

Bastian Freiherr von Nettelblatt  
Dr. med.

## **Methylglyoxal Induced Endothelial Dysfunction via Loss of Proliferation**

Fach/ Einrichtungen: Innere Medizin  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Peter P. Nawroth

Der menschliche Körper ist tagtäglich zellulären Stressfaktoren ausgesetzt, die zu einer Vielzahl unterschiedlicher Reaktionen führen, die von der Aktivierung überlebensfördernder Stoffwechselwege bis hin zur Auslösung des programmierten Zelltods zur Beseitigung der geschädigten Zellen reichen. Diese Stressoren können exogen sein, wie z.B. Umweltverschmutzung, aber sie können auch endogen, als Nebenprodukt des Zellstoffwechsels, erzeugt werden. Methylglyoxal, ein Nebenprodukt, das aus dem nicht-enzymatischen Abbau des Triosephosphat-Pools von Metaboliten in der Glykolyse entsteht, gehört zur Klasse der endogenen Stressoren, die als reaktive Carbonylspezies bezeichnet werden. MG wirkt als starkes Glykierungsmittel und bildet fortgeschrittene Glykierungsendprodukte, insbesondere die von Arginin abgeleitete Modifikation MG-H1. Studien haben *ex vivo* gezeigt, dass die Modifikation von Modellproteinen durch Methylglyoxal strukturelle Verzerrungen, den Verlust der Seitenkettenladung und funktionelle Beeinträchtigungen verursacht. Es wurde auch berichtet, dass freies MG-H1, der Adduktrest, der durch zelluläre Proteolyse aus modifizierten Proteinen freigesetzt wird, in Plasma, Urin, Zerebrospinalflüssigkeit, Synovialflüssigkeit und Peritonealdialyse nachgewiesen werden kann, und erhöhte Werte wurden mit fortgeschrittener Nierenerkrankung im Endstadium, Zirrhose, Alzheimer, Parkinson und Alterung in Verbindung gebracht. Trotz umfangreicher *In-vivo*-Nachweise ist immer noch unklar, welche *In-vitro*-Wirkungen MG/MG-H1 außer der Induktion von Zytotoxizität noch hat. In dieser Studie wurden die Auswirkungen von MG auf die zelluläre Lebensfähigkeit und Funktion in kardialen Endothelzellen der Maus untersucht. Die Pharmakinetik von Methylglyoxal, seine Entgiftung über das Glyoxalase-System und die Bildung von MG-H1 wurden mit Hilfe von Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie, Western Blotting und Immunfluoreszenz untersucht. Die Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen von exogenem MG stimuliert, und die Auswirkungen auf die Induktion einer endothelialen Dysfunktion wurden mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Fähigkeit von exogenem Methylglyoxal, oxidativen und/oder Redox-Stress zu induzieren, wurde ebenfalls mit einer Kombination von Fluoreszenzfarbstoffen und Zellen untersucht, die Sensoren für reduktions-oxidationsempfindliches grünes Fluoreszenzprotein exprimieren, während die Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit und Proliferation von Zellen mit Hilfe von Mikroplatten-Assays, Echtzeit-Zellanalyse und Durchflusszytometrie untersucht wurden.

Es wurde festgestellt, dass die Aufnahme von Methylglyoxal schnell erfolgte und eine Stunde nach der Stimulation die gleiche Molarität erreichte. Die Entgiftung über das Glyoxalase-System war linear, aber nicht proportional, obwohl die Stöchiometrie der Umwandlung von Methylglyoxal in D-Laktat 1:1 beträgt. Das verbleibende Methylglyoxal führte zur Bildung von MG-H1, insbesondere im Zellkern, und erreichte sechs Stunden nach der Stimulation ein Maximum und blieb 24 Stunden lang relativ stabil. Zu diesem Zeitpunkt konnten mehrere zelluläre Effekte beobachtet werden, die als endotheliale Dysfunktion eingestuft werden können. Dazu gehörte ein Rückgang der Oberflächenexpression von CD106/VCAM-1, einem Protein, das die Adhäsion von Leukozyten vermittelt, während die Expression von CD146/MUC18, einem Marker für vaskuläre Endothelzellen, der zur Zelladhäsion und Angiogenese beiträgt, von CD201/EPCR-Rezeptor für Proteinkinase C, der bei Ligatur zytoprotektiv wirkt, und von CD62E/E-Selektin, einem Protein, das eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Leukozyten an der Verletzungsstelle spielt, deutlich erhöht war. Diese Veränderungen gingen mit einer Zunahme der Leukozyten- und allgemeinen Adhäsion in den Zellen sowie mit einem Verlust der TNF $\alpha$ -Reaktivität einher. Diese Effekte wurden nicht mit der Induktion von oxidativem Stress in Verbindung gebracht, sondern mit einer Tendenz zu hyper-reduktivem Stress. Methylglyoxal führte auch zu einer dosisabhängigen Verringerung der Lebensfähigkeit und der Proliferationsfähigkeit der Zellen, war aber nicht mit der Induktion des Zelltods durch Apoptose oder Quieszenz oder Seneszenz verbunden. Es gab jedoch Hinweise auf eine Verlangsamung des Zellzyklus in der G2/M-Phase. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die akute Exposition gegenüber Methylglyoxal nuancierter und wirkungsvoller sein kann als die extreme Reaktion des Zelltods. Der daraus resultierende, durch Methylglyoxal induzierte zelluläre Phänotyp, der als nicht proliferierender Zustand charakterisiert ist und mit der Induktion einer endothelialen Dysfunktion einhergeht, könnte zu Veränderungen in der Gewebemöiostase sowie in den Zell-Zell-Interaktionen führen und damit zur Pathogenese von Krankheiten beitragen, bei denen Methylglyoxal bekanntermaßen akkumuliert, wie Diabetes und Krebs.