = 10) (A) und UCP2 -/- Mäusen (n = 10) (B) nach Gal/LPS-Exposition mit und ohne prophylaktischer rRAGE-Applikation.

Abb. 19: Überlebensrate von juvenilen, adulten und seneszenten UCP2 +/+ Mäusen (n = 10) nach Gal/LPS-Exposition (A) und Gal/LPS-Exposition nach prophylaktischer Gabe von rRAGE (B).

Abb. 20: Überlebensrate von juvenilen, adulten und seneszenten UCP2 -/- Mäusen (n = 10) nach Gal/LPS-Exposition (A) und Gal/LPS-Exposition nach prophylaktischer Gabe von rRAGE (B).

Abb. 21: Zusammenfassung der Faktoren, die Einfluss auf die AGE/RAGE-Interaktion nehmen können.

6 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Volumina für das Erstellen einer Standardkurve.

Tab. 2: Verwendete primäre Antikörper für die Western Blot Analysen.

Tab. 3: Verwendete sekundäre Antikörper und Konjugate für die Western Blot Analysen.

Tab. 4: Verwendete primäre Antikörper für die Immunhistochemie.

7 HÄUFIG VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

3-DG	3-Desoxyglukoson
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AGE	Advanced Glycation Endproduct
ALI	Acute Lung Injury
ALAT	Alaninaminotransferase
APOLT	auxiliäre partielle orthope Lebertransplantation
ASAT	Aspartataminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
CASP	Colon Ascendens Stent Peritonitis
CLP	Cecal Ligation and Puncture
CML	N ^ε -[carboxymethyl]-Lysin
DIC	Dissemnierte intravasale Coagulation
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
Gal	Galaktosamin
GSH	Glutathion
HE	Hämatoxylin-Eosin
HMGB	High Mobility Group Box
ip.	intraperitoneal
iv.	intravenös
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IκBα	Inhibitorprotein von NFκB
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
LDL	Low Density Lipoprotein (Lipoprotein niederer Dichte)
LBP	LPS-Binding Protein
LPS	Lipopolysaccharid
MACP	Mitochondrial Anion Carrier Proteins

HÄUFIG VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

MARS	Molecular Adsorbent Recirculating System
MDA	Malondialdehyd
MGO	Methylglyoxal
MMDS	Microcirculatory and Mitochondrial Distress Syndrome
MODS	Multiple Organ Distress Syndrome
mRNA	messenger RNA
NfκB	Nuklear Factor kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PRR	Pattern Recognition Receptor
RAGE	Rezeptor für Advanced Glyaction Endproducts
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktive Sauerstoffspezies)
rRAGE	rekombinantes RAGE
SDS	Sodium Dodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SEM	Standard Error of the Means
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
sRAGE	soluble (löslicher) Rezeptor für Advanced Glycation Endproducts
TGF	Tissue Growth Factor (Gewebewachstumsfaktor)
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor alpha
UCP	Uncoupling Protein (entkoppelndes Protein)

8 LITERATUR

- Akai et al., 2007 Akai S, Hosomi H, Minami K, Tsuneyama K, Katho M, Nakajima M, Yokoi T. Knock-down of γ -Glutamylcysteine-Synthetase in rat causes acetaminophen-induced hepatotoxicity. *J Biol Chem.* 2007; 282:23996-24003.
- Alexander, 1995 Alexander RW. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis: oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. *Hypertension.* 1995; 25:155-161.
- Alexander & Rietschel, 2001 Alexander C, Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res.* 2001; 7:167-202.
- Andrews & Horvath, 2009 Andrews ZB, Horvath TL. Uncoupling protein-2 regulates lifespan in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009; 296:E621-E627.
- Anukarahanonta et al., 1973 Anukarahanonta T, Shinozuka H, Farber E. Inhibition of protein synthesis in rat liver by D-galactosamine. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1973; 5:481-491.
- Araujo et al., 1998 Araujo V, Arnal C, Boronat M, Ruiz E, and Domínguez C. Oxidant-antioxidant imbalance in blood of children with juvenile rheumatoid arthritis. *Biofactors.* 1998; 8:155-159.
- Arsenijevic et al., 2000 Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C, Raimbault S, Manning BS, Miroux B, Couplan E, Alves-Guerra MC, Gubern M, Surwit R. Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen production. *Nat Genet.* 2000; 26:435-439.
- Barazzoni & Nair, 2001 Barazzoni R, Nair KS. Changes in uncoupling protein-2 and -3 expression in aging rat skeletal muscle, liver, and heart. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001; 280:E413-419.
- Barnes & Karin, 1997 Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor- κ B - a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med.* 1997; 336:1066-1071.
- Baynes, 1991 Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes.* 1991; 40:405-412.
- Baynes & Thorpe, 1999 Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes.* 1999; 48:1-9.
- Beckman & Ames, 1998 Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.* 1998; 78:547-581.

- Belzer & Southard, 1988
Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation*. 1988; 45:673-676.
- Benda, 1898
Benda, C. Über die Spermatogense der Vertebraten und höherer Evertbraten, II, Theil: Die Histiogenese der Spermien. *Arch Anat Physiol*. 1898; 73:393-398.
- Berczi, 1998
Berczi I. Neurohormonal host defense in endotoxin shock. *Ann N Y Acad Sci*. 1998; 840:787-802.
- Bieger, 2001
Bieger WP. Oxidativer Stress und Alter: eine aktuelle Übersicht. *Der Urologe*. 2001; 41:344-350.
- Bierhaus et al., 1997
Bierhaus A, Chevion S, Chevion M, Hofmann M, Quehenberger P, Illmer T, Luther T, Berentshtein E, Tritschler H, Müller M, Wahl M, Ziegler R, Nawroth PP. Advanced glycation endproducts-induced activation of NF- κ B is suppressed by α -lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes*. 1997; 46:1481-1490.
- Bierhaus et al., 1998
Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc Res*. 1998; 37:586-600.
- Bierhaus et al., 2000
Bierhaus A, Chen J, Liliensiek B, Nawroth PP. LPS and cytokine-activated endothelium. *Semin Thromb Hemost*. 2000; 26:571-588.
- Bierhaus et al., 2005
Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, Stern DM, Nawroth PP. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med*. 2005; 83:876-886.
- Bilzer et al., 2006
Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int*. 2006; 26:1175-1186.
- Bohlinger et al., 1996
Bohlinger I, Leist M, Gantner F, Angermuller S, Tiegs G, Wendel A. DNA fragmentation in mouse organs during endotoxic shock. *Am J Pathol*. 1996; 149:1381-1393.
- Bopp et al., 2008a
Bopp C, Bierhaus A, Hofer S, Bouchon A, Nawroth PP, Martin E, Weigand MA. Bench-to-bedside review: The inflammation-perpetuating pattern-recognition receptor RAGE as a therapeutic target in sepsis. *Crit Care*. 2008; 12:1-8.
- Bopp et al., 2008b
Bopp C, Hofer S, Weitz J, Bierhaus A, Nawroth PP, Martin E, Büchler MW, Weigand MA. sRAGE is elevated in septic patients and associated with patients outcome. *J Surg Res*. 2008; 147:79-83.
- Boyd et al., 2008
Boyd JH, Kan B, Roberts H, Wang Y, Walley KR. S100A8 and S100A9 mediate endotoxin-induced cardiomyocyte dys-

- function via the receptor for advanced glycation end products. *Circ Res.* 2008; 102:1239-1246.
- Brouwers et al., 2011
Brouwers O, Niessen PM, Ferreira I, Miyata T, Scheffer PG, Teerlink T, Schrauwen P, Brownlee M, Stehouwer CD, Schalkwijk CG. Overexpression of glyoxalase-I reduces hyperglycemia-induced levels of advanced glycation end products and oxidative stress in diabetic rats. *J Biol Chem.* 2011; 286:1374-1380.
- Brownlee, 2001
Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001; 414:813-820.
- Bucala & Cerami, 1992
Bucala R, Cerami A. Advanced glycosylation: chemistry, biology and implications for diabetes and aging. *Adv Pharmacol.* 1992; 23:1-34.
- Bucciarelli et al., 2002
Bucciarelli LG, Wendt T, Rong L, Lalla E, Hofmann MA, Goova MT, Taguchi A, Yan SF, Yan SD, Stern DM, Schmidt AM. RAGE is a multiligand receptor of the immunoglobulin superfamily: implications for homeostasis and chronic disease. *Cell Mol Life Sci.* 2002; 59:1117-1128.
- Bundesinstitut für
Bevölkerungsforschung, 2008
Bundesinstitut für Bevölkerungsforschung in Zusammenarbeit mit dem Statistischen Bundesamt. BEVÖLKERUNG: Daten, Fakten, Trends zum demographischen Wandel in Deutschland. Wiesbaden, 2008. S.6.
- Busciglio & Yankner, 1995
Busciglio J, Yankner BA. Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons in vitro. *Nature.* 1995; 378:776-779.
- Chang et al., 2008
Chang JS, Wendt T, Qu W, Kong L, Zou YS, Schmidt AM, Yan SF. Oxygen deprivation triggers upregulation of early growth response-1 by the receptor for advanced glycation end products. *Circ Res.* 2008; 102:905-913.
- Chapman et al., 2002
Chapman MR, Robinson LS, Pinkner JS, Roth R, Heuser J, Hammar M, Normark S, Hultgren SJ. Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science.* 2002; 295:851-855.
- Chappey et al., 1997
Chappey O, Dosquet C, Wautier MP, Wautier JL. Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions. *Eur J Clin Invest.* 1997; 27:97-108.
- Chavakis et al., 2003
Chavakis T, Bierhaus A, Al-Fakhri N, Schneider D, Linn T, Nagashima M, Morser J, Arnold B, Preissner KT, Nawroth PP. The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leucocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *J Exp Med.* 2003; 198:1507-1515.
- Chiarelli et al., 1999
Chiarelli F, de Martino M, Mezzetti A, Catino M, Morgese G, Cuccurullo F, Verrotti A. Advanced glycation end products in

- children and adolescents with diabetes: relation to glycemic control and early microvascular complications. *J Pediatr.* 1999; 134:486-491.
- Czaja et al., 1994
Czaja MJ, Xu J, Ju Y, Alt E, Schmiedeberg P. Lipopolysaccharide-neutralizing antibody reduces hepatocyte injury from acute hepatotoxin administration. *Hepatology.* 1994; 19:1282-1289.
- D'Adamo et al., 2011
D'Adamo E, Giannini C, Chiavaroli V, de Giorgis T, Verrotti A, Chiarelli F, Mohn A. What is the significance of soluble and endogenous secretory receptor for advanced glycation end products in liver steatosis in obese prepubertal children? *Antioxid Redox Signal.* 2011; 14:1167-1172.
- Dahn et al., 1990
Dahn MS, Wilson RF, Lange MP, Stone A, Jacobs LA. Hepatic parenchymal oxygen tension following injury and sepsis. *Arch Surg.* 1990; 125:441-443.
- Dahn et al., 1995
Dahn MS, Mitchell RA, Lange MP, Smith S, Jacobs LA. Hepatic metabolic response to injury and sepsis. *Surgery.* 1995; 117:520-530.
- Dalton et al., 2004
Dalton TP, Chen Y, Schneider SN, Nebert DW, Shertzer HG. Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis in health and disease. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37:1511-1526.
- Decker & Keppler, 1974
Decker K, Keppler D. Galactosamine hepatitis: key role of nucleotide deficiency period in the pathogenesis of cell injury and cell death. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1974; 71:77-106.
- Desai et al., 2010
Desai KM, Chang T, Wang H, Banigesh A, Dhar A, Liu J, Untereiner A, Wu L. Oxidative stress and aging: is methylglyoxal the hidden enemy? *Can J Physiol Pharmacol.* 2010; 88:273-284.
- Dreher & Junod, 1996
Dreher D, Junod AF. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer.* 1996; 32:30-38.
- Dröge, 2002
Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002; 82:47-95.
- Du et al., 2003
Du X, Matsumura T, Edelstein D, Rossetti L, Zsengeller Z, Szabo C, Brownlee M. Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *J Clin Invest.* 2003; 112:1049-1057.
- Du et al., 2010
Du WB, Pan XP, Li LJ. Prognostic models for acute liver failure. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2010; 9:122-128.
- Dyer et al., 1993
Dyer DG, Dunn JA, Thorpe SR, Bailie KE, Lyons TJ, McCance DR, Baynes JW. Accumulation of Maillard reaction

- products in skin collagen in diabetes and aging. *J Clin Invest.* 1993; 91:2463-2469.
- Eipel et al., 2004
Eipel C, Bordel R, Nickels RM, Menger MD, Vollmar B. Impact of leucocytes and platelets in mediating hepatocyte apoptosis in a rat model of endotoxemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004; 286:G769-776.
- Eipel et al., 2007
Eipel C, Kidess E, Abshagen K, LeMinh K, Menger MD, Burkhardt H, Vollmar B. Antileukoproteinase protects against hepatic inflammation, but not apoptosis in the response of D-galactosamine-sensitized mice to lipopolysaccharide. *Br J Pharmacol.* 2007; 15:406-413.
- Ekong et al., 2006
Ekong U, Zeng S, Dun H, Feirt N, Guo J, Ippagunta N, Guarrera JV, Lu Y, Weinberg A, Qu W, Ramasamy R, Schmidt AM, Emond JC. Blockade of the receptor for advanced glycation end products attenuates acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006; 21:682-688.
- Emanuele et al., 2005
Emanuele E, D'Angelo A, Tomaino C, Binetti G, Ghidoni R, Politi P, Bernardi L, Maletta R, Bruni AC, Geroldi D. Circulating levels of soluble receptor for advanced glycation end products in Alzheimer disease and vascular dementia. *Arch Neurol.* 2005; 62:1734-1736.
- Esmon, 2004
Esmon CT. Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? *Crit Care Med.* 2004; 32:S219-222.
- Evans et al., 2008
Evans ZP, Ellett JD, Schmidt MG, Schnellmann RG, Chavin KD. Mitochondrial uncoupling protein-2 mediates steatotic liver injury following ischemia/reperfusion. *J Biol Chem.* 2008; 283:8573-8579.
- Farber, 1971
Farber E. Response of cells to inhibition of synthesis of DNA, RNA and protein. *Biochem Pharmacol.* 1971; 20:1023-1026.
- Faurschou & Borregaard, 2003
Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* 2003; 5:1317-1327.
- Fleury et al., 1997
Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwit RS, Ricquier D, Warden CH. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet.* 1997; 15:269-272.
- Forbes et al., 2005
Forbes JM, Thorpe SR, Thallas-Bonke V, Pete J, Thomas MC, Deemer ER, Bassal S, El-Osta A, Long DM, Panagiotopoulos S, Jerums G, Osicka TM, Cooper ME. Modulation of soluble receptor for advanced glycation end products by angiotensin-converting enzyme-1 inhibition in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16:2363-2372.

- Forman et al., 2009 Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med.* 2009; 30:1-12.
- Francavilla et al., 1989 Francavilla A, Makowka L, Polimeno L, Barone M, Demetris J, Prelich J, Van Thiel DH, Starzl TE. A dog model for acetaminophen-induced fulminant hepatic failure. *Gastroenterology.* 1989; 96:470-478.
- Fukami et al., 2004 Fukami K, Ueda S, Yamagishi S, Kato S, Inagaki Y, Takeuchi M, Motomiya Y, Bucala R, Iida S, Tamaki K, Imaizumi T, Cooper ME, Okuda S. AGEs activate mesangial TGF- β -Smad signaling via an angiotensin II type I receptor interaction. *Kidney Int.* 2004; 66:2137-2147.
- Giacco & Brownlee, 2010 Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res.* 2010; 107:1058-1070.
- Gong et al., 2010 Gong Q, Zhang H, Li JH, Duan LH, Zhong S, Kong XL, Zheng F, Tan Z, Xiong P, Chen G, Fang M, Gong FL. High-mobility group box 1 exacerbates concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *J Mol Med.* 2010; 88:1289-1298.
- Gregus et al., 1988 Gregus Z, Madhu C, Klaassen CD. Species variation in toxication and detoxication of acetaminophen in vivo: a comparative study of biliary and urinary excretion of acetaminophen metabolites. *J Pharmacol Exp Ther.* 1988; 244:91-99.
- Grün et al., 1976 Grün M, Liehr H, Rasenack U. Significance of endotoxemia in experimental "galactosamine-hepatitis" in the rat. *Acta Hepatogastroenterol.* 1976; 23:64-81.
- Han, 2002 Han DW. Intestinal endotoxemia as a pathogenetic mechanism in liver failure. *World J Gastroenterol.* 2002; 8:961-965.
- Harman, 1956 Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956. 11:298-300.
- Hase et al., 1999 Hase K, Xiong Q, Basnet P, Namba T, Kadota S. Inhibitory effect of tetrahydroswertianolin on tumor necrosis factor- α -dependent hepatic apoptosis in mice. *Biochem Pharmacol.* 1999; 57:1431-1437.
- He et al., 2003 He Y, Zhou J, Dou KF, Chen Y. A rat model for acute hepatic failure. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2003; 2:423-425.
- Henle, 1841 Henle, J. 1841. Allgemeine Anatomie. Leipzig.
- Herold, 2007 Herold, G. Innere Medizin. Gerd Herold Köln. 2007; 505-506.

- Ho et al., 1996
Ho JS, Buchweitz JP, Roth RA, Ganey PE. Identification of factors from rat neutrophils responsible for cytotoxicity to isolated hepatocytes. *J Leukoc Biol.* 1996; 59:716-724.
- Hofmann et al., 1999
Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Slattery T, Beach D, McClary J, Nagashima M, Morser J, Bierhaus A, Neurath M, Nawroth P, Stern D, Schmidt AM. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: the cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell.* 1999; 97:889-901.
- Hoppichler, 2002
Hoppichler F. Die Bedeutung der postprandialen Hyperglykämie als kardiovaskulärer Risikofaktor. *J Kardiologie.* 2002; 9:545-547.
- Hori et al., 1995
Hori O, Brett J, Slattery T, Cao R, Zhang J, Chen JX, Nagashima M, Lundh ER, Vijay S, Nitecki D, Morser J, Stern D, Schmidt AM. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphotericin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of RAGE and amphotericin in the developing nervous system. *J Biol Chem.* 1995; 270:25752-25761.
- Horimoto et al., 2004
Horimoto M, Fülöp P, Derdák Z, Wands JR, Baffy G. Uncoupling protein-2 deficiency promotes oxidant stress and delays liver regeneration in mice. *Hepatology.* 2004; 39:386-392.
- Huang et al., 2001
Huang JS, Guh JY, Chen HC, Hung WC, Lai YH, Chuang LY. Role of receptor for advanced glycation end-product (RAGE) and the JAK/STAT-signaling pathway in AGE-induced collagen production in NRK-49F cells. *J Cell Biochem.* 2001; 81:102-113.
- Huebschmann et al., 2006
Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JE. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care.* 2006; 29:1420-1432.
- Hudson et al., 2003
Hudson BI, Bucciarelli LG, Wendt T, Sakaguchi T, Lalla E, Qu W, Lu Y, Lee L, Stern DM, Naka Y, Rasasamy R, Yan SD, D'Agati V, Schmidt AM. Blockade of receptor for advanced glycation endproducts: a new target for therapeutic intervention in diabetic complications and inflammatory disorders. *Arch Biochem Biophys.* 2003; 419:80-88.
- Hudson et al., 2008
Hudson BI, Carter AM, Harja E, Kalea AZ, Arriero M, Yang H, Grant PJ, Schmidt AM. Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants. *FASEB J.* 2008; 22:1572-1580.
- Ince, 2005
Ince, C. The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care.* 2005; 9:S13-S19.

- Ishihara et al., 2003
Ishihara K, Tsutsumi K, Kawane S, Nakajima M, Kasaoka T. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) directly binds to ERK by a D-domain-like docking site. *FEBS Lett.* 2003; 550:107-113.
- Ito et al., 2007
Ito Y, Sørensen KK, Bethea NW, Svistounov D, McCuskey MK, Smedsørd BH, McCuskey RS. Age-related changes in the hepatic microcirculation in mice. *Exp Gerontol.* 2007; 42:789-797.
- Jaeck et al., 2002
Jaeck D, Boudjema K, Audet M, Chenard-Neu MP, Simeoni U, Meyer C, Nakano H, Wolf P. Auxiliary partial orthotopic liver transplantation (APOLT) in the treatment of acute liver failure. *J Gastroenterol.* 2002; 37:88-91.
- Jaeschke et al., 2002
Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol Sci.* 2002; 65:166-176.
- Jaeschke & Lemasters, 2003
Jaeschke H, Lemasters JJ. Apoptotic versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology.* 2003; 125:1246-1257.
- Jamour, 2008
Jamour M. Medizin des Alterns und des alten Menschen. GK2 Querschnittsbereiche. Herausgeber: Schaps KP, Kessler O, Fetzner U. Springer Berlin Heidelberg, 2008. S. 158-159.
- Jarmuszkiewicz et al., 1999
Jarmuszkiewicz W, Sluse-Goffart CM, Hryniewiecka L, Sluse FE. Identification and characterization of a protozoan uncoupling protein in *Acanthamoeba castellanii*. *J Biol Chem.* 1999; 274:23198-23202.
- Jezek & Garlid, 1998
Jezek P, Garlid KD. Mammalian mitochondrial uncoupling proteins. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998; 30:1163-1168.
- John & Lamb, 1993
John WG, Lamb EJ. The Maillard or browning reaction in diabetes. *Eye (Lond.)* 1993; 7:230-237.
- Kamiike et al., 1989
Kamiike W, Fujikawa M, Koseki M, Sumimura J, Miyata M, Kawashima Y, Wada H, Tagawa K. Different patterns of leakage of cytosolic and mitochondrial enzymes. *Clin Chim Acta.* 1989; 185:265-70.
- Kapral et al., 2005
Kapral C, Binder M, Buder R, Csillag C, Firlinger F, Gegenhuber A, Lenz K, Wewalka F, Überall B. Leberversagen bei Sepsis und Multiorganversagen. *Journal für Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen* 2005; 3:7-12.
- Katakami et al., 2009
Katakami N, Matsuhisa M, Kaneto H, Matsuoka TA, Sakamoto K, Yasuda T, Umayahara Y, Kosugi K, Yamasaki Y. Serum endogenous secretory RAGE level is an indepen-

- dent risk factor for the progression of carotid atherosclerosis in type 1 diabetes. *Atherosclerosis*. 2009; 204:288-292.
- Kepler et al., 1968
Kepler D, Lesch R, Reutter W, Decker K. Experimental hepatitis induced by D-galactosamine. *Exp Mol Pathol*. 1968; 9:279-290.
- Kerr et al., 1979
Kerr JF, Cooksley WG, Searle J, Halliday JW, Holder L, Roberts I, Burnett W, Powell LW. The nature of piecemeal necrosis in chronic active hepatitis. *Lancet*. 1979; 2:827-828.
- Kikkawa et al., 2010
Kikkawa T, Sato N, Kojika M, Takahashi G, Aoki K, Hoshikawa K, Akitomi S, Shozushima T, Suzuki K, Wakabayashi G, Endo S. Significance of measuring S100A12 and sRAGE in the serum of sepsis patients with postoperative acute lung injury. *Dig Surg*. 2010; 27:307-312.
- Kingsbury, 1912
Kingsbury BF. Cytoplasmic fixation. *Anat Rec*. 1912; 6:39-52.
- Kondo et al., 2009
Kondo T, Hirose M, Kageyama K. Roles of oxidative stress and redox regulation in atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2009; 16:532-538.
- Kuhla et al., 2008
Kuhla A, Eipel C, Siebert N, Abshagen K, Menger MD, Vollmar B. Hepatocellular apoptosis is mediated by TNF α -dependent Fas/FasLigand cytotoxicity in a murine model of acute liver failure. *Apoptosis*. 2008; 13:1427-1438.
- Lander et al., 1997
Lander HM, Tauras JM, Ogiste JS, Hori O, Moss RA, Schmidt AM. Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21^{ras}-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. *J Biol Chem*. 1997; 272:17810-17814.
- Lawson et al., 2000
Lawson JA, Farhood A, Hopper RD, Bajt ML, Jaeschke H. The hepatic inflammatory response after acetaminophen overdose: role of neutrophils. *Toxicol Sci*. 2000; 54:509-516.
- Ledesma et al., 2002
Ledesma A, de Lacoba MG, Rial E. The mitochondrial uncoupling proteins. *Genome Biol*. 2002; 3: REVIEWS3015.
- Lee & Cerami, 1992
Lee AT, Cerami A. Role of glycation in aging. *Ann NY Acad Sci*. 1992; 663:63-70.
- Lee, 2008
Lee WM. Etiologies of acute liver failure. *Semin Liver Dis*. 2008; 28:142-152.
- Lehmann et al., 1987
Lehmann V, Freudenberg MA, Galanos C. Lethal toxicity of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor in normal and D-galactosamine-treated mice. *J Exp Med*. 1987; 165:657-663.
- Leist et al., 1995
Leist M, Gantner F, Bohlinger I, Tiegs G, Germann PG, Wendel A. Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apop-

- tosis precedes liver failure in experimental murine shock models. *Am J Pathol.* 1995; 146:1220-1234.
- Le Minh, 2009
Le Minh K, Kuhla A, Abshagen K, Minor T, Stegemann J, Ibrahim S, Eipel C, Vollmar B. Uncoupling protein-2 deficiency provides protection in a murine model of endotoxemic acute liver failure. *Crit Care Med.* 2009; 37:215-222.
- Lo, 2008
Lo CM. Liver transplantation for acute liver failure: Not too early but never too late. *Liver Transpl.* 2008; 14:1243-1244.
- Mahajan et al., 2009
Mahajan N, Malik N, Bahl A, Dhawan V. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) and its inflammatory ligand EN-RAGE in non-diabetic subjects with pre-mature coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2009; 207:597-602.
- Majno & Joris, 1995
Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 1995; 146:3-15.
- Makino et al., 2005
Makino H, Togo S, Kubota T, Morioka D, Morita T, Kobayashi T, Tanaka K, Shimizu T, Matsuo K, Nagashima Y, Shimada H. A good model of hepatic failure after excessive hepatectomy in mice. *J Surg Res.* 2005; 127:171-176.
- Makita et al., 1991
Makita Z, Radoff S, Rayfield EJ, Yang Z, Skolnik E, Delaney V, Friedman EA, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. *N Eng J Med.* 1991; 325:836-842.
- Marenholz et al., 2004
Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 322:1111-1122.
- McCance et al., 1993
McCance DR, Dyer DG, Dunn JA, Bailie KE, Thorpe SR, Baynes JW, Lyons TJ. Maillard reaction products and their relation to complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1993; 91:2470-2478.
- Medzhitov, 2001
Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2001; 1:135-145.
- Mihás et al., 1990
Mihás AA, Ceballos R, Mihás TA, Hirschowitz BI. Modification of the hepatotoxicity of D-galactosamine in the rat by an anti-endotoxin. *J Med.* 1990; 21:301-311.
- Miller et al., 1976
Miller DJ, Hickman R, Fratter R, Terblanche J, Saunders SJ. An animal model of fulminant hepatic failure: a feasibility study. *Gastroenterology.* 1976; 71:109-113.
- Miquel et al., 1980
Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JE Jr. Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol.* 1980; 15:575-591.

- Mitchell, 1961
Mitchell, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*. 1961; 191:144-148.
- Miyata et al., 1996
Miyata T, Ueda Y, Shinzato T, Iida Y, Tanaka S, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C, Maeda K. Accumulation of albumin – linked and free-form pentosidine in the circulation of uremic patients with end-stage renal failure: renal implications in the pathophysiology of pentosidine. *J Am Soc Nephrol*. 1996; 7:1198-1206.
- Miyata et al., 1997
Miyata T, Maeda K, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C. Oxidation conspires with glycation to generate noxious advanced glycation end products in renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 1997; 12:255-258.
- Miyazawa et al., 2010
Miyazawa T, Nakagawa K, Shimasaki S, Nagai R. Lipid glycation and protein glycation in diabetes and atherosclerosis. *Amino Acids*. 2010; [Epub ahead of print]
- Monnier et al., 1996
Monnier VM, Glomb M, Elgawish A, Sell DR. The mechanism of collagen cross-linking in diabetes: a puzzle nearing resolution. *Diabetes*. 1996; 45:S67-72.
- Mousa, 2004
Mousa, SA. Expression of adhesion molecules during cadmium hepatotoxicity. *Life sci*. 2004; 75:93-105.
- Nabben & Hoeks, 2008
Nabben M, Hoeks J. Mitochondrial uncoupling protein 3 and its role in cardiac- and skeletal muscle metabolism. *Physiol Behav*. 2008; 94:259-269.
- Nakamura et al., 2003
Nakamura A, Mori Y, Hagiwara K, Suzuki T, Sakakibara T, Kikuchi T, Igarashi T, Ebina M, Abe T, Miyazaki J, Takai T, Nukiwa T. Increased susceptibility to LPS-induced endotoxin shock in secretory leukoprotease inhibitor (SLPI)-deficient mice. *J Exp Med*. 2003; 197:669-674.
- Nass & Nass, 1963
Nass S, Nass MM. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. II. Enzymatic and other hydrolytic treatments. *J Cell Biol*. 1963; 19:613-629.
- Neeper at al., 1992
Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pa YC, Elliston K, Stern D, Shaw A. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem*. 1992; 267:14998-15004.
- Newsome et al., 2000
Newsome PN, Plevris JN, Nelson LJ, Hayes PC. Animal models of fulminant hepatic failure: a critical evaluation. *Liver Transpl*. 2000; 6:21-31.
- Nicholl & Bucala, 1998
Nicholl ID, Bucala R. Advanced glycation endproducts and cigarette smoking. *Cell Mol Biol*. 1998; 44:1025-1033.

- Nieminen et al., 1997
Nieminen AI, Byrne AM, Herman B, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in hepatocytes induced by t-BuOOH: NAD(P)H and reactive oxygen species. *Am J Physiol Cell.* 1997; 272:C1286-1294.
- Nomellini et al., 2009
Nomellini V, Gomez CR, Gamelli RL, Kovacs EJ. Aging and animal models of systemic insult: trauma, burn, and sepsis. *Shock.* 2009; 31:11-20.
- O'Brien & Morrissey, 1989
O'Brien J, Morrissey PA. Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1989; 28:211-248.
- O'Grady, 2005
O'Grady JG. Acute liver failure. *Postgrad Med J.* 2005; 81: 148-154.
- Okado et al., 1996
Okado A, Kawasaki Y, Hasuike Y, Takahashi M, Teshima T, Fujii J, Taniguchi N. Induction of apoptotic cell death by methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in macrophage-derived cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 225:219-224.
- Ostapowicz et al., 2002
Ostapowicz G, Fontana RJ, Schiødt FV, Larson A, Davern TJ, Han SH, McCashland TM, Shakil AO, Hay JE, Hynan L, Crippin JS, Blei AT, Samuel G, Reisch J, Lee WM. Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann Intern Med.* 2002; 137:947-954.
- Ott et al., 2007
Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis.* 2007; 12:913-922.
- Pannen, 2002
Pannen BH. New insights into the regulation of hepatic blood flow after ischemia and reperfusion. *Anesth Analg.* 2002; 94:1448-1457.
- Paul & Bailey, 1999
Paul RG, Bailey AJ. The effect of advanced glycation end-product formation upon cell-matrix interaction. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999; 31:653-660.
- Pirovino et al., 1989
Pirovino M, Meister F, Rubli E, Karlaganis G. Preserved cytosolic and synthetic liver function in jaundice of severe extrahepatic infection. *Gastroenterology.* 1989; 96:1589-1595.
- Poeze et al., 2002
Poeze M, Ramsay G, Buurman WA, Greve JW, Dentener M, Takala J. Increased hepatosplanchnic inflammation precedes the development of organ dysfunction after elective high-risk surgery. *Shock.* 2002; 17:451-458.
- Rafael et al., 1968
Rafael J, Klaas D, Hohorst HJ. Mitochondria from brown fat: enzymes and respiratory chain phosphorylation during the pre- and postnatal development of the interscapular fat body of the guinea pig. *Hoppe Seylers Z Physiol. Chem.* 1968. 349:1711-1724.

- Raha & Robinson, 2000 Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci.* 2000; 25:502-508.
- Rahman et al., 2002 Rahman TM, Selden AC, Hodgson HJ. A novel model of acetaminophen-induced acute hepatic failure in rabbits. *J Surg Res.* 2002; 106:264-272.
- Raj et al., 2000 Raj DS, Choudhury D, Welbourne TC, Levi M. Advanced glycation end products: a Nephrologist's perspective. *Am J Kidney Dis.* 2000; 35:365-380.
- Ramasamy et al., 2009 Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. RAGE: therapeutic target and biomarker of the inflammatory response – the evidence mounts. *J Leukoc Biol.* 2009; 86:505-512.
- Ramasamy et al., 2010 Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. Advanced glycation endproducts: from precursors to RAGE: round and round we go. *Amino Acids.* 2010; [Epub ahead of print]
- Rauci et al., 2008 Raucic A, Cugusi S, Antonelli A, Barabino SM, Monti L, Bierhaus A, Reiss K, Saftig P, Bianchi ME. A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *FASEB J.* 2008; 22:3716-3727.
- Reddy et al., 2009 Reddy VP, Zhu X, Perry G, Smith MA. Oxidative stress in diabetes and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2009; 16:763-774.
- Redl et al., 1993 Redl H, Bahrami S, Schlag G, Traber DL. Clinical detection of LPS and animal models of endotoxemia. *Immunobiology.* 1993; 187:330-345.
- Reinhart et al., 2006 Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone HG, Gerlach H, Gründling M, Kreymann G, Kujath P, Marggraf G, Mayer K, Meier-Hellmann A, Peckelsen C, Putensen C, Stüber F, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Weiler N, Welte T, Werdan K. Diagnose und Therapie der Sepsis. *Intensivmed.* 2006; 43:464–475.
- Remick et al., 2000 Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock.* 2000; 13:110-116.
- Remick & Ward, 2005 Remick DG, Ward PA. Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis. *Shock.* 2005; 24:7-11.
- Riedemann et al., 2003 Riedemann NC, Guo RF, Ward Pa. The enigma of sepsis. *J Clin Invest.* 2003; 112:460-467.

- Rittirsch et al., 2007
Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukoc Biol.* 2007; 81:137-143.
- Roberts et al., 2010
Roberts RA, Smith RA, Safe S, Szabo C, Tjalkens RB, Robertson FM. Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species. *Toxicology.* 2010; 276:85-94.
- Rösen & Du, 2000
Rösen P, Du XL. Oxidative stress in diabetes: why does hyperglycemia induce the formation reactive oxygen species? In: Packer L, Rösen P, Tritschler HJ, King GL, Azzi A (eds). *Antioxidants in Diabetes Management.* Marcel Dekker, New York, 2000; 17-32.
- Rolando et al., 2000
Rolando N, Wade J, Davalos M, Wendon J, Philpott-Howard J, Willimas R. The systemic inflammatory response syndrome in acute liver failure. *Hepatology.* 2000; 32:734-739.
- Rothe et al., 1993
Rothe J, Lesslauer W, Lötscher H, Lang Y, Koebel P, Köntgen F, Althage A, Zinkernagel R, Steinmetz M, Bluethmann H. Mice lacking the tumor necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature.* 1993; 364:798-802.
- Rousset et al., 2004
Rousset S, Alves-Guerra MC, Mozo J, Miroux B, Cassard-Doulcier AM, Bouillaud F, Ricquier D. The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes.* 2004; 53:S130-135.
- Rudich et al., 1997
Rudich A, Kozlovsky N, Potashnik R, Bashan N. Oxidant stress reduces insulin responsiveness in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol.* 1997; 272:E935-940.
- Rudich et al., 1998
Rudich A, Tirosh M, Khamaisi D, Pessler R, Potashnik R, Bashan N. Putative role for oxidative stress in adipocyte and skeletal muscle insulin resistance. *Diabetologia.* 1998; 41:A34.
- Saier, 2000
Saier MH Jr. Vectorial metabolism and the evolution of transport systems. *J Bacteriol.* 2000; 182:5029-5035.
- Sakai et al., 1992
Sakai H, Park SS, Kikkawa Y. Differential oxidase activity of hepatic and pulmonary microsomal cytochrome P-450 isozymes after treatment with cytochrome P-450 inducers. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; 187:1262-1269.
- Sano et al., 1998
Sano H, Higashi T, Matsumoto K, Melkko J, Jinnouchi Y, Ikeda K, Ebina Y, Makino H, Smedsrod B, Horiuchi S. Insulin enhances macrophage scavenger receptor-mediated endocytic uptake of advanced glycation end products. *J Biol Chem.* 1998; 273:8630-8637.

- Santilli et al., 2009 Santilli F, Vazzana N, Bucciarelli LG, Davi G. Soluble forms of RAGE in human diseases: clinical and therapeutic implications. *Curr Med Chem.* 2009; 16:940-952.
- Sasaki et al., 2002 Sasaki N, Takeuchi M, Chowei H, Kikuchi S, Hayashi Y, Nakano N, Ikeda H, Yamagishi S, Kitamoto T, Saito T, Makita Z. Advanced glycation end products (AGE) and their receptor (RAGE) in the brain of patients with Creutzfeldt-Jakob disease with prion plaques. *Neurosci Lett.* 2002; 326:117-120.
- Sastre et al., 1996 Sastre J, Pallardó FV, Plá R, Pellín A, Juan G, O'Connor JE, Estrela JM, Miquel J, Viña J. Aging of the liver: age-associated mitochondrial damage in intact hepatocytes. *Hepatology.* 1996; 24:1199-1205.
- Schmidt et al., 1992 Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Brett J, Ryan J, Kao J, Esposito C, Hegarty H, Hurley W, Clauss M, Wang F, Pan YE, Tsang C, Stern D. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial surface. *J Biol Chem.* 1992; 267:14987-14997.
- Schmidt et al., 1993 Schmidt AM, Yan SD, Brett J, Mora R, Nowygrod R, Stern D. Regulation of human mononuclear phagocyte migration by cell surface-binding proteins for advanced glycation end products. *J Clin Invest.* 1993; 91:2155-2168.
- Schmidt et al., 1994 Schmidt AM, Mora R, Cao R, Yan SD, Brett J, Ramakrishnan R, Tsang TC, Simionescu M, Stern D. The endothelial cell binding site for advanced glycation end products consists of a complex: an integral membrane protein and a lactoferrin-like polypeptide. *J Biol Chem.* 1994; 269:9882-9888.
- Schmidt et al., 2001 Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest.* 2001; 108:949-955.
- Schmidt & Larsen, 2006 Schmidt LE, Larsen FS. Prognostic implications of hyperlactatemia, multiple organ failure, and systemic inflammatory response syndrome in patients with acetaminophen-induced acute liver failure. *Crit Care Med.* 2006; 34:337-343.
- Searle et al., 1987 Searle J, Harmon BV, Bishop CJ, Kerr JFR. The significance of cell death by apoptosis in hepatobiliary disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 1987; 2:77-96.
- Sebeková et al., 2002 Sebeková K, Kupcová V, Schinzel R, Heidland A. Markedly elevated levels of plasma advanced glycation end products in patients with liver cirrhosis - amelioration by liver transplantation. *J Hepatol.* 2002; 36:66-71.

- Sell & Monnier, 1990
Sell DR, Monnier VM. End-stage renal disease and diabetes catalyze the formation of a pentose-derived crosslink from aging human collagen. *J Clin Invest.* 1990; 85:380-384.
- Shah & Kamath, 2003
Shah V, Kamath PS. Nitric oxide in liver transplantation: pathobiology and clinical implications. *Liver Transpl.* 2003; 9:1-11.
- Shiratori et al., 1990
Shiratori Y, Tanaka M, Hai K, Kawase T, Shirna S, Sugimoto T. Role of endotoxin-responsive macrophages in hepatic injury. *Hepatology.* 1990; 11:183-192.
- Skovsted et al., 1998
Skovsted IC, Christensen M, Breinholt J, Mortensen SB. Characterisation of a novel AGE-compound derived from lysine and 3-deoxyglucosone. *Cell Mol Biol.* 1998; 44:1159-1163.
- Slater, 1953
Slater EC. Mechanism of phosphorylation in the respiratory chain. *Nature.* 1953; 172:975-978.
- Smedsrød, 1997
Smedsrød B, Melkko J, Araki N, Sano H, Horiuchi S. Advanced glycation end products are eliminated by scavenger-receptor-mediated endocytosis of hepatic sinusoidal Kupffer cells and endothelial cells. *Biochem J.* 1997; 322:567-573.
- Sorci et al., 2004
Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Giambanco I, Donato R. Amphoterin stimulates myogenesis and counteracts the anti-myogenic factors basic fibroblast growth factor and S100B via RAGE binding. *Mol Cell Biol.* 2004; 24:4880-4894.
- Spronk et al., 2004
Spronk PE, Zandstra DF, Ince C. Bench-to-bedside review: sepsis is a disease of the microcirculation. *Crit Care.* 2004; 8:462-468.
- Strom et al., 1997
Strom SC, Fisher RA, Thompson MT, Sanyal AJ, Cole, PE, Ham JM, Posner MP. Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure. *Transplantation.* 1997; 63:559-569.
- Sugaya et al., 1994
Sugaya K, Fukagawa T, Matsumoto K, Mita K, Takahashi E, Ando A, Inoko H, Ikemura T. Three genes in the human MHC class III region near the junction with the class II: gene for receptor for advanced glycosylation end products; PBX2 homeobox gene and a notch homolog, human counterpart of mouse mammary tumor gene int-3. *Genomics.* 1994; 23:408-419.
- Taguchi et al., 2000
Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W, Tanji N, Lu Y, Lalla E, Fu C, Hofmann MA, Kislinger T, Ingram M, Lu A, Tanaka H, Hori O, Ogawa S, Stern DM, Schmidt AM. Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature.* 2000; 405:354-360.

- Tanaka et al., 2000
Tanaka N, Yonekura H, Yamagishi S, Fujimori H, Yamamoto Y, Yamamoto H. The receptor for advanced glycation end products is induced by the glycation products themselves and tumor necrosis factor- α through nuclear factor- κ B, and by 17 β -Estradiol through Sp-1 in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 2000; 275:25781-25790.
- Terblanche & Hickman, 1991
Terblanche J, Hickman R. Animal models of fulminant hepatic failure. *Dig Dis Sci.* 1991; 36:770-774.
- Tessier, 2010
Tessier FJ. The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation. *Pathol Biol.* 2010; 58:214-219.
- Thomas, 1972
Thomas L. Germs. *N Engl J Med.* 1972; 287:553-555.
- Thornalley et al., 1995
Thornalley PJ, Westwood M, Lo TW, McLellan AC. Formation of methylglyoxal-modified proteins in vitro and in vivo and their involvement in AGE-related processes. *Contrib Nephrol.* 1995; 112:24-31.
- Thornalley, 1996
Thornalley PJ. Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification – a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen Pharmacol.* 1996; 27:565-573.
- Thornalley, 1998a
Thornalley PJ. Glutathione-dependent detoxification of alpha-oxoaldehydes by the glyoxalase system: involvement in disease mechanisms and antiproliferative activity of glyoxalase I inhibitors. *Chem Biol Interact.* 1998; 111:137-151.
- Thornalley 1998b
Thornalley PJ. Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs. *Cell Mol Biol.* 1998; 44:1013-1023.
- Thornalley, 2003
Thornalley PJ. Glyoxalase I-structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31:1343-1348.
- Tivig & Hetze, 2007
Tivig T, Hetze P. Deutschland im Demografischen Wandel. Rostock, 2007. S.31.
- Treutiger et al., 2003
Treutiger CJ, Mullins GE, Johansson AS, Rouhiainen A, Rauvala HM, Erlandsson-Harris H, Andersson U, Yang H, Tracey KJ, Andersson J, Palmblad JE. High mobility group 1 B-box mediates activation of human endothelium. *J Intern Med.* 2003; 254:375-385.
- Tuñón et al., 2009
Tuñón MJ, Alvarez M, Culebras JM, González-Gallego J. An overview of animal models for investigating the pathogenesis and therapeutic strategies in acute hepatic failure. *World J Gastroenterol.* 2009; 15:3086-3098.

- Ulevitch & Tobias, 1995 Ulevitch RJ, Tobias PS. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol.* 1995; 13:437-457.
- Underhill & Ozinsky, 2002 Underhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol.* 2002; 14:103-110.
- Urakami et al., 1997 Urakami A, Todo S, Zhu Y, Zhang S, Jin MB, Ishizaki N, Shimamura T, Totsuka E, Subbotin V, Lee R, Starzl TE. Attenuation of ischemic liver injury by monoclonal anti-endothelin antibody, AwETN40. *J Am Col Surg.* 1997; 185:358-364.
- Vallance, 1997 Vallance P. Exploring vascular nitric oxide in health and disease. The Goulstonian Lecture 1996. *J R Coll Physicians Lond.* 1997; 31:321-327.
- Vazzana et al., 2009 Vazzana N, Santilli F, Cucurullo C, Daví G. Soluble forms of RAGE in internal medicine. *Intern Emerg Med.* 2009; 4:389-401.
- Villeneuve & Pichette, 2004 Villeneuve JP, Pichette V. Cytochrome P450 and liver diseases. *Curr Drug Metab.* 2004; 5:273-282.
- Vollmar et al., 1995 Vollmar B, Glasz J, Menger MD, Messmer K. Leukocytes contribute to hepatic ischemia/reperfusion injury via intercellular adhesion molecule-1-mediated venular adherence. *Surgery.* 1995; 117:195-200.
- Vollmar et al., 2000 Vollmar B, Morgenthaler M, Amon M, Menger MD. Skin microvascular adaptations during maturation and aging of hairless mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 279:H1591-H1599.
- Vollmar & Menger, 2009 Vollmar B, Menger MD. The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. *Physiol Rev.* 2009; 89:1269-1339.
- Wang et al., 1991 Wang P, Ba ZF, Chaudry IH. Hepatic extraction of indocyanine green is depressed early in sepsis despite increased hepatic blood flow and cardiac output. *Arch Surg.* 1991; 126:219-224.
- Wang et al., 1999 Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science.* 1999; 285:248-251.
- Wang et al., 2009 Wang MY, Ross-Cisneros FN, Aggarwal D, Liang CY, Sadun AA. Receptor for advanced glycation end products is upregulated in optic neuropathy of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2009; 118:381-389.

- Wautier et al., 2001
Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001; 280:685-694.
- Wells-Knecht et al., 1996
Wells-Knecht KJ, Brinkmann E, Wells-Knecht MC, Litchfield JE, Ahmed MU, Reddy S, Zyzak DV, Thorpe SR, Baynes JW. New biomarkers of Maillard reaction damage to proteins. *Nephrol Dial Transplant.* 1996; 11:41-47.
- Xu et al., 2010
Xu Y, Toure F, Qu W, Lin L, Song F, Shen X, Rosario R, Garcia J, Schmidt AM, Yan SF. Advanced glycation end product (AGE)-receptor for AGE (RAGE) signaling and up-regulation of Egr-1 in hypoxic macrophages. *J Biol Chem.* 2010; 285:23233-23240.
- Yan et al., 1996
Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, Slattery T, Zhao L, Nagashima M, Morser J, Migheli A, Nawroth P, Stern D, Schmidt AM. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimers's disease. *Nature.* 1996; 382:685-691.
- Yan et al., 1997
Yan SD, Zhu H, Fu J, Yan SF, Roher A, Tourtellotte WW, Rajavashisth T, Chen X, Godman GC, Stern D, Schmidt AM. Amyloid-beta peptide - Receptor for advanced glycation end-product interaction elicits neuronal expression of macrophage-colony stimulating factor: a proinflammatory pathway in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci.* 1997; 94:5296-5301.
- Yan et al., 2000
Yan SD, Zhu H, Golabek A, Du H, Roher A, Yu J, Soto C, Schmidt AM, Stern D, Kindy M. Receptor-dependent cell stress and amyloid accumulation in systemic amyloidosis. *Nat Med.* 2000; 6:643-651.
- Zackova et al., 2003
Zackova M, Skobisová E, Urbánková E, Jezek P. Activating omega-6 polyunsaturated fatty acids and inhibitory purine nucleotides are high affinity ligands for novel mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *J Biol Chem.* 2003; 287:20761-20769.
- Zeng et al., 2004
Zeng S, Feirt N, Goldstein M, Guarrera J, Ippagunta N, Ekong U, Dun H, Lu Y, Qu W, Schmidt AM, Emond JC. Blockade of receptor for advanced glycation end product (RAGE) attenuates ischemia and reperfusion injury to the liver in mice. *Hepatology.* 2004; 39:422-432.

9 ANHANG

11.1 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Einfluss einer mitochondrialen Dysfunktion auf Proteinglykierung und Leberschädigung“ selbstständig angefertigt habe und mir darüber hinaus keine weitere Hilfe zuteil geworden ist.

Ich versichere, dass ich bei der Anfertigung der Dissertation keine anderen als die in der Arbeit genannten Hilfsmittel genutzt habe.

11.2 Thesen zu Dissertation

1. Es ist bekannt, dass oxidativer Stress in der Lage ist, die Zellintegrität zu zerstören. Während unter physiologischen Bedingungen ein Gleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen Mechanismen besteht, führt eine vermehrte Formation freier Radikale durch Lipidperoxidation, Proteinoxidation und Glykierungsreaktionen zur Schädigung der DNA und zur Förderung des Alterungsprozesses.
2. Besonders Störungen der mitochondrialen Atmungskette bringen vermehrten oxidativen Stress mit sich. Das Uncoupling Protein-2 (UCP2) ist ein mitochondrialer Transporter der inneren Membran, der den Rückfluss von Protonen in die Matrix ermöglicht und so deren Weiterreaktion zu freien Radikalen verhindert. Die Defizienz von UCP2 begünstigt die Entstehung freier Radikale, die ihrerseits Glykierungsprozesse fördern.
3. Ein möglicher Glykierungsprozess ist die Maillard-Reaktion. Hierbei entstehen in einer nicht-enzymatischen Reaktion zwischen Zucker und Proteinen Advanced Glycation Endproducts (AGEs). Es ist bekannt, dass AGEs bei verschiedenen Pathologien wie Diabetes mellitus, Arteriosklerose oder der Alzheimer'schen Erkrankung eine tragende Rolle spielen.
4. Der Rezeptor für Advanced Glycation Endproducts (RAGE) ist ein Multiligandenrezeptor, von dem sowohl eine membranständige Form als auch eine lösliche Form (soluble RAGE, sRAGE) existiert. Während das Binden von Liganden an die membranständige Variante zur Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden führt, die Entzündungsreaktionen aggravierend, detoxifiziert sRAGE durch Bindung die Liganden.
5. Vorstufen der AGEs, die noch keine Crosslink-Formation aufweisen, können durch ein Enzymsystem bestehend aus Glyoxalase I und II über Laktat zu Pyruvat metabolisiert werden.
6. Die vorliegende Studie hatte zum Ziel, den Einfluss von oxidativem Stress auf die Glykierung von Proteinen und das Binden an deren Rezeptor, sowie dessen

Detoxifikation in einem in vivo Modell des akuten Leberversagens zu untersuchen und die Frage zu klären, ob hierbei eine Altersabhängigkeit besteht.

7. Die Defizienz von UCP2 führt zu einer signifikanten Erhöhung der Blutglukose und des oxidativen Stresses. Der oxidative Stress konnte durch Bestimmung von Malondialdehyd, einem Produkt der Lipidperoxidation, quantifiziert werden. Eine enge Korrelation zwischen der Höhe des oxidativen Stresses und dem Ausmaß der Glykierung konnte nachgewiesen werden.
8. Die Induktion eines septischen Leberversagens durch Kombination von Galaktosamin und Lipopolysaccharid führt in beiden Tierstämmen zu einer massiven Entzündungsreaktion und es konnte eine gesteigerte Expression von AGEs und RAGE nachgewiesen werden.
9. RAGE und sRAGE verhalten sich in Bezug auf ihre Expression reziprok. Während der membranständige RAGE eine Entzündungsreaktion provoziert, wirken hohe sRAGE-Level protektiv im akuten Leberversagen.
10. Die Blockade von RAGE durch einen rekombinanten Antikörper (rRAGE) wirkt sich positiv auf das Überleben bei akutem Leberversagen aus. Besonders ausgeprägt ist dieser protektive Effekt bei juvenilen UCP2-defizienten Tieren. So könnte rRAGE eine supportive Therapiemaßnahme im akuten Leberversagen darstellen.
11. Die Altersstudie konnte zusätzlich zeigen, dass das Ausmaß des oxidativen Stresses mit dem Alter zunimmt und mit dem Anstieg von AGEs und RAGE korreliert. Während die hepatische Vulnerabilität gegenüber inflammatorischen Stimuli mit dem Alter steigt, sinken die protektiv wirkenden sRAGE-Konzentrationen deutlich.